



**HAL**  
open science

## Interactions moléculaires des calpaines 1 et 3 avec la région N1 de la titine humaine

Gerald Coulis

► **To cite this version:**

Gerald Coulis. Interactions moléculaires des calpaines 1 et 3 avec la région N1 de la titine humaine. Biologie cellulaire. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2007. Français. NNT : 2007CLF21776 . tel-00718302

**HAL Id: tel-00718302**

**<https://theses.hal.science/tel-00718302>**

Submitted on 16 Jul 2012

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITE BLAISE PASCAL**

N° DU :

**UNIVERSITE D'AUVERGNE**

Année 2007

**ECOLE DOCTORALE  
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

N° d'ordre :

*Thèse*

Présentée à l'Université Blaise Pascal  
pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR D'UNIVERSITE**  
(SPÉCIALITÉ : **SCIENCES DES ALIMENTS**)

Soutenue le

**COULIS GERALD**

---

Interactions moléculaires des calpaines 1 et 3  
avec la région N1 de la titine humaine.

---

Examineurs : Pr. Paul Nicolas  
Dr Yves Benyamin  
Dr. Isabelle Richard  
Dr. Ahmed Ouali

Rapporteurs : Dr. Patrick Cottin  
Dr. Robin Candau

Laboratoire de Biochimie des Protéines  
Qualité des Produits Animaux - QuaPA  
INRA - Clermont-Ferrand. - Theix

**UNIVERSITE BLAISE PASCAL**

N° DU :

**UNIVERSITE D'AUVERGNE**

Année 2007

**ECOLE DOCTORALE  
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

N° d'ordre :

*Thèse*

Présentée à l'Université Blaise Pascal  
pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR D'UNIVERSITE**  
(SPÉCIALITÉ : **SCIENCES DES ALIMENTS**)

Soutenue le

**COULIS GERALD**

---

Interactions moléculaires des calpaines 1 et 3  
avec la région N1 de la titine humaine.

---

Examineurs : Pr. Paul Nicolas  
Dr Yves Benyamin  
Dr. Isabelle Richard  
Dr. Ahmed Ouali

Rapporteurs : Dr. Patrick Cottin  
Dr. Robin Candau

Laboratoire de Biochimie des Protéines  
Qualité des Produits Animaux - QuaPA  
INRA - Clermont-Ferrand. - Theix





*« Pa Konnet mové »  
Il est mauvais de ne pas savoir*



## Remerciements

*Après quatre années de travail, il est difficile de trouver les mots justes pour remercier tous ceux qui m'ont apporté un soutien professionnel mais surtout personnel. Comme je ne souhaite pas faire de cet exercice des remerciements une partie aussi délicate que la thèse en elle-même, je vais tâcher d'être concis.*

*Je souhaite remercier tout d'abord les membres du jury, pour le temps précieux qu'ils ont accordé à ce travail: Monsieur Paul Nicolas, le président, Messieurs Robin Candau et Patrick Cottin les rapporteurs, Messieurs Ahmed Ouali et Yves Benyamin et Mademoiselle Isabelle Richard. C'est un immense privilège que de voir mon travail évalué par des chercheurs reconnus au niveau international.*

*Je tiens à remercier chaleureusement Mr Ahmed Ouali pour m'avoir accueilli, il y a maintenant quelques années au sein de son équipe. Je vous suis très reconnaissant de m'avoir prodigué tous les innombrables conseils et transmis cette culture de la recherche. En espérant que le manuscrit soit à la hauteur de la confiance que vous m'avez accordée, veuillez trouver ici le témoignage de ma profonde gratitude.*

*J'exprime toute ma reconnaissance à Mr Yves Benyamin qui a été le point de départ de mon parcours atypique. Les brèves discussions que nous avons eues ont toujours été instructives et j'espère que ce manuscrit est un témoin de la rigueur scientifique que vous vous efforcez de transmettre.*

*Je tiens à remercier tout particulièrement Mademoiselle Isabelle Richard. Au travers des diverses collaborations que nous avons eues, des divers échanges téléphoniques, j'ai pu mesurer toute l'étendue de vos connaissances. Que ce travail soit un témoignage de mon admiration pour vos compétences et votre enthousiasme.*

*J'exprime toute ma reconnaissance au Conseil Régional de Martinique et à son président Mr Alfred Marie Jeanne pour le soutien financier qui m'a été accordé. Un grand merci également à Mme Vartel pour sa disponibilité et sa gentillesse.*

*Au travers des différentes techniques que j'ai utilisées dans mon travail, j'ai collaboré avec un certain nombre de personnes. Ce travail ne verrait pas le jour sans leur compétence et leur professionnalisme :*

- *Merci à Laure Brémaud et à Patrick Pélissier, mes maîtres Jedi de m'avoir enseigné les rudiments de la biologie moléculaire. J'ai vraiment été bien accueilli dans votre équipe. A ce sujet, je remercie également Mr Hubert Levezuel de m'avoir reçu dans son unité.*
- *Merci à Christine Martin de m'avoir donné de nombreux conseils pour la production des protéines recombinantes. Un grand merci à Evelyne Forano de m'avoir permis d'utiliser le matériel de l'équipe de microbiologie. A ce titre, je remercie toute l'équipe de microbiologie pour cet accueil chaleureux,*

*Merci également à toutes les personnes de l'unité Q'UAPA qui ont contribué à ce travail de près ou de loin. Je remercie bien sûr mon premier stagiaire, Antoine, ton concours pendant ces deux mois m'a été très précieux. J'espère que je t'ai filé un petit peu le virus de la recherche. Merci beaucoup pour ta bonne humeur, ton soutien et bien sûr pour ton aide.*

*Voilà je n'ai pas fait que bosser et durant ces sept années passées (si je compte bien) j'ai tissé de nombreuses amitiés et affinités. Je ne vais pas tout développer ici (ça pourrait être un sujet de thèse !!) mais vous savez que je vous apprécie beaucoup.*

*Je ne peux oublier de remercier ma famille. Il n'y a pas de mots pour remercier ceux sans qui (c'est sûr !) je ne serais pas là. Je pense tout particulièrement à mon parrain et à toi maman, je vous aime. Merci pour tout sans exceptions mais surtout pour votre amour. Merci à mon petit frère, que j'aime ne perds jamais ce don que tu as avec les enfants.*

*Je tiens à remercier également ma grand-mère qui ne peut être là physiquement mais qui est présente dans mon cœur. Tu aurais été fière de ton petit fils.*

*Enfin ma petite puce, merci pour tout ce que tu m'apportes, pour ton inconditionnel soutien, pour tout ce qu'on partage et surtout pour ce cadeau du ciel.*

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

<b>Introduction</b> .....	<b>4</b>
<b>Synthèse bibliographique</b> .....	<b>7</b>
<b>I. La protéolyse dans le muscle</b> .....	<b>7</b>
I.1 Etat de l'art .....	7
<b>II. Contrôle et régulation de la protéolyse</b> .....	<b>36</b>
II.1 Etat de l'art .....	36
<b>III. Dégradation intracellulaire des protéines musculaires</b> .....	<b>48</b>
III.1 Préambule sur la structure du muscle et les différentes protéines musculaires .....	48
III.2 Cas particulier d'une dégradation multienzymatique : l'attendrissage de la viande .....	59
<b>IV. Conclusion générale</b> .....	<b>68</b>
<b>Matériels et méthodes</b> .....	<b>70</b>
<b>I. Matériel biologique</b> .....	<b>70</b>
I.1 ADN complémentaires .....	70
I.2 Vecteur .....	70
I.3 Protéines .....	70
I.4 Anticorps .....	70
I.5 Matériels de chromatographie .....	71
I.6 Matériels de spectrométrie .....	71
I.7 Matériels relatifs à la biologie moléculaire .....	71
<b>II. Méthodes relatives aux acides nucléiques</b> .....	<b>71</b>
II.1 Mini-préparation d'ADN plasmidique .....	71
II.2 Clonage en vecteur TOPO par PCR .....	72
<b>III. Méthodes relatives aux protéines</b> .....	<b>77</b>
III.1 Obtention des protéines recombinantes .....	77
III.2 Etude de l'interaction Titine/calpaïnes .....	83
III.3 Régulation de l'interaction .....	84
<b>Résultats et Discussion</b> .....	<b>92</b>
<b>I. Production et purification des protéines recombinantes</b> .....	<b>92</b>
I.1 Introduction .....	92
I.2 Stratégie et Design des amorces .....	92
I.3 Résultats .....	93
<b>II. Fixation du calcium sur la titine et conséquences structurales</b> .....	<b>95</b>
II.1 Introduction .....	95
II.2 Titration Calcium de la titine .....	96
II.3 Conséquences structurales.....	98
II.4 Discussion .....	99
<b>III. Interaction des calpaïnes 1 et 3 avec la titine à proximité de la strie Z</b> .....	<b>101</b>
III.1 Fixation de la calpaïne 1 .....	101
III.2 Fixation de la calpaïne 3 .....	107
<b>Conclusion générale</b> .....	<b>118</b>
<b>Le calcium induit la structuration de la titine dans la bande I</b> .....	<b>118</b>
<b>Le calcium est à la base d'une régulation fine des calpaïnes dans la bande I</b> .....	<b>118</b>
<b>La titine serait le centre névralgique du signalosome musculaire</b> .....	<b>120</b>
<b>La calpaïne 3 pourrait réguler l'activité des calpaïnes classiques</b> .....	<b>121</b>
<b>Perspectives</b> .....	<b>121</b>
<b>Structuration de la titine</b> .....	<b>121</b>

Association de la $\mu$ -calpaïne avec la titine.....	122
Association de la calpaïne 3 avec la titine .....	122
Signalosome centré autour de la titine .....	123
Possible régulation des calpaïnes par la calpaïne 3.....	123
<i>Références bibliographiques</i> .....	125
<i>Publications et communications</i> .....	158

# *Nomenclature*

ADNc : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire  
 AMC : Amino 4-MéthylCoumarine  
 AMP: Adénosine monophosphate désaminase  
 ARNm : Acide RiboNucléique messenger  
 ATP : Adénosine TriPhosphate  
 pb : paire de bases  
 BSA: Bovine Serum Albumin  
 kDa : kiloDalton  
 DEAE : DiEthylAminoEthyl  
 D.O: Densité optique  
 DTT : DiThioThreitol  
 EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétracétique  
 EGTA: Ethylène glycol tetracetic acid  
 ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay  
 E64 : Trans-Epoxy-succinyl-L-amido(4-guanido) butane  
 FITC: Fluoroscein IsoThioCyanate  
 FPLC : Fast Protein Liquid Chromatography  
 IgG : Immunoglobuline de classe G  
 LDH: Lactate Deshydrogenase  
 MCE: 2 mercapto-ethanol  
 OPD: O-PhenyleneDiamine  
 PBS : Phosphate Buffered Saline  
 PCR: Polymerase Chain Reaction  
 PMSF : Phenyl Methyl Sulfonyl Fluorure  
 SDS : Sodium Dodécyl Sulfate  
 TCA: Acide Trichloroacétique  
 Tris : Tris(Hydroxyméthyl)-aminométhane  
 UV: Ultra Violet

**Acides Aminés :**

acide aminé	code 3 lettres	code 1 lettre	acide aminé	code 3 lettres	code 1 lettre
Alanine	Ala	A	Leucine	Leu	L
Arginine	Arg	R	Lysine	Lys	K
Asparagine	Asn	N	Méthionine	Met	M
Acide Aspartique	Asp	D	Phénylalanine	Phe	F
Cystéine	Cys	C	Proline	Pro	P
Acide Glutamique	Glu	E	Sérine	Ser	S
Glutamine	Gln	Q	Thréonine	Thr	T
Glycine	Gly	G	Tryptophane	Trp	W
Histidine	His	H	Tyrosine	Tyr	Y
Isoleucine	Ile	I	Valine	Val	V
Hydroxyproline	Hyp		Hydroxylysine	Hyl	

# *Introduction*

## Introduction

Au cours de la vie d'une cellule, pratiquement toutes les protéines sont renouvelées par dégradation et synthèse *de novo*. Leur durée de vie est cependant très différente d'une protéine à l'autre.

Cette dégradation est réalisée grâce à des enzymes appelées les protéases. *In vivo*, les enzymes protéolytiques sont présentes dans tous les tissus et sont impliquées dans de nombreux processus, qu'ils soient physiologiques ou pathologiques. Elles interviennent notamment dans le turn-over des protéines. Les protéines essentielles au fonctionnement cellulaire sont synthétisées en continu pour fournir un stock de molécules actives. En parallèle, le processus inverse nommé catabolisme est aussi important. Dans ce cas, les protéines fournissent des acides aminés pour la synthèse et évitent le déséquilibre entre protéines synthétisées et protéines détruites. La protéolyse est un processus catalytique qui conduit au clivage (hydrolyse) de la liaison peptidique aux extrémités (exo-peptidases) ou à l'intérieur (endo-peptidases) de la chaîne polypeptidique. Les protéases sont d'abord des hydrolases. On distingue quatre familles de protéases classées selon leur mécanisme catalytique et la nature du groupe fonctionnel ou du cofacteur impliqué dans le mécanisme: les sérine, cystéine, aspartyl et métalloprotéinases.

La dégradation des protéines intracellulaires est un processus essentiel non seulement dans la physiologie de la cellule mais aussi dans l'organisme entier. Au-delà de son rôle dans l'élimination des polypeptides anormaux et le maintien de l'homéostasie cellulaire, elle confère un caractère irréversible à certains processus biologiques fondamentaux, comme la progression unidirectionnelle dans le cycle cellulaire, la différenciation ou l'apoptose. En outre, elle contribue à la régulation de l'activité de protéines impliquées dans la transmission du signal ou constituant un maillon d'une chaîne métabolique ou catabolique (phosphokinases, caspases). La protéolyse affecte donc des fonctions importantes de l'organisme tels que l'organogenèse ou la morphogenèse. En raison de son importance biologique, il est raisonnable de suspecter que des altérations des mécanismes de la protéolyse intracellulaire puissent avoir des conséquences pathologiques. Pour prévenir ces dysfonctionnements, les systèmes protéolytiques font l'objet d'une régulation très stricte assurée à différents niveaux :

- Au niveau de la régulation de l'expression des gènes codant pour les protéases
- Souvent synthétisés sous forme de zymogène, l'activation de ces derniers par voies auto-catalytiques ou par d'autres enzymes ou protéines particulières est très régulée.
- La compartimentation cellulaire comme c'est le cas pour les enzymes lysosomales
- Par des modulateurs de leur activité protéolytique qu'il s'agisse d'activateurs ou d'inhibiteurs.

Leur importance est également reconnue dans la transformation du muscle en viande lors de la phase de conservation à l'état réfrigéré. Ils contribuent de façon significative à la définition de la tendreté de la viande, qualité considérée comme la plus importante chez le consommateur (Zamora, 1997).

Leur implication dans l'attendrissage de la viande mais aussi dans divers événements cellulaires, pathologiques ou non, a conduit notre groupe à s'intéresser à la régulation, le rôle physiologique et le réseau d'interactions de ces différents systèmes protéolytiques. Parmi ces systèmes, au cours de la maturation, les calpaïnes, membres de la famille des cystéine protéases seraient les plus actives. Elles seraient en effet responsables à 95% de la dégradation des structures musculaires en particulier de l'assemblage myofibrillaire (Delgado *et al.*, 2001a, 2001b). Cette anarchie myofibrillaire est due aux altérations des protéines d'ancrage et de réticulation, plus particulièrement la titine, protéine gigantesque qui régule l'élasticité du sarcomère. Des calpaïnes, la calpaïne 3 spécifique du muscle suscite un vif intérêt. Les nombreuses recherches effectuées depuis la découverte du gène de la calpaïne 3 (Sorimachi *et al.*, 1989) démontrent qu'elle est présente dans le muscle sous forme inactive associée à la titine. Même si dans le contexte de la viande, son implication est controversée, des mutations génétiques entraînant un défaut de son activité protéolytique sont à l'origine d'une pathologie invalidante, la myopathie des ceintures de type 2A (LGMD2A pour Limb Girdle Muscular Dystrophy type 2A). De fait, une meilleure connaissance de la calpaïne 3, des processus d'activation et de régulation mis en œuvre ainsi que de ses partenaires au niveau cytosquelettique permettrait d'apporter des éléments de réponse tant au niveau pathologique que sur le plan de la maturation de la viande.

Ainsi par une approche moléculaire, nous tacherons de caractériser l'interaction des calpaïnes 1 et 3 avec la titine au niveau de la strie Z. A partir de ce postulat, on essaiera de montrer une éventuelle implication du calcium dans la régulation de ces interactions.

Avant d'exposer les résultats obtenus, nous présenterons une synthèse bibliographique s'articulant autour des systèmes protéolytiques, des contrôles qu'ils subissent et de leur contribution dans des phénomènes pathologiques ou dans l'attendrissage de la viande.

# *Etude bibliographique*

## **Synthèse bibliographique**

### ***1. La protéolyse dans le muscle***

#### ***1.1 Etat de l'art***

##### **1.1.1 Définitions et caractéristiques générales**

La protéolyse est un processus catalytique conduisant à la fragmentation d'une protéine sous l'action d'une enzyme. Cette hydrolyse survient aux extrémités sous l'action d'exoprotéases ou exopeptidases ou à l'intérieur de la chaîne polypeptidique sous l'action d'endopeptidases ou endoprotéases. On distingue 4 familles de protéases selon la nature du groupe fonctionnel le plus important du site catalytique : sérine, cystéine, aspartique ou métallo protéases.

Dans ce chapitre consacré aux protéases musculaires, nous avons volontairement occulté les exoprotéases qui dans notre thématique de recherche sur la viande ne présentent pas une activité aussi importante que les endoprotéases. Très souvent, lorsque l'on parle des systèmes protéolytiques d'un tissu donné, on fait allusion aux systèmes sensés jouer un rôle dans la protéolyse cellulaire au sens large, c'est-à-dire les systèmes impliqués principalement dans le processus de renouvellement des protéines ou *turn-over* protéique. Ces systèmes, souvent ubiquitaires, sont en effet les plus abondants dans l'ensemble des tissus et cellules qui ont fait l'objet d'investigations. On les distingue généralement sur la base de leur localisation cellulaire. Le plus souvent cytosoliques, certains présentent une compartimentation cellulaire particulière. Les plus étudiés dans cette thématique sont les calpaïnes et le protéasome ainsi que le système lysosomal, puisque sa localisation est limitée aux organites qui portent le même nom à savoir, les lysosomes. Dans ce chapitre général sur les systèmes protéolytiques musculaires, nous avons décidé d'intégrer deux systèmes qui semblent avoir une implication prépondérante dans la protéolyse à savoir les sérines protéases et les caspases. L'existence au sein de la cellule musculaire des sérines protéases a été longtemps mise en doute mais des résultats récents semblent indiquer que certaines d'entre elles pourraient jouer un rôle important dans le muscle *post-mortem*. Quant aux caspases, les dernières observations enregistrées sur ces cystéines protéases laissent à penser que le processus d'apoptose est inéluctable dans le processus de maturation de la viande (Herrera Mendez, 2006).

## I.1.2 Différents systèmes protéolytiques

### ***I.1.2.1 Les aspartylprotéinases***

Les aspartylprotéinases ont un processus catalytique qui dépend de la réactivité des chaînes latérales de deux acides aspartique au niveau du site actif. Cette superfamille existe chez les eucaryotes mais aussi les champignons et les rétrovirus. On y dénombre trois familles réparties selon leur degré d'homologie de séquence amino acide (Rawlings et Barrett, 1994a) : les pepsines, les rétropepsines et enfin les pararétrovirus. Les aspartyl protéinases provenant des eucaryotes ont une structure monomérique articulée autour de deux domaines contenant chacun un résidu aspartate responsable de l'activité protéolytique. Ces deux domaines auraient la même particularité topologique (Kay *et al.*, 1988).

### ***I.1.2.2 Les metalloprotéinases***

Sans doute les moins connues des endoprotéases, elles n'en demeurent pas moins importantes pour la cellule puisqu'elles sont synthétisées en fonction des besoins. Cette particularité rend leur exploration difficile. Comme leur nom l'indique, les metalloprotéinases renferment un ion métallique (Zinc le plus souvent) dans leur site actif. Parmi ces protéases, les metalloprotéases et plus particulièrement celles de la matrice extracellulaire (MMP pour *matrix metalloproteinases*) (Murphy et Docherty, 1992) sont classées en plusieurs sous-familles selon leur structure primaire et leur spécificité. Il est apparu que ces MMP sont les acteurs majeurs de la dégradation de la Matrice ExtraCellulaire (MEC) (Birkedal-Hansen, 1993). Elles se caractérisent comme une famille d'endopeptidases calcium-zinc dépendantes, capables de dégrader les différents composants de la matrice extracellulaire c'est-à-dire de l'interstitium et des membranes basales. Elles sont synthétisées et secrétées par de nombreux types cellulaires et jouent un rôle important dans tous les processus de remaniement tissulaire, normaux ou pathologiques. Les MMP sont dans la grande majorité secrétées sous forme latente et sont ensuite activées dans l'environnement péricellulaire ou extracellulaire.

Les metalloprotéinases de la matrice extracellulaire (MPM) présentent les caractéristiques communes suivantes :

- Une structure homologue indiquant qu'elles sont issues d'un gène ancestral commun.
- La présence d'un ion zinc impliqué dans le mécanisme catalytique de l'enzyme.
- Une synthèse et une sécrétion sous forme inactive (pro-enzyme ou zymogène).
- Une activation extracellulaire pour exercer leur action de dégradation.
- Une capacité à dégrader les composants de la matrice extracellulaire *in vivo* ; l'activité des MMP est maximale à pH neutre (protéinases neutres) et nécessite obligatoirement la présence de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Le nombre total des métalloprotéases de la matrice extracellulaire identifiées à ce jour s'élève à 23 (Parks et Shapiro, 2001).

La protéine de chaque MMP (exceptée la MMP-23) comporte plusieurs domaines. Le premier domaine en N-terminal est un propeptide (séquence d'environ 80 acides aminés) qui maintient l'enzyme sous forme inactive lors de sa synthèse dans le milieu extracellulaire (zymogène). Le propeptide est secondairement clivé *in vivo*, libérant le domaine catalytique pour permettre son interaction avec le substrat.

Faisant suite au propeptide le domaine catalytique (environ 170 acides aminés) contient le site actif de l'enzyme auquel est fixé un ion zinc qui se dissocie lors de l'activation de la protéine. Le domaine catalytique est impliqué dans la spécificité de substrat des MMP.

Le troisième domaine retrouvé à la partie C-terminale de toutes les MMP (sauf la matrilysine) *hemopexin-like* ou *vibronectin-like* est composé d'environ 210 acides aminés et possède d'importantes homologues structurales avec la famille des hémopexines et avec la vibronectine. Il a pu être démontré que ce domaine médie la liaison des gélatinases A et B avec deux inhibiteurs des métalloprotéinases (TIMP-1 et TIMP-2 pour Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 et 2), mais aussi la liaison de la progélatinase A avec TIMP-2 et de la progélatinase B avec TIMP-1. Ce domaine *hemopexin-like* est également important pour la spécificité de reconnaissance du substrat : les collagénases délétées de leur domaine C-terminal conservent leur capacité à dégrader des substrats non spécifiques (caséine par exemple), mais perdent leur capacité à dégrader le collagène (Murphy *et al.*, 1992).

D'autres domaines peuvent exister selon les MMP comme le domaine transmembranaire qui caractérise les métalloprotéinases membranaires (MT-MMP).

### ***1.1.2.3 Les sérines protéinases musculaires***

Ces protéases présentent une large spécificité de substrat qui leur permet d'hydrolyser aussi bien les protéines myofibrillaires que les composants majeurs du tissu conjonctif. Les sérine protéases ont une activité maximale dans une gamme de pH légèrement alcalin (8-9) (Bird et Carter, 1980). Au niveau musculaire, les premières activités de type sérine protéase (Stauber *et al.*, 1977) ont clairement montré l'existence de sérine protéinases qui contribueraient à la régulation de divers processus biologiques comme la digestion, la coagulation sanguine ou la réponse immunitaire. Parmi ces sérine protéinases, citons les plus importantes telles la kallikréine (Margolius 1996 ; Bourgeois *et al.*, 1977) , le système plasmine-plasminogène, les activateurs tissulaires du plasminogène (Padro *et al.*, 1990 ; Festoff *et al.*, 1982) et la thrombine (Citron *et al.*, 1997). Les récents travaux d'Herrera Mendez (2006) sur les serpinines, seuls inhibiteurs des sérine protéinases, tendent à confirmer l'existence de ces protéinases au niveau musculaire.

- **Structure**

Les sérines protéinases ont plusieurs caractéristiques structurales communes. Elles se composent ainsi de deux domaines homologues chacun étant constitué d'un tonneau  $\beta$  formé de six brins  $\beta$  antiparallèles. Il y a une certaine similarité de séquences entre les deux domaines, si bien que l'on suppose qu'ils découlent d'un gène unique ancestral, dupliqué ensuite, et qui a fait l'objet de mutations indépendantes. Les éléments de la triade sont fixés sur les deux domaines, qui participent ainsi tous les deux au même acte catalytique : L'aspartate et l'Histidine sont sur le domaine 1, tandis que la Sérine est sur le domaine 2. Les sérines protéinases sont synthétisées sous forme de préproenzyme avant de devenir des zymogènes ou proenzymes suite au passage à travers la membrane du réticulum endoplasmique. Enfin leur activation se fait par un clivage protéolytique en N-terminal. Toutefois quelques enzymes nécessitent un clivage interne pour être actives (Appel 1986, Doyle et Haley 1993).

- **Mécanisme d'action**

Les protéases à sérine ont en commun le mécanisme de coupure, basé sur la polarisation de la liaison peptidique par un groupement sérine sous forme alcoolate. Pour atteindre cet état, une histidine et un aspartate, formant une triade avec la sérine, doivent être positionnés pour que la liaison OH de la sérine soit très fortement polarisée. Le mécanisme se déroule en deux temps (mécanisme ping-pong). Après la formation du complexe Enzyme-Substrat, le groupement carbonyle du lien scissible P1 est attaqué par la triade (Ser, His, Asp) formant un intermédiaire oxyanionique. Cet état transitoire est stabilisé par la formation de liens hydrogène avec le résidu sérine. Ensuite un proton est donné par l'histidine, et le fragment P'1 se dissocie. Enfin la 2<sup>ème</sup> phase se caractérise par une libération du fragment P1 avec l'addition d'une molécule d'eau. L'eau remplace alors le site actif libéré par la dissociation du 1<sup>er</sup> fragment. L'apport d'un nouveau proton conduit à la libération du second fragment (Appel 1986).

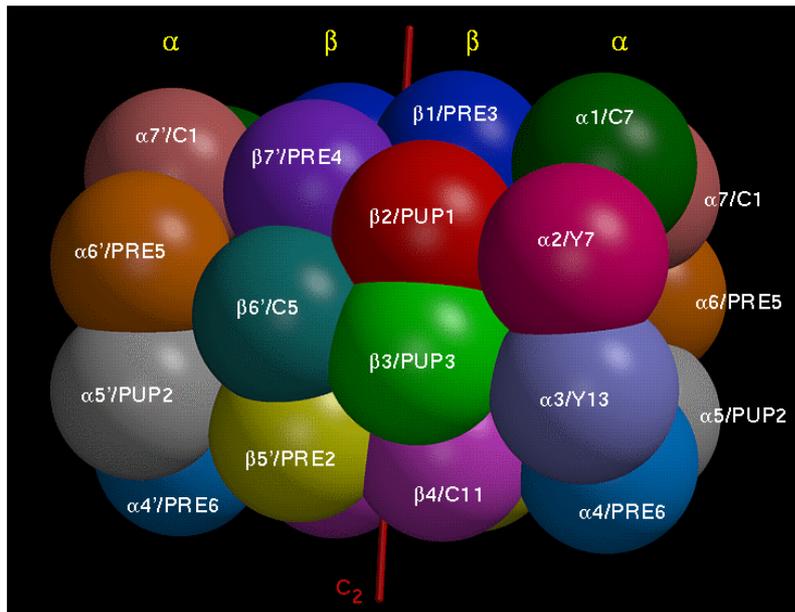
#### ***1.1.2.4 Le protéasome***

Découvert au début des années 80 (Orlowski et Wilk, 1981), le protéasome est un complexe cytosolique et nucléaire qui possède plusieurs activités peptidasiques différentes (Rivett, 1993). A ce titre, il est aussi appelé complexe protéolytique multicatalytique (MCP). Les différents complexes identifiés à ce jour ont une base commune qui est le protéasome 20s. Ces complexes se différencient par la nature des structures protéiques associées au complexe 20s.

- **Protéasome 20s**

- Structure

C'est un complexe de 750kDa qui a un coefficient de sédimentation voisin de 20s (Tanaka *et al.*, 1986). En microscopie électronique, Baumeister et ses collaborateurs (1988) décrivent le protéasome comme une structure cylindrique formé par l'empilement de quatre anneaux. Sa longueur est d'environ 17nm pour 12nm de diamètre. Les quatre anneaux forment un canal central comprenant deux petites cavités encadrant une troisième plus large et située au centre du complexe (Lupas *et al.*, 1993). Des études immunologiques ont montré que les deux anneaux externes étaient constitués chacun de 7 sous unités  $\alpha$  non catalytiques



**Figure N°1:** Organisation spatiale des sous-unités du protéasome 20S de *S. cerevisiae* (<http://www.biochem.mpg.de/xray/projects/hubome/ypr.html>)

alors que les anneaux centraux étaient formés chacun de 7 sous unités  $\beta$  (Figure N°1) responsables de l'activité catalytique (Grziwa *et al.*, 1991). La structure quaternaire du protéasome reste inchangée (Dahlmann *et al.*, 1991) quelque soit l'organisme ce qui suggère des fonctions communes du protéasome 20s dans tous les organismes.

- Mécanisme d'action

Le mécanisme d'action du protéasome 20s est resté très longtemps inexpliqué en raison de l'absence d'homologie de séquences des sous unités  $\alpha$  et  $\beta$  mais aussi à cause d'un profil d'inhibition différent de ceux obtenus pour les autres classes de protéases.

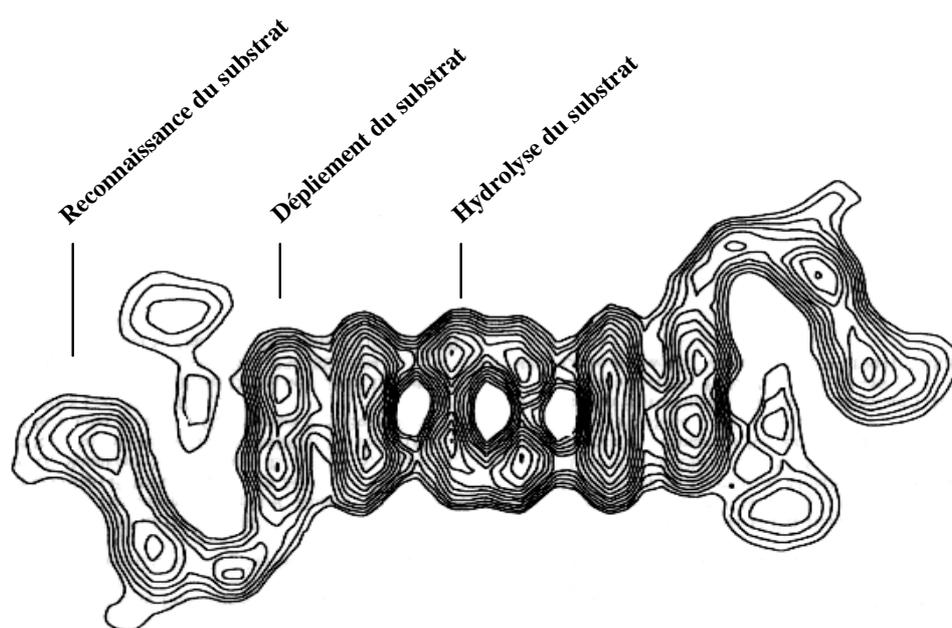
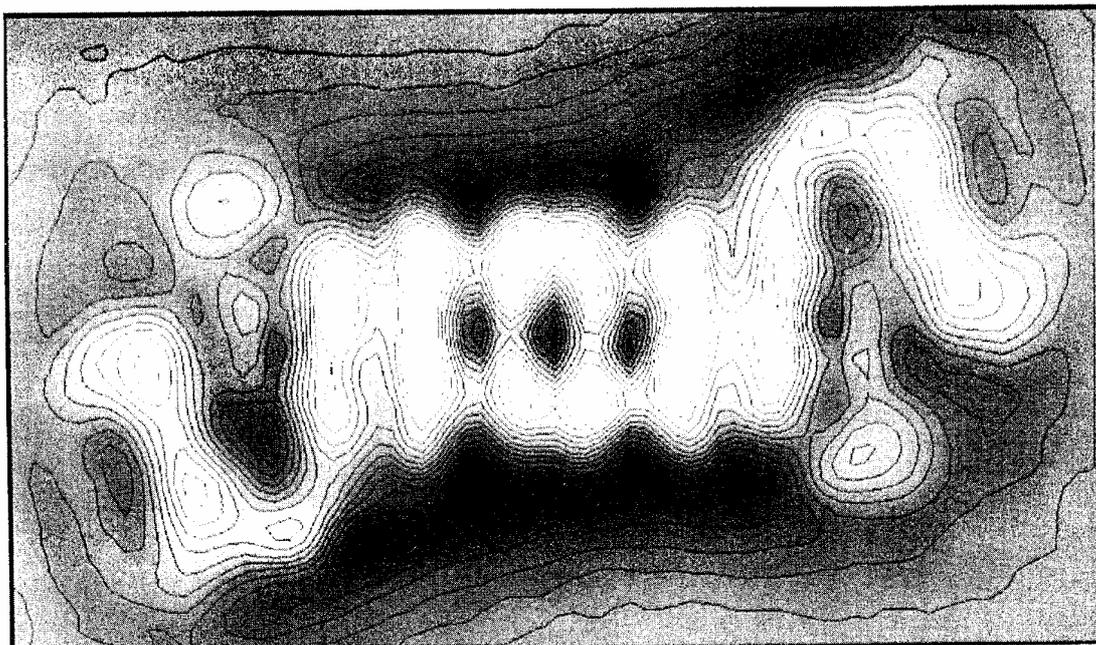
Aujourd'hui plusieurs données biochimiques conduisent à classer le protéasome dans une nouvelle famille de protéinases, les hydrolases à N-terminal nucléophile (Brannigan *et al.*, 1995). L'utilisation en particulier d'un inhibiteur spécifique, la lactacystine, qui permet de réagir avec le résidu Thréonine N-terminal nucléophile permet de confirmer ce modèle (Seemuller *et al.*, 1995). Les hydrolases à N-terminal nucléophile présentent la même structure tertiaire à savoir des hélices  $\alpha$  entourant des feuillets  $\beta$  et ont toutes un acide aminé catalytique situé en bout de chaîne, la thréonine en l'occurrence pour le protéasome. Elles sont toutes synthétisées sous forme de proenzyme et leur activation nécessite le clivage du zymogène avant l'acide aminé impliqué dans le site actif (Lowe *et al.*, 1995).

La dégradation des protéines pour le protéasome 20s induit non pas la libération de substrats partiellement hydrolysés mais plutôt des peptides de 6 à 9 acides aminés. Le protéasome renfermerait plusieurs sites actifs permettant de multiplier les sites de coupure du substrat. Le mécanisme d'action du protéasome serait favorisé par la constriction d'anneaux  $\alpha$  qui limiterait le relargage de la chaîne peptidique en cours de dégradation (Goldberg *et al.*, 1997a et b). L'action du protéasome conduit à la dégradation complète des protéines molécule par molécule.

- Activités enzymatiques

Le protéasome 20s ou encore complexe protéolytique multicatalytique possède 5 activités différentes (Orlowski *et al.*, 1993) quand il est testé sur des peptides :

- Une activité de type trypsine coupant après les acides aminés basiques



**Figure 2:** Structure générale du protéasome 26S, observée en microscopie électronique (en haut), et fonctions plausibles des différentes parties de la molécule (en bas). L'image du haut est issue du calcul de la moyenne des centres de masse d'environ 3000 molécules. Elle montre une partie centrale, cylindrique constituée du protéasome 20S, entourée de deux complexes 19S orientés tête-bêche (d'après Koster *et al.*, 1995 et [http://www.biochem.mpg.de/baumeister/image/detection\\_result\\_26s.html](http://www.biochem.mpg.de/baumeister/image/detection_result_26s.html)).

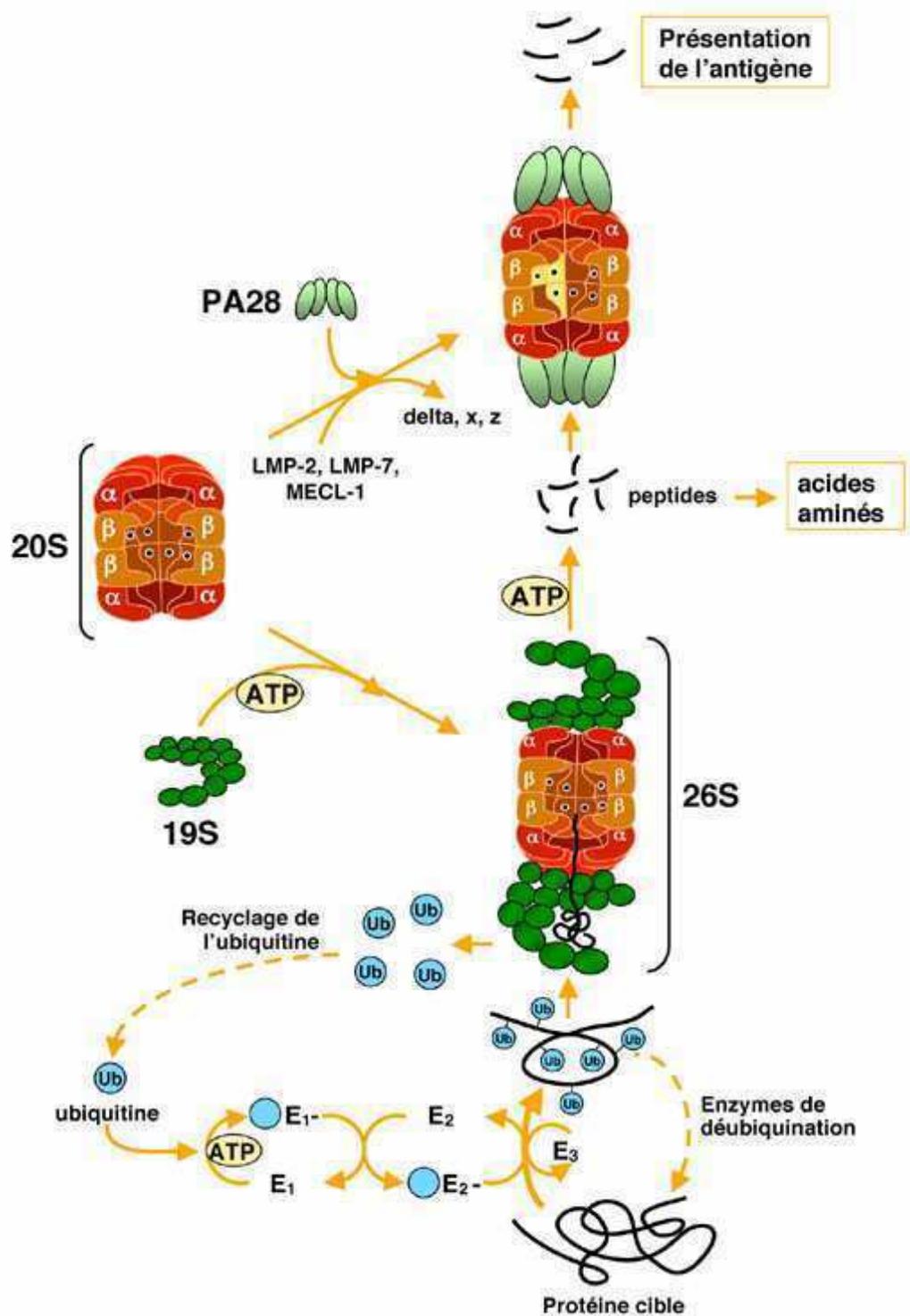
- Une activité de type chymotrypsine coupant après les acides aminés aromatiques
- Une activité peptidylglutamyl peptide hydrolase coupant les acides aminés Glutamine ou Asparagine
- Une activité coupant après les acides aminés à chaîne latérale ramifiée (isoleucine)
- Une activité coupant après les petits acides aminés neutres (Glycine, Valine)

De plus, il semblerait que la coopération entre sous unités actives et inactives soit nécessaire à l'expression d'une activité enzymatique.

Par contre testé sur des protéines, il montre une spécificité très large et peut hydrolyser presque toutes les liaisons peptidiques quels que soient les acides aminés impliqués dans ces liaisons (Rivett 1993 a et b).

- **Protéasome 26s**

En microscopie électronique, le protéasome 26s apparaît formé d'une partie centrale cylindrique, correspondant au protéasome 20s, entourée de deux complexes orientés en direction opposée et représentant chacun le complexe 19s, un des activateurs du protéasome 20s (Figure N°2). Sa masse moléculaire est de 2000kDa et son coefficient de sédimentation est de 26s ou 30s selon la méthode de mesure (Yoshimura *et al.*, 1993). Le complexe 19s s'associe au protéasome 20s par l'intermédiaire des sous unités  $\alpha$ . Cette association est ATP dépendante. L'interaction des deux complexes serait aussi facilité par la présence de motifs KEKE présents au niveau des sous unités  $\alpha$  et du complexe 19s (Dubiel *et al.*, 1995). Le protéasome 20s constitue le noyau catalytique du protéasome 26s, le complexe 19s apparaissant comme un activateur des activités protéolytiques du protéasome 20s. Le complexe 19s permet également de dégrader par un processus dépendant de l'ATP les protéines marquées par l'ubiquitine.



**Figure 3 :** Principales fonctions biologiques des protéasomes 20s et 26s (Mansfield et Olivier, 2002)

- **Fonctions biologiques des protéasomes 20s et 26s**

- Protéolyse dépendante de l'ubiquitine et de l'ATP

Le protéasome 26s est impliqué dans la dégradation des protéines marquées à l'ubiquitine. Il serait responsable de la dégradation de la plupart des protéines à courte demi vie et certaines à demi vie longue dont la localisation peut être cytosolique, nucléaire ou membranaire (Goldberg *et al.*, 1997a et b) (Figure N°3).

Parmi ces protéines on retrouve :

- Des enzymes du métabolisme intermédiaire
- Des protéines du transport
- Des récepteurs membranaires
- Des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B

- Rôle dans le système immunitaire

Sous l'action d'un stimulus par l'interféron  $\gamma$ , des mutations génétiques surviennent. Cela a pour effet d'augmenter les activités de coupure après les acides aminés basiques et hydrophobes (Rock *et al.*, 1994). Il permettrait ainsi la synthèse de peptides antigéniques de 7 à 9 acides aminés avec des acides aminés basiques ou hydrophobes en C-terminal.

Donc le protéasome serait impliqué dans la présentation des peptides antigéniques se liant fortement aux molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité de type I (Saito *et al.*, 1993).

- Dégradation des protéines oxydées ou anormales

Les protéines oxydées sont dégradées suivant un processus indépendant de l'ATP et de l'ubiquitine. La dénaturation des protéines oxydées démasquerait les sites hydrophobes. Les protéines oxydées présentent donc une plus grande hydrophobicité de surface ce qui constituerait le signal de dégradation sélective pour le protéasome 20s (Pacifi *et al.*, 1993 ; Giulivi *et al.*, 1994). La dégradation des protéines oxydées représente une part importante dans les mécanismes de protection antioxydante et contre les radicaux libres. Elle permet

aussi l'élimination de protéines anormales ou agrégées qui peuvent être toxiques pour la cellule.

- **Formation de complexes**

L'association du protéasome 20s avec d'autres complexes comme le 11s (activateur de toutes les activités protéolytiques du protéasome 20s) ou le 19s doit permettre à la cellule une meilleure adaptabilité aux variations des conditions physiologiques. Des homocomplexes (20s + 2x11s ou 20s + 2x19s) ainsi que des hétérocomplexes (20s+19s+11s) coexistent dans les cellules ou les fluides des organismes supérieurs.

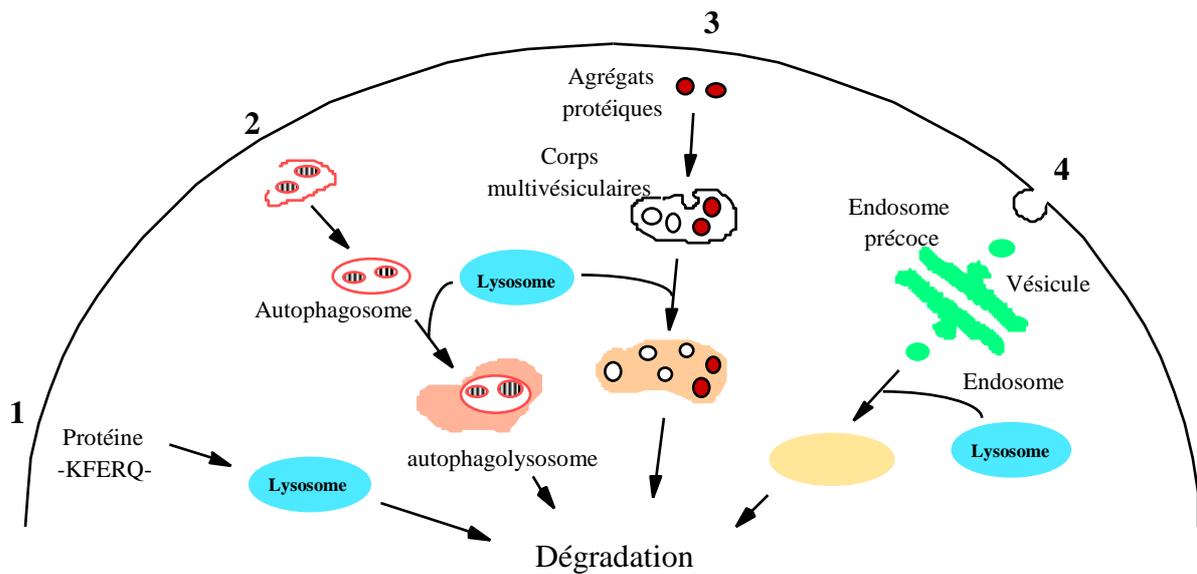
#### ***1.1.2.5 Les cystéine protéinases***

- **Lysosomales, les cathepsines**

Le lysosome est un organe cellulaire dont le pH est maintenu au voisinage de 5.0 grâce à des pompes à protons membranaires. Il possède une panoplie d'environ 40 hydrolases toutes actives à des pH acides et lui permettant de dégrader tous les constituants cellulaires (protéines, glucides, lipides, acides nucléiques). Les fonctions protéolytiques du lysosome sont assurées par des exopeptidases et des endopeptidases. Les endopeptidases sont regroupées sous l'appellation générique de « cathepsines ». Ce terme définit les protéinases situées dans le lysosome et la plupart du temps actives à pH acide. Outre les cathepsines D et E de la famille des aspartylprotéinases ou encore la cathepsine G de la famille des sérine protéinases, on retrouve les cathepsines B, F, K, H, L, S, des cystéine protéinases de masse moléculaire comprise entre 20 et 50 kDa avec un pH optimum avoisinant 6.0 (Sentendreu *et al.*, 2002).

- **Structure**

Les cathepsines se composent généralement d'une chaîne légère et d'une chaîne lourde liées entre elles par un pont dissulfure. La structure primaire se résume à deux domaines. Un domaine est composé d'hélice  $\alpha$  et l'autre domaine est composé de feuillets  $\beta$



**Figure 4** : Schéma des principales voies de dégradation lysosomales.

**1** : Le ciblage sélectif : certaines protéines ayant une séquence -Lys-Phe-Glu-Arg-Gln- (KFERQ) sont ciblées spécifiquement vers le lysosome.

**2** : La macroautophagie : une portion du cytoplasme est entourée par une double membrane correspondant à une projection du reticulum endoplasmique pour former une vésicule fermée, l'autophagosome, qui fusionne avec le lysosome pour former l'autophagolysosome.

**3** : La microautophagie : des corps multivésiculaires d'origine endosomique s'invaginent pour internaliser des agrégats protéiques puis fusionnent avec les lysosomes.

**4** : L'hétérophagie : des particules extracellulaires sont internalisées dans des vésicules formées par invagination de la membrane plasmique (Adapté de Carillo et al., 1995)

(Mc Grath, 1999). Le site actif se trouve à l'interface des deux domaines. La cystéine Cys<sub>25</sub> et l'histidine His<sub>159</sub>, les acides aminés catalytiques se trouvent de chaque côté du site actif. La cystéine placée en N-terminal de l'hélice  $\alpha$  forme une liaison ionique avec l'histidine placée au niveau du feuillet  $\beta$  (Brocklehurst, 1994). Les cathepsines partagent des structures similaires, elles se distinguent néanmoins d'un point de vue immunologique.

#### ○ Mécanisme d'action

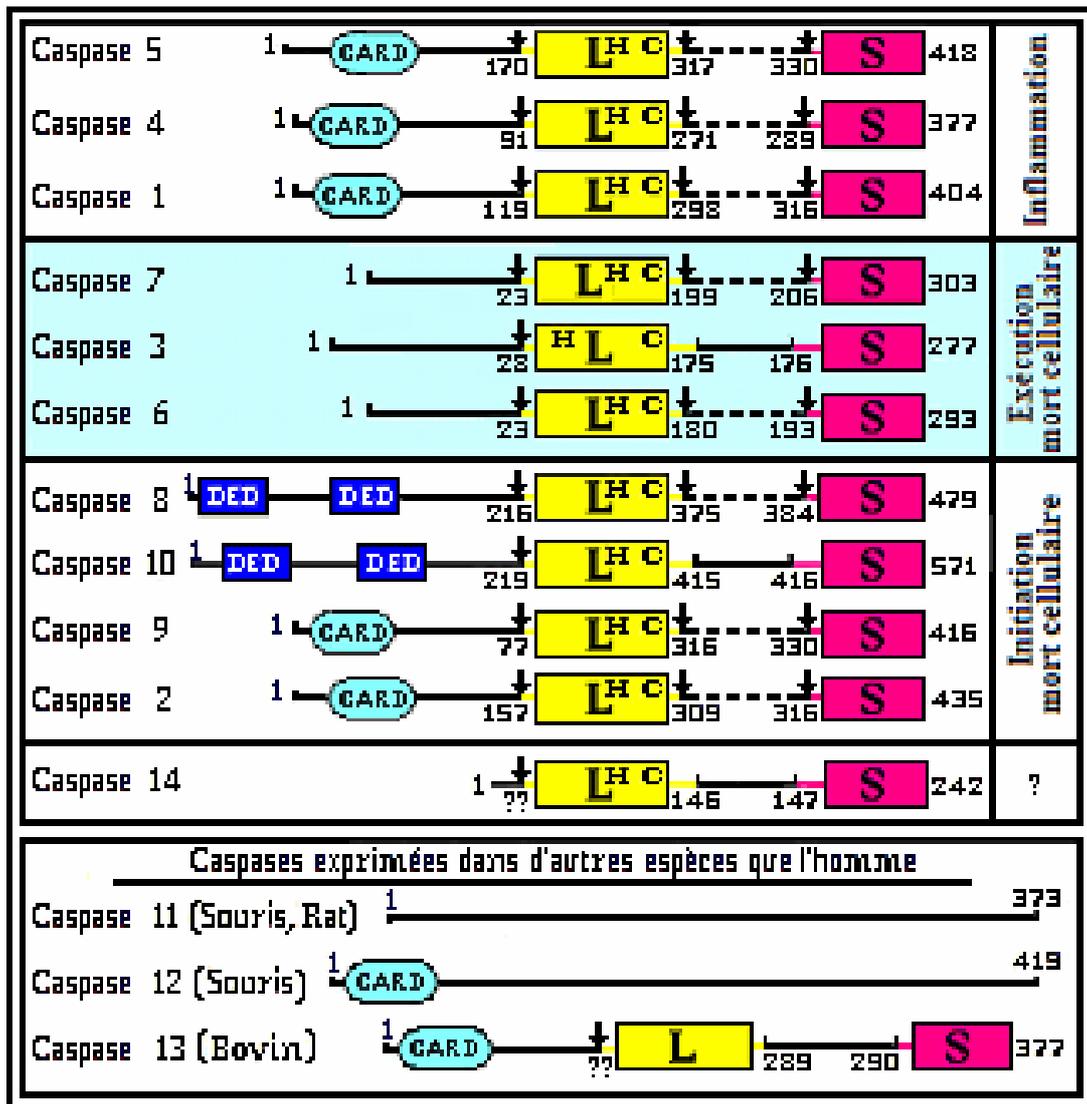
*In vivo*, dans le lysosome, les protéines sont complètement dégradées en peptides et en acides aminés. Cette dégradation lysosomale s'articule autour de quatre voies (Fig. N°4) :

- Le ciblage collectif a lieu si le substrat contient les séquences L-F-E-R ou apparentées
- La macro autophagie où une partie du cytoplasme est internalisée pour former un autophagosome
- La micro autophagie où des corps multivésiculaires contenant des agrégats protéiques fusionnent avec les vésicules lysosomales.
- L'hétérophagie qui correspond à la dégradation des protéines ayant pénétré dans la cellule par phagocytose, endocytose ou pinocytose et internalisés au niveau de la membrane plasmique.

#### ○ Fonctions physiologiques

De façon générale, les cathepsines sont supposées assurer la dégradation des protéines dans le lysosome de manière non sélective (Chapman *et al.*, 1997). A l'heure actuelle, il est de plus en plus acquis qu'elles contribueraient de façon prépondérante au bon fonctionnement de nombreux processus biologiques. Les cathepsines ubiquitaires seraient impliquées dans plusieurs événements cellulaires majeurs. Ainsi les cathepsines B,H,L participeraient au développement de cancers soit en dégradant la matrice extracellulaire ou de manière indirecte en activant d'autres peptidases (Sloane, 1990 ; Kos et Lah, 1998 ; Turk *et al.*, 2001). Les cathepsines seraient un acteur principal dans l'apoptose (Pennachio *et al.*, 1998) ou secondaire en activant les caspases (Ishisaka *et al.*, 1998).

Les cathepsines S, L et probablement les cathepsines B, D participeraient au processus de présentation des antigènes (Chapman *et al.*, 1997 ; Turk *et al.*, 2001). A contrario, une mauvaise régulation ou des conditions anormales, peuvent conduire à l'apparition de pathologies comme les cancers.



**Figure 5** : Structure schématique des caspases humaines et des caspases exprimées dans d'autres espèces (Herrera Mendez, 2006).

Les caspases humaines ont été groupées sur la base de leur similarité de séquence. Les homologies de séquence divisent les caspases 1 à 10 en trois sous-familles en accord avec leur fonction physiologique et de leur implication dans les processus inflammatoires, dans la phase d'initiation ou d'exécution de l'apoptose. La caspase 14 se distingue des autres par le fait qu'elle n'est exprimée que dans l'épiderme et qu'elle est clivée, lors de son activation, à des sites ne contenant pas de résidu aspartate. Les caspases actives sont composées d'une grande sous-unité en jaune (L pur large) et d'une petite sous-unité en rouge (S pour small). L'activation de ces caspases passe par un certain nombre de clivages (flèches) qui vont éliminer les extrémités N-terminales et le fragment associant la petite et la grande sous-unité sauf dans le cas des caspases 3, 10, 14 et 13. Les régions N-terminales de plusieurs caspases contiennent divers domaines importants pour les interactions protéine-protéine lors de leur activation (Domaines DED : Death Effector Domain et CARD : Caspase Recruitment Domain). La numérotation correspond à celles des acides aminés de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale. Les lettres C et H dans la grande sous-unité indiquent la position de la cystéine et de l'histidine du site actif.

- **Proteases apoptogènes, les caspases**

- Nomenclature

Les caspases sont des protéases à cystéine qui possèdent une spécificité stricte de clivage de leurs substrats après un résidu aspartate. On retrouve cette spécificité de clivage uniquement chez une sérine protéase présente dans les lymphocytes T, le granzyme B.

Les caspases sont les effecteurs de la mort cellulaire ordonnée ou apoptose (Labouesse, 1994 ; Horwitz, 1999). Le terme générique de Caspases est un acronyme où le C représente la cystéine du centre actif et aspase définit la spécificité de clivage des substrats de cette famille. A ce jour cette famille regroupe au moins 14 caspases différentes (Figure N°5). L'ICE (Interleukine-1 $\beta$  Converting Enzyme), la première caspase caractérisée a été appelée caspase 1. On classe ainsi les caspases selon l'antériorité de leur clonage ADN<sub>c</sub>.

- Structure

Toutes les caspases ont une structure très conservée comprenant un prodomaine N-terminal de taille variable, un domaine qui deviendra après clivage la grande sous unité (17-21 kDa, qui porte le centre actif) et un domaine qui deviendra après clivage la petite sous unité. Les prodomaines sont variables tant au niveau de leur taille que de leur séquence. Ainsi les caspases 3,6 et 7 (les caspases effectrices) ont un petit prodomaine alors que les caspases 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12,13 possèdent un grand prodomaine. Les prodomaines semblent jouer un rôle primordial dans les interactions protéines-protéines. La présence de structures permettant la liaison des caspases, les domaines effecteurs de mort cellulaire (Dead Effector Domains ou DEDs) au niveau des prodomaines des caspases 8 et 10, abondent en ce sens. Par ailleurs, les caspases 1, 2,4 et 9 possèdent un domaine de recrutement des caspases (CARD pour CAspase Recruitement Domain) (Hoffmann *et al.*, 1997). Ces CARD jouent un rôle dans l'interaction entre caspases ainsi qu'avec une grande variété de molécules adaptatrices ou régulatrices.

- Mécanisme d'activation

La présence de résidus aspartate sur ces protéases est une donnée structurale très importante. En effet, la conversion de la caspase à l'état de zymogène en une enzyme mature nécessite au moins deux clivages au niveau de la liaison Asp-X. Ces clivages se succèdent de la manière suivante :

Il y a coupure entre la grande et la petite sous unité ce qui induit la libération de la petite sous unité du reste de la molécule, puis s'ensuit la libération du prodomaine. La caspase

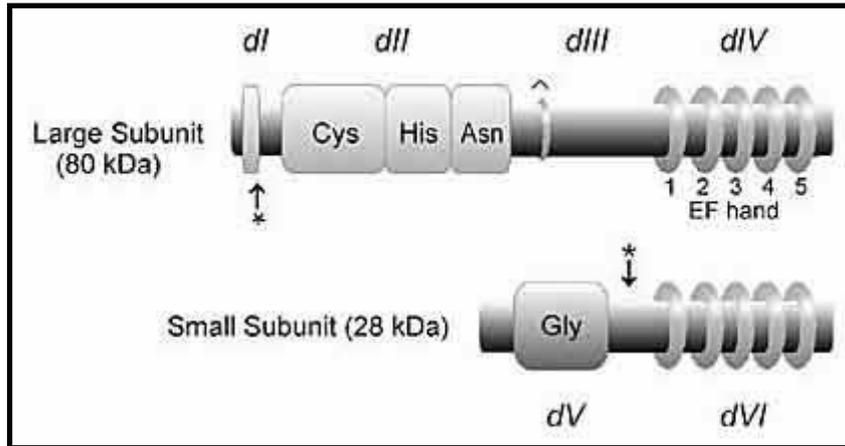
va alors pouvoir s'assembler sous une forme active, composée de deux grandes et de deux petites sous unités. Autrement dit, deux molécules d'enzymes s'associent pour former un dimère possédant deux sites actifs en position tête bêche. Les caspases vont pouvoir s'autoactiver et/ou être activées par d'autres caspases. Cette observation introduit la notion de cascade d'activation (Fraser and Evan, 1996). Ainsi une fois les caspases initiateuses activées au niveau de complexes particuliers reconnus grâce aux domaines CARD ou DED présents dans la région N-terminale de ces dernières, elles vont pouvoir cliver d'autres caspases (en particulier les effectrices) encore sous une forme proenzymatique inactive. Ce processus permet la régulation et l'amplification du signal.

- L'apoptose, processus d'expression des caspases

Nous n'entendons pas ici décrire l'apoptose en ses moindres détails mais juste apporter quelques notions sur ce mécanisme qui contribue au développement cellulaire ou encore au maintien de l'homéostasie.

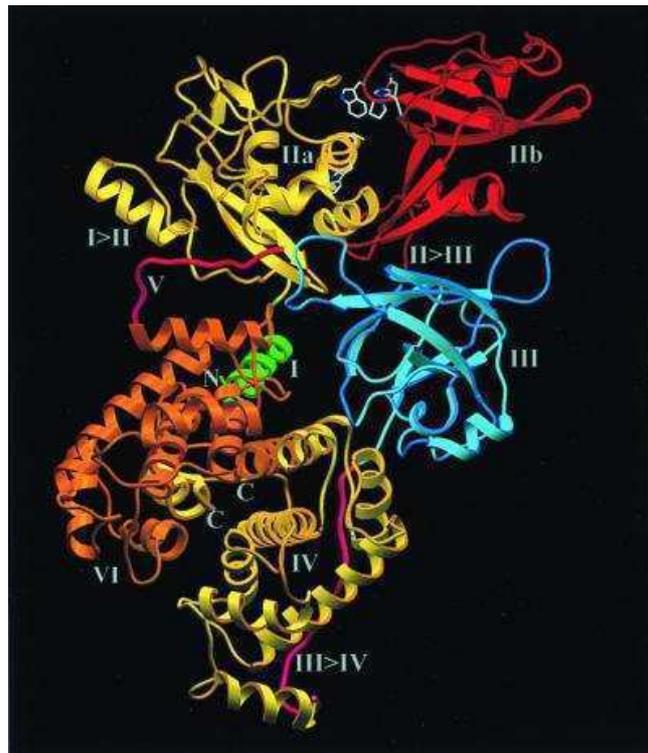
En réponse à diverses agressions physiques, infectieuses, chimiques ou métaboliques, l'organisme peut activer un processus de mort cellulaire ordonné appelé apoptose. A l'inverse, il existe un autre processus de mort cellulaire appelé nécrose qui est un mécanisme passif, non spécifique ne respectant pas une évolution précise. Le stimulus déclenchant le processus d'apoptose peut survenir par voie extrinsèque via des récepteurs de mort ou par voie intrinsèque lorsque les conditions de survie de la cellule deviennent défavorables.

Au niveau de la cellule apoptotique, nous observons un certain nombre d'altérations morphologiques. Tout d'abord les cellules en apoptose vont s'isoler des autres cellules. L'un des points morphologiques caractéristiques de l'apoptose est l'importante condensation du cytoplasme accompagnée de la perte de l'eau intracellulaire. Il en résulte une diminution significative du volume cellulaire. Dans ce processus le noyau n'est pas épargné. On observe une condensation de la chromatine. La membrane plasmique va bourgeonner et conduire à la formation de corps apoptotiques renfermant une partie du cytoplasme de la cellule. L'externalisation des phosphatidylsérine, signal de la mort cellulaire programmée de la cellule, favorise la reconnaissance des corps apoptotiques par les phagocytes. Cette altération de la perméabilité membranaire est l'une des deux modifications moléculaires survenant au cours de l'apoptose. L'autre modification caractéristique d'un état apoptotique est la fragmentation de l'ADN en fragments réguliers de 180pb (Wyllie, 1980). Ce nombre de



**Figure N°6:** Représentation schématique d'une calpaïne ubiquitaire. La grande sous-unité de 80kDa est représentée avec ses quatre domaines et notamment le domaine II et ses trois résidus majeurs (Cys pour le sous domaine IIa et His et Asn pour le sous domaine IIb). La petite sous-unité comporte deux domaines (dV et dVI). Le domaine V étant riche en résidus Gly alors que le domaine VI, un domaine "calmodulin-like" est similaire au domaine IV de la grande sous-unité.

Source: (<http://www.sbs.auckland.ac.nz/research/molgende/evans/index.htm>)



**Figure N°7:** Structure tridimensionnelle de la m-calpaïne en absence de calcium (Strobl *et al.*, 2000).

paires de bases correspond à la longueur de l'ADN enroulé autour des octamères d'histone dans un nucléosome (Gavrieli *et al.*, 1992 ; Wyllie *et al.*, 1998).

- **Protéases calcium dépendantes, les calpaïnes**

Jusqu'à récemment les calpaïnes étaient répertoriées dans la famille des cystéines protéinases calcium dépendantes. Les plus représentées des calpaïnes sont les  $\mu$ - et m-calpaïnes ou calpaïnes 1 et 2. Ce sont des calpaïnes conventionnelles ou encore ubiquitaires. A ces calpaïnes, il faut rajouter la  $\mu/m$  calpaïne, une isoforme spécifique du poulet dont les exigences en calcium sont intermédiaires à celles de la  $\mu$  et de la m-calpaïne (Sorimachi *et al.*, 1997).

Avec l'avènement de la génomique, les calpaïnes (EC 3.4.22.17) se rangent aujourd'hui dans la superfamille des protéinases multidomaines. Elles sont impliquées dans divers évènements cellulaires régulés par le calcium (Goll *et al.*, 1992 ; Melloni *et al.*, 1992). Les calpaïnes ubiquitaires ou conventionnelles sont exprimées dans tout l'organisme ce qui suggère une participation dans des fonctions cellulaires diverses et vitales. A l'inverse certaines calpaïnes dites spécifiques ont des actions plus ciblées en réponse aux exigences du tissu dans lequel elles sont exprimées.

Depuis quelques années les calpaïnes focalisent l'attention des chercheurs pour ses propriétés régulatrices. En outre, elles semblent hydrolyser les liaisons entre domaines d'un substrat provoquant la libération de domaines aux fonctions différentes. Les calpaïnes changeraient les propriétés des protéines cibles par hydrolyse. C'est à ce titre qu'elles sont souvent considérées comme des agents bio-modulateurs.

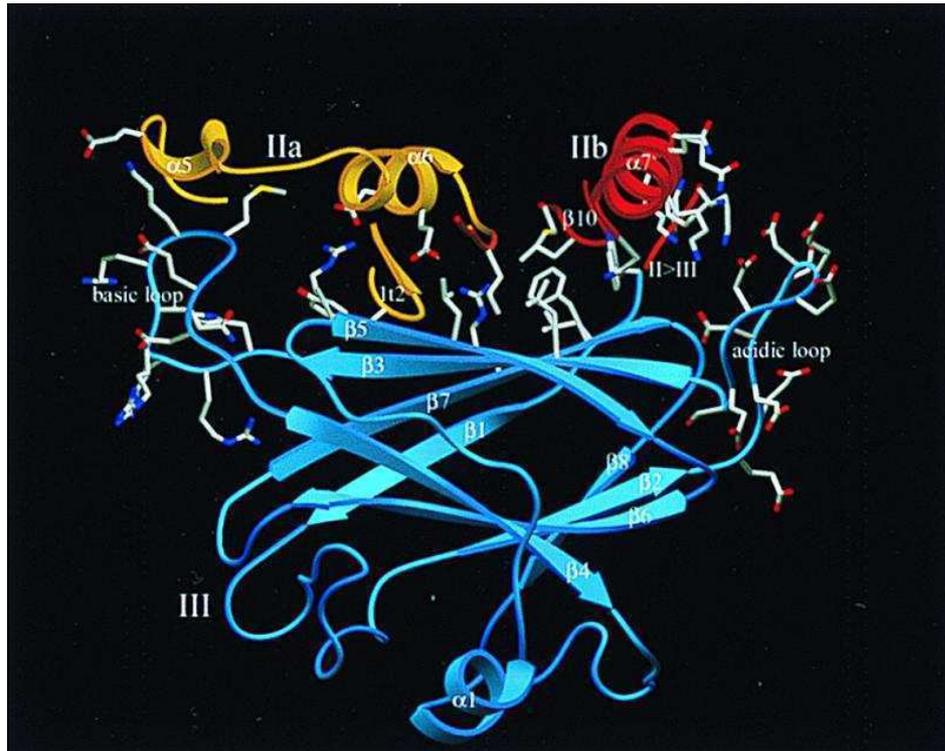
- Les calpaïnes conventionnelles

- *Structure*

La  $\mu$  et m-calpaïne ainsi que la  $\mu/m$  calpaïne sont des hétérodimères de 110kDa environ. Elles se composent d'une grande sous unité de 80kDa dite catalytique et d'une petite sous unité régulatrice de 30kDa (Figure N°6). La petite sous unité est commune aux trois formes alors que les grandes sous unités diffèrent conservant néanmoins 61% d'homologie.

- ❖ La grande sous unité

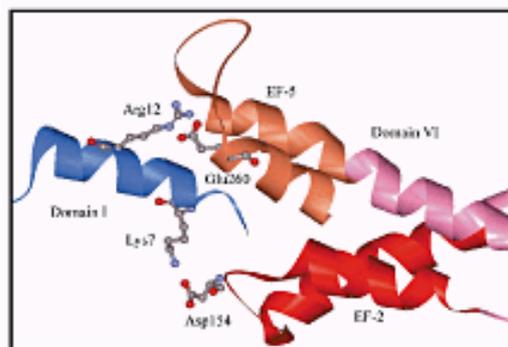
La grande sous unité se compose de 4 domaines bien distincts. Si, les premières études attribuaient une importance fondamentale aux domaines II et IV, on est en mesure de



**Figure N°8:** Structure schématique 3D des domaines II et III de la m-calpaïne en absence de calcium. L'interaction entre les deux domaines se fait par l'intermédiaire d'une boucle acide (à droite) et d'une boucle basique (à gauche). Au centre, on peut observer aussi une association polaire entre le sous domaine IIa et le domaine III ainsi qu'une association de nature hydrophobe entre le sous domaine IIb et le domaine III (Strobl *et al.*, 2000).

Source:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=15374&action=stream&blobtype=jpg&blobname=pq0205007004.jpg>



**Figure N°9:** Structure schématique 3D des domaines I et VI de la m-calpaïne humaine en absence de calcium. Les résidus Lys7 et Arg12 (en bleu) du domaine 1 interagissent respectivement avec les résidus Asp154 dans la boucle du motif EF-hand 2 (rouge) et Glu260 de l' $\alpha$ -hélice du motif EF-hand 5 (orange) du domaine VI de la petite sous-unité (Nakagawa *et al.*, 2001).

Source: <http://jb.bcasj.or.jp/130-5/5faaxhf2.htm>

dire aujourd'hui avec l'avènement de la structure tridimensionnelle de la m-calpaïne (Figure N°7) que les deux autres domaines ont une implication certaine dans le mécanisme d'activation de l'enzyme.

Le domaine I est en réalité une hélice  $\alpha$ . Il serait important pour la stabilité et l'activation des calpaïnes ainsi que pour la liaison avec la petite sous unité.

Le domaine II est partagé en deux sous domaines IIa et IIb chacun contenant des résidus catalytiques (Cys105 pour le sous domaine IIa et His262 et Asn286 pour le sous domaine IIb). L'inactivité de l'enzyme en absence de calcium est due à un phénomène structural et pas à la présence d'un propeptide comme c'est le cas des cathepsines (Sorimachi et Suzuki, 2001). Ce phénomène structural se caractérise par une association entre l'hélice  $\alpha$  N-terminale et le domaine II d'une part et d'autre part des interactions polaires et hydrophobes entre le domaine II et le domaine III d'autre part. Cette conformation induit un site catalytique ouvert donc inactif. Le site actif a aussi la particularité de fixer un atome de calcium sur chacun de ses sous domaines par l'intermédiaire de boucles acides (Moldoveanu *et al.*, 2002).

Le domaine III présente de nombreuses similitudes avec les domaines C2 des protéines régulatrices de calcium (Rizo et Sudhof, 1998). Il se compose de deux paires de 4 feuillets  $\beta$  antiparallèles, une structure analogue aux domaines de type C2 bien qu'on ne retrouve pas d'homologie au niveau de la séquence primaire. Les 5<sup>ème</sup>, 6<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> feuillets  $\beta$  de même que la boucle entre le 1<sup>er</sup> et le 2<sup>ème</sup> feuillet  $\beta$  sont relativement bien conservés au sein de la superfamille des calpaïnes. Cette conservation au cours de l'évolution tend à montrer l'importance des feuillets dans la fonction du domaine III. Comme annoncé auparavant, le domaine III empêche la formation du site catalytique via des interactions électrostatiques avec les sous domaines IIa et IIb (Figure N°8).

Sorimachi et Suzuki (2001) supposent que le domaine III assurerait la translocation de la calpaïne vers la membrane en présence de calcium. Cette hypothèse est renforcée par les résultats de Tompa et de ses collaborateurs (2001) qui montrent une fixation accrue de calcium en présence de phospholipides. Le domaine III de par sa position et la caractérisation de ses fonctions apparaît comme le centre névralgique de l'enzyme.

Le domaine IV est similaire au domaine VI de la petite sous unité. Ils possèdent des domaines de liaison avec le calcium. Leur structure correspond à l'enchaînement d'hélice  $\alpha$  associé à un ligand caractéristique du calcium, le motif EF-Hand. Ces motifs ont une structure primaire différente des motifs EF-Hand de la calmoduline. Cette différence structurale font que les calpaïnes forment une famille unique regroupée sous le nom de PEF (Penta EF-Hand).

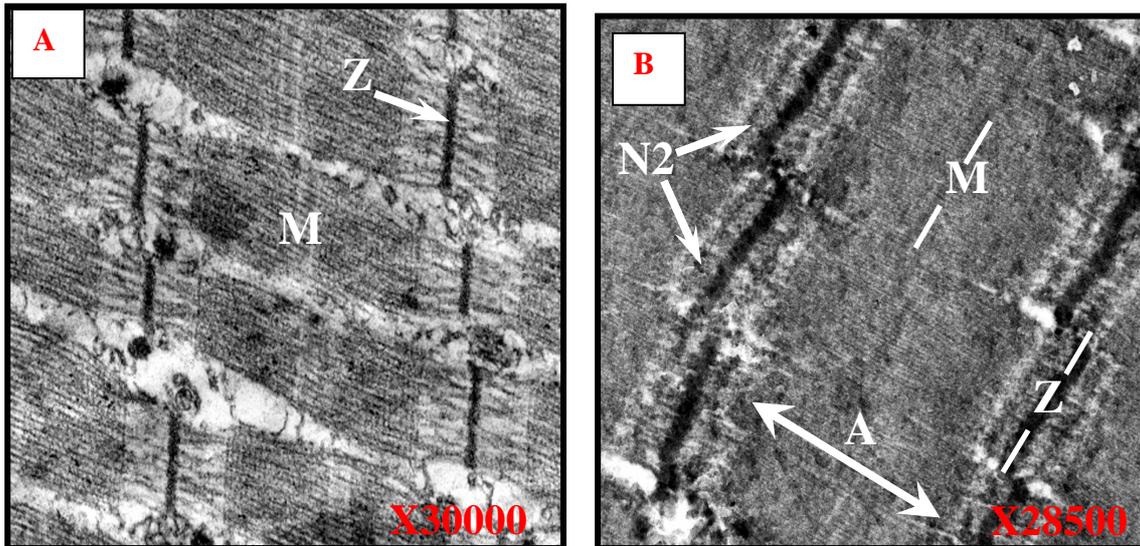
Le nombre de ces motifs EF-Hand n'a eu de cesse d'évoluer. Il y a 20 ans environ 4 motifs avaient été identifiés (Emori *et al.*, 1986a, b). En 1995, Theopold et ses collaborateurs font état d'un autre motif dans la zone N-terminale du motif EF 2 ce qui porte à 5 le nombre de motifs pouvant lier le calcium. Auparavant, en 1991 Andresen et ses collaborateurs rapportaient également l'existence d'un motif de liaison avec le calcium entre le domaine II et le domaine III. Les structures tridimensionnelles de la petite sous unité (Lin *et al.*, 1997 ; Blanchard *et al.*, 1997) et de la m-calpaïne (Strobl *et al.*, 2000) montrent un appariement des motifs EF-Hand (EF1 et EF2 en conformation ouverte, EF3 et EF4 en conformation fermée). Le motif EF5 quant à lui ne fixerait pas de calcium mais serait capable de former avec un autre motif EF5 des homodimères aussi bien pour la grande que pour la petite sous unité (Kretsinger *et al.*, 1997). Il participerait également à l'association des deux sous unités 80 et 30 kDa (Goll *et al.*, 2003).

La distance des domaines IV et VI par rapport au site actif associé aux faibles changements structuraux indirects créés par la fixation du calcium prouvent que les domaines IV et VI ne sont pas les principaux instigateurs de l'activation des calpaïnes.

#### ❖ La petite sous unité

Elle a une masse moléculaire de 30 kDa et est commune aux trois formes classiques de calpaïnes  $\mu$ , m et  $\mu/m$  (Kawasaki *et al.*, 1986). La petite sous unité se compose de deux domaines qui sont les domaines V et VI. Dans le cas de la m-calpaïne, en absence de calcium, le domaine V n'est pas visible en cristallographie en raison de sa structure très flexible qui n'est pas fixée aux autres domaines (Strobl *et al.*, 2000). Par ailleurs, un site d'interaction avec les lipides a été identifié dans la région C-terminale (Crawford *et al.*, 1990). Il s'agit d'une séquence polyglycine adjointe d'une région dont la séquence est TAMRILGG. Cette découverte souligne l'importance de la petite sous unité dans les interactions avec la membrane (Imajoh *et al.*, 1986). Le domaine V de la m-calpaïne pénétrerait les membranes par le biais d'une conformation en  $\alpha$ -hélice et sous l'effet d'interactions électrostatiques. Ce processus est favorisé par la présence d'un résidu Arginine situé dans la partie polaire de l' $\alpha$ -hélice (Brandenburg *et al.*, 2002).

Le domaine VI est aussi appelé domaine IV' en raison de nombreuses similitudes qu'il a avec le domaine IV de la grande sous unité. La structure tridimensionnelle de la m-calpaïne en absence de calcium révèle que le domaine I est en contact avec les domaines EF Hand 1 et 5 du domaine VI (Nakagawa *et al.*, 2001) (Figure N°9). La dissociation des deux sous unités pourrait avoir une influence sur l'activation de l'enzyme.



---

**Figure N°10** : Localisation cellulaire de la  $\mu$ -calpaïne. Les fibres musculaires sont bien visibles avec leur différentes structures (A). La  $\mu$ -calpaïne se localise au niveau des lignes N2 et à proximité de la strie Z (B). (Raynaud et al., 2005)

### ➤ Localisation

Dans le tissu musculaire, les calpaïnes se localisent uniquement dans le cytoplasme (Goll *et al.*, 1990 ; Kummamoto *et al.*, 1992) sous forme liée. Les calpaïnes seraient localisées au niveau de la bande I (Yoshimura *et al.*, 1986) ou encore au voisinage de la strie Z (Dayton et Schollmeyer, 1981 ; Ishiura *et al.*, 1980 ; Goll *et al.*, 1992). A ce jour la localisation des calpaïnes demeure controversée. C'est en ce sens que notre groupe s'intéresse à la question de la localisation des calpaïnes dans le muscle. Nos premiers résultats concluent à une localisation de la  $\mu$ -calpaïne principalement au niveau des lignes N1 et N2 (Fernandez, 2000 ; Raynaud *et al.*, 2005) (Figure N°10), deux structures connues pour leur capacité à fixer du calcium (Yarom and Meiri, 1971 ; Vignon *et al.*, 1989 ; Tatsumi *et al.*, 2001 ; Coulis *et al.*, 2004).

### ➤ Mécanisme d'activation

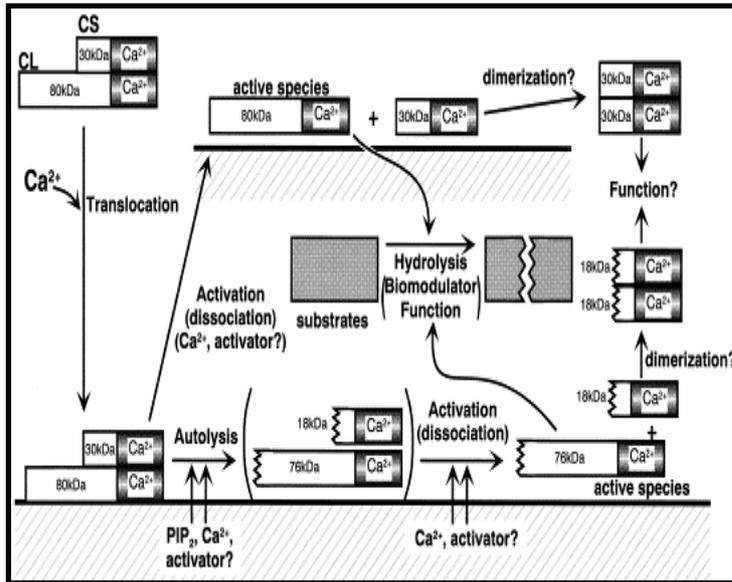
L'activation *in vitro* des calpaïnes nécessitent des concentrations bien supérieures aux concentrations du calcium intracellulaire. Cette différence souligne l'intervention de différents facteurs susceptibles de moduler l'affinité des calpaïnes pour le calcium. Cet aspect a intrigué et a entraîné l'émergence de nombreuses hypothèses quant à l'activation des calpaïnes.

L'autolyse comme mécanisme d'activation a souvent été avancé par bon nombre de chercheurs. Ainsi incubées avec du calcium, les  $\mu$  et m-calpaïnes s'autolysent rapidement (Suzuki *et al.*, 1981 ; Hathaway *et al.*, 1982 ; Edmunds *et al.*, 1991) ce qui est peu commun pour une enzyme protéolytique. L'autolyse permettra d'abaisser la concentration en calcium nécessaire à leur activation. En outre la spécificité de l'enzyme ne serait pas affectée (Edmunds *et al.*, 1991 ; Goll *et al.*, 1992). L'autolyse diminue aussi la masse des sous unités. La grande sous unité passe de 80 kDa à 76 kDa en passant par une étape intermédiaire de 78 kDa (Inomata *et al.*, 1985 ; Zimmerman *et al.*, 1991 ; Fernandez, 2000). La petite sous unité passe de 30 kDa à 18 kDa (Coolican *et al.*, 1986). L'analyse des séquences des calpaïnes durant la phase d'autolyse montre que le clivage survient dans la partie N-terminale des sous unités. Donc l'autolyse combinée ou non en N-terminale des deux sous unités permettrait d'activer l'enzyme. L'hétérodimère 80/30 serait une procalpaïne et sa forme active serait le complexe 76/18.

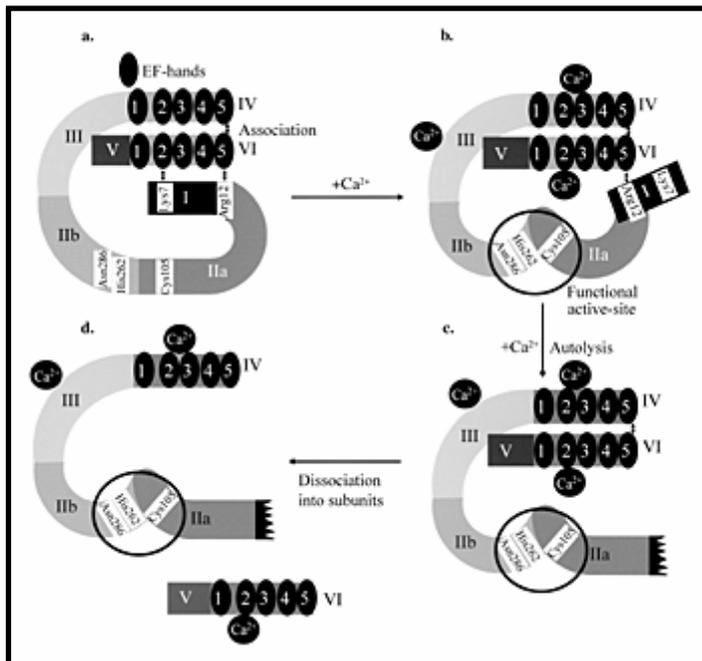
Certains auteurs soulignent même une éventuelle implication des membranes dans le processus d'activation des calpaïnes (Mellgren, 1987 ; Suzuki *et al.*, 1987). En effet les phospholipides contribuent à réduire la concentration en calcium nécessaire à l'activation des calpaïnes ce qui pourrait expliquer tout au moins, en partie, comment les calpaïnes peuvent devenir actives *in vivo* dans des conditions physiologiques. Les calpaïnes se fixeraient à la membrane par la région N-terminale de la petite sous unité. La fixation membranaire, par l'intermédiaire probable d'un phosphatidyl-inositol-diphosphate (PIP2) diminuerait suffisamment la concentration calcique nécessaire pour induire l'autolyse dans des conditions physiologiques rencontrées *in vivo*. De fait l'autolyse permettrait de rompre la liaison aux membranes, libérant ainsi les calpaïnes dans le cytoplasme. Cependant le domaine III est aussi capable de fixer les lipides (Tompa *et al.*, 2001) et il se pourrait que les calpaïnes restent fixées aux membranes. Plusieurs dégradations membranaires pourraient être attribuées aux calpaïnes (Pontremoli *et al.*, 1985 ; Croall *et al.*, 1986 ; Inomata *et al.*, 1989 ; Kuboki *et al.*, 1990 ; Kawasaki and Kawashima *et al.*, 1996).

Les hypothèses d'autolyse et d'activation au niveau des membranes sont intimement liées. Elles plaident en faveur d'une translocation des calpaïnes vers les membranes rendue possible grâce à une région polyglycine de la petite sous unité capable d'interagir avec les phospholipides (Imajoh *et al.*, 1986). A cet endroit l'activation PIP2 est telle qu'elle permet l'autolyse en N-terminale de la petite sous unité. Il s'ensuit alors une libération des protéinases actives dans le cytosol. Toutefois les concentrations calciques nécessaires à l'autolyse sont à peu près équivalentes à celles requises pour la protéolyse. La concomitance des deux événements a poussé les chercheurs à reconsidérer le rôle de l'autolyse dans le mécanisme d'activation.

Dès lors une hypothèse consistant à montrer que l'activation des calpaïnes était indépendante de l'autolyse est apparue. En effet les calpaïnes seraient capables d'hydrolyser la caséine dans une certaine gamme de concentration sans pour autant s'autolyser (Cong *et al.*, 1989 ; Cottin *et al.*, 2001). Des informations apportées au niveau structural abondent en ce sens. L'autolyse des calpaïnes ne permet pas d'obtenir la conformation ouverte du site actif. En effet l'E64, un inhibiteur irréversible ne se fixe pas sur les calpaïnes autolysées (Thompson *et al.*, 1990). A l'inverse les procalpaïnes, en présence de calcium, sont capables de réagir avec l'E64. D'autres observations relatent une activité de l'enzyme sous une forme native (Samis *et al.*, 1987 ; Molinari *et al.*, 1994). L'utilisation de mutants de la calpaïne révèle que son activation a lieu avant l'autolyse (Elce *et al.*, 1997). Ces observations montrent bien que l'autolyse ne peut être à l'origine de l'activation des calpaïnes. Toutefois nous avons



**Figure N°11:** Schéma récapitulatif des différentes hypothèses d'activation des calpaines (Suzuki and Sorimachi, 1998). On y retrouve la translocation des calpaines au niveau des membranes suivie d'une autolyse en présence de calcium et de PIP<sub>2</sub>.



**Figure N°12:** Schéma représentant les changements structuraux de la m-calpaïne survenant lors de l'activation par le calcium (Nakagawa *et al.*, 2001). En absence de calcium, le site catalytique est fermé à cause de la distance séparant les deux sous-domaines (a). La fixation d'ions calcium induit des changements structuraux (rupture de l'interaction entre le résidu Lys7 et le motif EF-hand 2 de la petite sous-unité), cela a pour effet de libérer le sous-domaine IIa permettant l'ouverture du site actif (b). Après la formation du site actif, il s'ensuit l'autolyse de l'extrémité N-terminale de la grande sous-unité (c) conduisant à la dissociation des deux sous-unités (d).

ici juste quelques données contradictoires sans réelles informations quant aux mécanismes qui interviennent dans l'activation des calpaïnes.

L'activation *in vitro* des calpaïnes nécessitent des concentrations bien supérieures aux concentrations en calcium rencontrées dans la cellule. Cette différence souligne l'intervention d'activateurs capables d'abaisser la concentration requise à un niveau physiologique.

Au regard des nombreuses hypothèses concernant le mécanisme d'activation des calpaïnes, on peut affirmer que c'est un phénomène très complexe qui ferait intervenir plusieurs acteurs. Ainsi l'activation des calpaïnes serait peut être la sommation des différentes hypothèses entrevues ci-dessus (Figure N°11). Il apparaît évident que l'activation des calpaïnes est un enchaînement d'événements intra- et intermoléculaires. La récente découverte de la structure tridimensionnelle de la m-calpaïne permet d'avoir quelques éléments de réponse au niveau intramoléculaire. En réalisant différents mutants Nakagawa *et al.* (2001) montrent que la dissociation des sous-unités *in vitro* n'est pas nécessaire à l'activation. En revanche il caractérise le rôle stabilisateur de la sous-unité 30kDa. Ils proposent un modèle d'activation de la m-calpaïne (Figure N°12).

Ainsi la conformation ouverte du site actif serait due à la fixation du calcium à deux endroits de l'enzyme. La première au niveau du domaine VI casserait l'interaction avec le domaine I supprimant les forces électrostatiques entre le sous domaine IIa et le domaine III. Ce même domaine III en fixant du calcium au niveau de sa boucle acide rompt les interactions électrostatiques avec le sous domaine IIb. Ce dernier pouvant alors constituer le site actif avec le sous domaine IIa (Reverter *et al.*, 2001).

Le domaine III, en outre de sa boucle acide, serait capable, à l'instar de certains domaines C2, d'assurer l'interaction avec les phospholipides membranaires, d'augmenter la sensibilité vis à vis du calcium mais aussi d'aiguiller l'enzyme vers des membranes cytoplasmiques ou nucléaires. D'autres régions comme le domaine V serait à même d'ancrer les calpaïnes aux membranes. Avec de tels éléments mais aussi la découverte des régions A et C de la calpastatine susceptibles d'activer les calpaïnes (Tompa *et al.*, 2002), on peut spéculer sur un mécanisme d'activation faisant appel à la coopération de plusieurs sites comme les membranes mais aussi l'inhibiteur endogène des calpaïnes, la calpastatine. La structure tridimensionnelle d'une calpaïne active permettrait d'apporter quelques éléments de réponse.

### ➤ Fonctions des calpaïnes

Les calpaïnes ont une activité protéolytique très limitée dans bon nombre de cas. Elles hydrolysent les liaisons entre domaine d'un substrat entraînant la libération de domaines aux propriétés biochimiques différentes du substrat initial. Cette précision ne peut être due qu'à la présence de séquences cibles spécifiques.

Les séquences PEST pourraient être des séquences destinées à cibler la zone de protéolyse (Wang *et al.*, 1989). Ces régions seraient capables de fixer des ions  $\text{Ca}^{2+}$  et permettre par conséquent à la protéine de devenir un substrat pour les calpaïnes (Rogers *et al.*, 1986). Toutefois des expériences de mutation de ces séquences montrent leur aspécificité pour les calpaïnes (Molinari *et al.*, 1995; Nixon *et al.*, 1995; Carillo *et al.*, 1996). Ces séquences seraient nécessaires mais pas suffisantes pour être des substrats spécifiques des calpaïnes.

La phosphorylation des substrats protéiques favoriserait la protéolyse (Yamaguchi *et al.*, 1994). Par contre cette idée s'oppose aux conclusions d'autres auteurs qui préconisent que la phosphorylation peut inhiber la protéolyse (Litersky and Johnson, 1992; Elvira *et al.*, 1993).

### ❖ Renouveau myofibrillaire

De nombreuses protéines myofibrillaires sont des substrats potentiels pour les calpaïnes hormis l'actine et la myosine, les deux protéines majeures de la structure contractile (Tan *et al.*, 1988). Nous avons vu que les calpaïnes se localisaient à proximité de la strie Z. Busch *et al.* (1972) soulignent des dégradations de la strie Z au niveau de myofibrilles incubées avec les calpaïnes. Leur action au niveau de la strie Z conduirait au relargage de sarcomères entiers, première étape du renouvellement des protéines myofibrillaires (Goll *et al.*, 1989; Huang and Forsberg, 1998).

### ❖ Fusion des myoblastes

Les calpaïnes sont capables de dégrader les intégrines et les glycoprotéines impliquées dans l'adhésion cellulaire (Du *et al.*, 1995; Inomata *et al.*, 1996). Ces protéines ont un rôle primordial durant les étapes de fusion cellulaire.

L'implication des calpaïnes dans la fusion des myoblastes a été reconnue après l'addition d'EGTA, lequel bloque cette fusion (Schollmeyer, 1986). D'autres chercheurs ont aboutit aux mêmes résultats en utilisant différents inhibiteurs (Kumar *et al.*, 1992; Kwak *et al.*, 1993; Barnoy *et al.*, 1997). Ce n'est qu'en 1999 avec l'utilisation de la calpastatine, l'inhibiteur spécifique, que le rôle des calpaïnes dans la fusion des myoblastes a été réellement

démontrée (Temme-Grove *et al.*, 1999). Seule la m-calpaïne semble être impliquée dans ce processus (Balcerzak *et al.*, 1995).

La protéolyse de certaines protéines membranaires par la m-calpaïne apparaît nécessaire pour initier la fusion cellulaire (Kosower *et al.*, 1983; Elamrani *et al.*, 1995; Barnoy *et al.*, 1998). L'équilibre du complexe calpastatine/calpaïne apparaît être finement régulé lors de la fusion des myoblastes. Le taux d'inhibiteur chute lors de la fusion puis croît de nouveau après formation du myotube (Barnoy *et al.*, 1996). La diminution de la calpastatine est fondamentale pour amorcer l'activité de la m-calpaïne nécessaire aux phases de différenciation (Hayashi *et al.*, 1996; Balcerzak *et al.*, 1998). Autre illustration de la corrélation calpastatine/calpaïne, Barnoy *et al.* (1999) observent par immunoprécipitation que la calpaïne est associée à son inhibiteur dans des conditions physiologiques, aussi bien durant la division des myoblastes que lors des phases de différenciation.

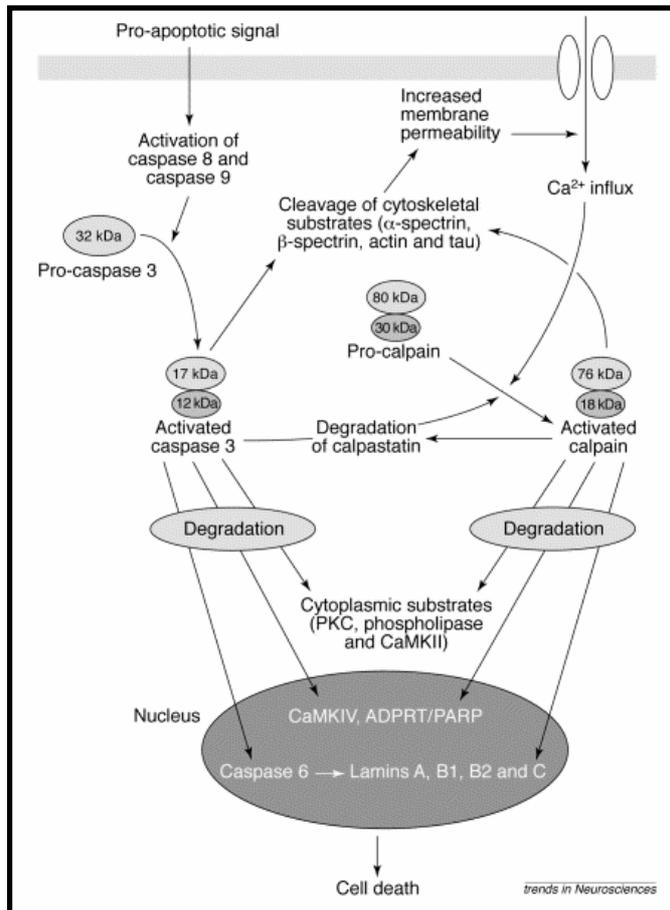
#### ❖ Croissance musculaire

L'administration de substances  $\beta$ -adrénergiques chez l'animal entraîne un développement de la masse musculaire d'environ 10 à 30% (Yang et Mc Eligott, 1989). Cette croissance musculaire est associée à une baisse de l'activité des calpaïnes (Forsberg *et al.*, 1989) et une augmentation de l'activité de la calpastatine (Higgins *et al.*, 1988; Kretchmar *et al.*, 1990; Pringle *et al.*, 1993).

#### ❖ Prolifération cellulaire

Les calpaïnes semblent intervenir au niveau de la division cellulaire. Leur implication a été reconnue par addition d'inhibiteurs synthétiques des cystéines protéases (Shoji-Kasai *et al.*, 1988; Mellgren and Lu, 1994; Mellgren *et al.*, 1996; March *et al.*, 1993). Schollmeyer va plus loin en montrant une action spécifique de la m-calpaïne (Schollmeyer, 1988). Les calpaïnes influencent la prolifération cellulaire en hydrolysant certaines protéines du cycle cellulaire. Elles ont notamment pour substrats des facteurs de transcription (c-fos, c-jun) qui contribuent à la division cellulaire (Hirai *et al.*, 1991; Mellgren, 1991).

Les calpaïnes possèdent un autre point de contrôle de la prolifération cellulaire, par action sur la protéine p53. Cette protéine inhibe la prolifération cellulaire et a donc par conséquent un rôle antitumoral. Un dysfonctionnement ou une mauvaise régulation de cette protéine peut engendrer une prolifération anarchique des cellules et par voie de fait l'apparition de cancer. Le complexe protéasome/ubiquitine est le système majeur de régulation



**Figure N°13:** Implication des caspases et des calpaines dans la protéolyse au cours de l'apoptose (Wang, 2000).

de l'action de cette protéine (Chowdary *et al.*, 1994; Maki *et al.*, 1996) mais il semblerait que les calpaïnes soient capables, *in vitro*, de moduler l'activité de la p53 (Pariat *et al.*, 1997; Kubbutat and Vousden, 1997; Gonen *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1997)

#### ❖ Apoptose

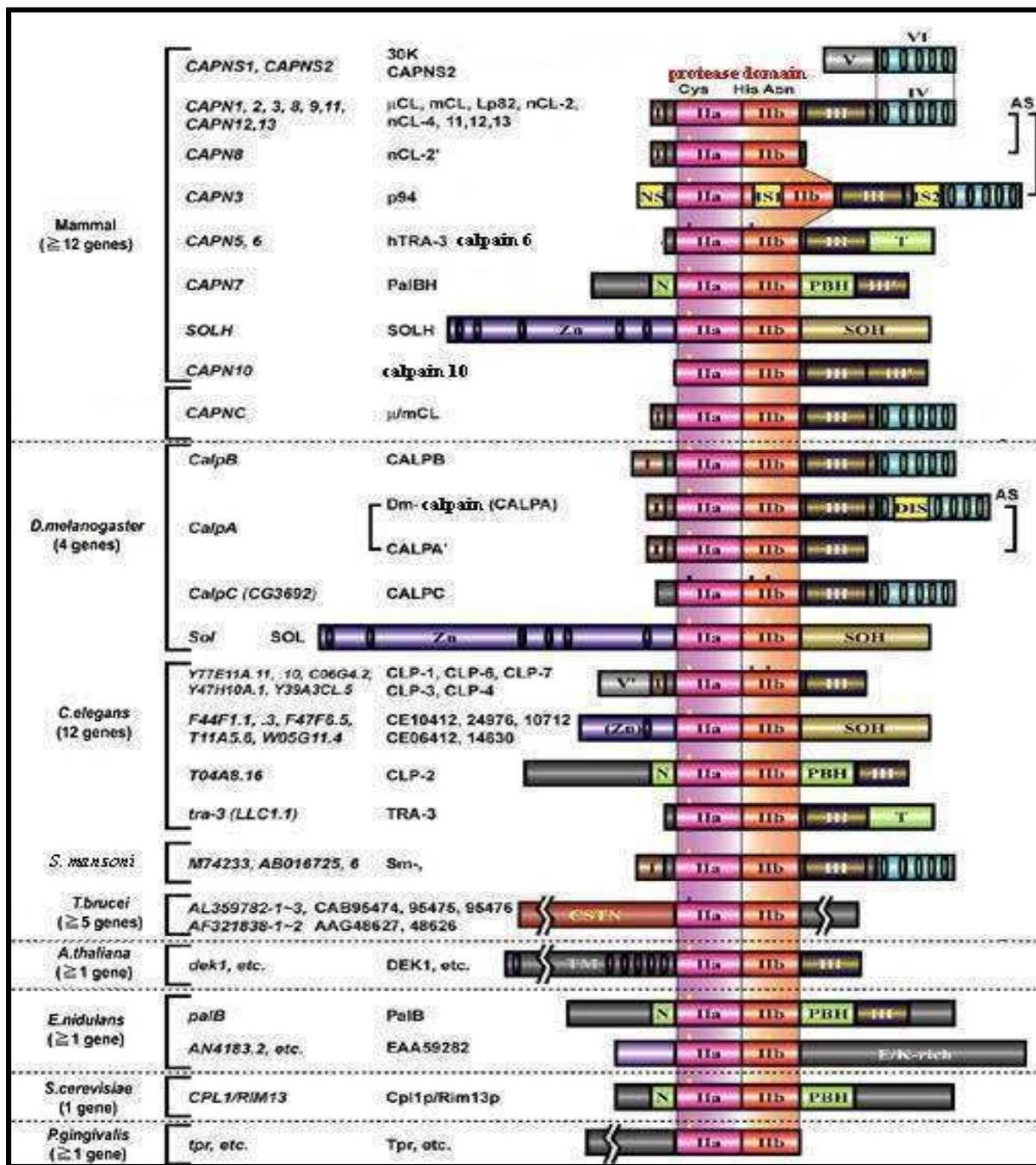
Les calpaïnes sont aussi activées dans des systèmes apoptotiques. Les premières observations ont été faites en 1994 par Squier *et al.* qui ont décelé une activité protéolytique dans des thymocytes. En outre, plusieurs inhibiteurs des calpaïnes dont la calpastatine permettent de prévenir l'apoptose (Squier *et al.*, 1994; Sarin *et al.*, 1994, 1995). Les calpaïnes contribueraient à la dégradation protéique des systèmes apoptotiques (Patel *et al.*, 1996; Solary *et al.*, 1998). Il semble même qu'il y ait une collaboration entre caspases et calpaïnes (Figure N°13) depuis qu'il a été montré que la calpastatine pouvait être clivée par les caspases au cours de l'apoptose (Porn-Ares *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998). Paradoxalement, les calpaïnes semblent avoir un contrôle négatif sur les caspases puisqu'elles auraient pour substrats la caspase 9 (Chua *et al.*, 2000) et la procaspase 3 (Kobayashi *et al.*, 1990) deux protéines nécessaires à l'activation de la caspase 3, elles mêmes essentielles dans la dégradation cellulaire. Ces découvertes accentuent le degré de complexité des interactions entre caspases et calpaïnes.

Avec de nombreux substrats en commun, la combinaison d'inhibiteurs des calpaïnes et de caspases serait bénéfique sur le plan thérapeutique dans la lutte contre des pathologies où les nécroses et l'apoptoses seraient impliquées.

#### ❖ Pathologies associées

Comme on a pu le constater, les calpaïnes ont de nombreuses fonctions cellulaires. Leur rôle physiologique est si important qu'un défaut survenu dans sa régulation peut engendrer des pathologies. Cependant elles ne sont pas toujours la cause directe.

Saido *et al.* (1994) dressent un tableau des pathologies où les calpaïnes ont une éventuelle contribution. On peut distinguer la cataracte où la m-calpaïne hydrolyse des protéines de structure (Azuma and Shearer, 1992), la maladie d'Alzheimer qui se caractérise par l'accumulation des substrats des calpaïnes conduisant à l'asphyxie de la cellule (Saito *et al.*, 1993), certaines dystrophies musculaires où la formation de nécrose s'accompagne d'une forte activité protéolytique des calpaïnes (Spencer *et al.*, 1995, Spencer and Tidball, 1996; Kumamoto *et al.*, 1995, 1997). Il est à noter également que les ischémies, en induisant une augmentation du calcium intracellulaire, vont activer les calpaïnes. Cette activation continue



**Figure N°14:** Schéma de la superfamille des calpaines.

Les abréviations utilisées sont: NS, N-terminal insertion sequence; IS1 and IS2, insertion sequence 1 and 2; AS, alternative splicing products; T, TRA-3-specific domain; N, N-terminal conserved sequence in PalB homologues; PBH, PalB homologous domain; Zn, Zn-finger motif; SOH, SOL homologous domain; DIS, *Drosophila* insertion sequence; TM, trans-membrane domain; CSTN, calpastatin-like domain

Source : <http://www.rinshoken.or.jp/ER/MainPages/MainFrame.html>

va engendrer la protéolyse de protéines kinases, des protéines membranaires et du cytosquelette.

Enfin, il faut ajouter à cette liste deux pathologies qui sont issues d'une mutation génétique. La mutation d'un nucléotide sur le gène qui code pour la calpaïne 10 conduit à un diabète de type 2 (Horikawa *et al.*, 2000). De même une mutation du gène codant pour la calpaïne 3 entraîne une perte de l'activité protéolytique de la p94 conduisant au développement d'une myopathie affectant les muscles du bassin et des épaules (myopathie des ceintures) (Ono *et al.*, 1998).

#### o La superfamille des calpaïnes

Les rapides développements en génomique ont permis d'isoler 83 gènes chez 23 organismes qui codent pour une protéine homologue aux calpaïnes ubiquitaires. En plus des calpaïnes ubiquitaires conventionnelles, on retrouve des calpaïnes possédant des structures qui ont divergé afin de s'adapter aux conditions du tissu dans lequel elles fonctionnent.

Dans cette superfamille de calpaïnes (Figure N°14), seule la région correspondant au domaine II est relativement bien conservée; les protéines homologues à la grande sous-unité ont des structures divergentes. Dès lors, une classification en deux groupes a été opérée pour les homologues de la grande sous-unité. On distingue les calpaïnes classiques et les calpaïnes atypiques. Ces dernières diffèrent par la délétion ou la substitution d'un des domaines de la grande sous-unité. Parallèlement, une autre classification basée sur le mode d'expression de la protéine a été mise en place selon qu'elle soit exprimée dans tout l'organisme ou dans un tissu particulier. Ono *et al.* (1999) proposent un schéma que nous avons réactualisé, qui résume bien cette double classification.

Nous allons consacrer la première partie de ce chapitre à évoquer les différents homologues des calpaïnes aussi bien chez les invertébrés que chez les mammifères puis nous nous focaliserons sur deux calpaïnes présentes dans le muscle et qui sont la calpaïne 10, une protéine ubiquitaire atypique et la p94 ou calpaïne 3, la calpaïne spécifique du tissu musculaire.

➤ *Description générale*

❖ Les homologues de calpaïne chez les invertébrés

▶ Drosophila melanogaster

Quatre gènes ont été isolés chez *Drosophila melanogaster*. La calpaïne issue du locus Small Optic Lobes (SOL) est à ce jour celle qui a la structure la plus différente de tous les homologues. Dans la région N-terminale, on remarque un domaine contenant des motifs de fixation du Zinc alors que le domaine IV est substitué par un domaine de structure différente, le Small Optic Lobe Homology domain (SOH), dont les fonctions demeurent inconnues (Delaney *et al.*, 1991). La SOL calpaïne chez la drosophile est un exemple d'homologue qui diffère sensiblement des calpaïnes classiques. Dès lors il serait intéressant de se pencher sur les propriétés, notamment catalytiques de cette protéine.

Deux autres protéines homologues ont été découvertes pour cet organisme (Emori and Saigo, 1994; Theopold *et al.*, 1995). La CALPA ou Dm-calpaïne présente une structure analogue à celle de la grande sous-unité avec une séquence d'insertion entre le premier motif EF-Hand et le second. Cette séquence hautement hydrophobe permettrait à la CALPA de se lier aux membranes. La CALPA' est le fruit d'un épissage alternatif qui aboutit à une protéine délétée du domaine IV. Privée du domaine IV, la CALPA' semble avoir des demandes en calcium différentes ainsi qu'une autre localisation que la Dm-calpaïne.

Enfin un autre homologue a été caractérisé, c'est la CALPB. Il présente une structure similaire à la grande sous-unité des calpaïnes conventionnelles sans délétion, substitution ou encore séquences d'insertion (Jékely and Friedrich, 1999)

▶ Caenorhabditis elegans

Douze gènes ont été identifiés chez *Caenorhabditis elegans*. Un homologue découvert chez cet organisme a une implication dans la détermination du sexe de l'espèce. La TRA-3 se compose de quatre domaines. Les trois premiers sont identiques aux domaines I, II, III de la grande sous-unité des calpaïnes conventionnelles. Le quatrième domaine appelé domaine T se substitue au domaine IV. Son rôle est essentiel pour le bon développement du sexe mâle mais aussi du sexe hermaphrodite. La TRA-3 agirait comme un stimulateur du TRA-2, un gène déterminant le sexe de l'espèce en hydrolysant le contrôle négatif de ce

dernier, le gène LAF-1. Un homologue du gène TRA-3 contenant le domaine T a été identifié chez la souris (Dear *et al.*, 1997) mais également chez l'homme (Dear *et al.*, 1997 ; Mugita *et al.*, 1997). Ce gène est le gène CAPN5. Il serait donc le pendant chez les mammifères de TRA-3.

#### ► Autres types de calpaïnes

D'autres organismes contiennent dans leur génome des gènes qui codent pour des protéines homologues de la grande sous-unité de la calpaïne classique.

Citons la palB, une protéine homologue des calpaïnes découverte dans un système fongique et qui, en dehors du domaine II, n'a aucune structure similaire aux autres domaines de la grande sous-unité.

Cette faible analogie illustre bien la distance en termes d'évolution entre les systèmes fongiques et les mammifères.

Ainsi on a pu voir qu'une délétion ou une substitution d'un domaine conduisait à la classer dans la catégorie des calpaïnes atypiques. Récemment, la calpaïne10, une nouvelle calpaïne atypique exprimée dans tout l'organisme a été découverte. Le domaine IV a été remplacé par un domaine T homologue à celui rencontré chez la calpaïne 5. Une variation du gène qui code pour la calpaïne 10 serait à l'origine de diabètes de type 2.

#### ❖ Les calpaïnes tissu spécifiques chez les mammifères

##### ► La Lp82, spécifique de l'œil

Elle a été identifiée dans le cristallin en 1998 par Ma *et al.*. Hormis le domaine I, la séquence en acides aminés est identique à celle de la p94. Issue du même gène que la p94, elle a subi un épissage alternatif qui conduit à l'absence des séquences d'insertion NS, IS1 et IS2.

Elle fait l'objet de nombreuses études eu égard à sa possible implication dans la formation de la cataracte (David and Shearer, 1989; David *et al.*, 1993).

##### ► Les nCL-2 et nCL-2', spécifiques de l'estomac

Leur caractérisation fait suite à la découverte de la p94. Tout d'abord en 1993, Sorimachi *et al* isolent la forme nCL-2 au niveau de l'estomac. Ensuite, ils découvrent une autre forme résultant de l'épissage alternatif du gène, la nCL-2'. La structure de la forme nCL-2' est singulière car la totalité du domaine IV ainsi que la grande majorité du domaine III lui font défaut. Cette caractéristique suppose une interaction avec le calcium mais aussi avec la

petite sous-unité différente des calpaines conventionnelles. Toutefois comme on a pu le voir dans l'analyse de la structure tridimensionnelle de la m-calpaïne, la boucle acide du domaine III est conservée dans la forme nCL-2'. Il n'est donc pas à exclure que la nCL-2' soit dépendante du calcium.

La comparaison des régulations, localisations ou encore leurs différentes interactions peut fournir d'importantes précisions sur le rôle des domaines de la grande sous-unité.

► La nCL-4, spécifique du tube digestif

Elle a été isolée dans l'intestin (Lee *et al.*, 1998). Elle ne présente pas de domaines délétés ni de séquence d'insertion. Une fois encore cet isoforme a un rôle prépondérant dans la viabilité de la cellule. En effet, dans des cancers de l'estomac, le gène CAPN 9 qui code pour la nCL-4 est affecté au niveau de son expression (Yoshikawa *et al.*, 2000).

► La CAPN6, spécifique du placenta et des muscles embryonnaires

Elle a été décrite pour la première fois en 1997 par Dear *et al.* Cette protéine présente quelques particularités qui font d'elle une calpaïne atypique. Son domaine IV est substitué par un autre domaine de structure différente, appelé domaine T. Autre singularité, la CAPN6 ne semble pas contenir d'activité cystéine protéase car le résidu cystéine du site actif est remplacé par un résidu lysine. De même, le résidu histidine tout aussi important dans la formation du site actif est remplacé par un résidu tyrosine. La nature des interactions change et soulève l'hypothèse d'une sous famille de calpaïne sans activité protéolytique. Cette sous famille aurait juste un rôle régulateur à l'image des caspases homologues (CASH), une famille de cystéine protéases privée de résidus majeurs au niveau du site actif, qui interviennent dans l'apoptose (Goltsev *et al.*, 1997).

❖ Autres calpaines atypiques

D'autres protéines homologues à la grande sous-unité des calpaines conventionnelles ont été isolés dans des tissus comme les testicules (calpaïne 5, calpaïne 11), le cerveau (calpaïne 5) ou le système capillaire (calpaïne 12). Aux calpaines découvertes chez des organismes supérieurs, il faut ajouter les homologues de la grande sous-unité de la calpaïne identifiés chez des organismes plus primitifs (levures ou plantes). Ces protéines sont intéressantes pour les chercheurs dans la mesure où leur petit génome est plus facilement manipulable.

► La calpaïne 10, une protéine atypique ubiquitaire

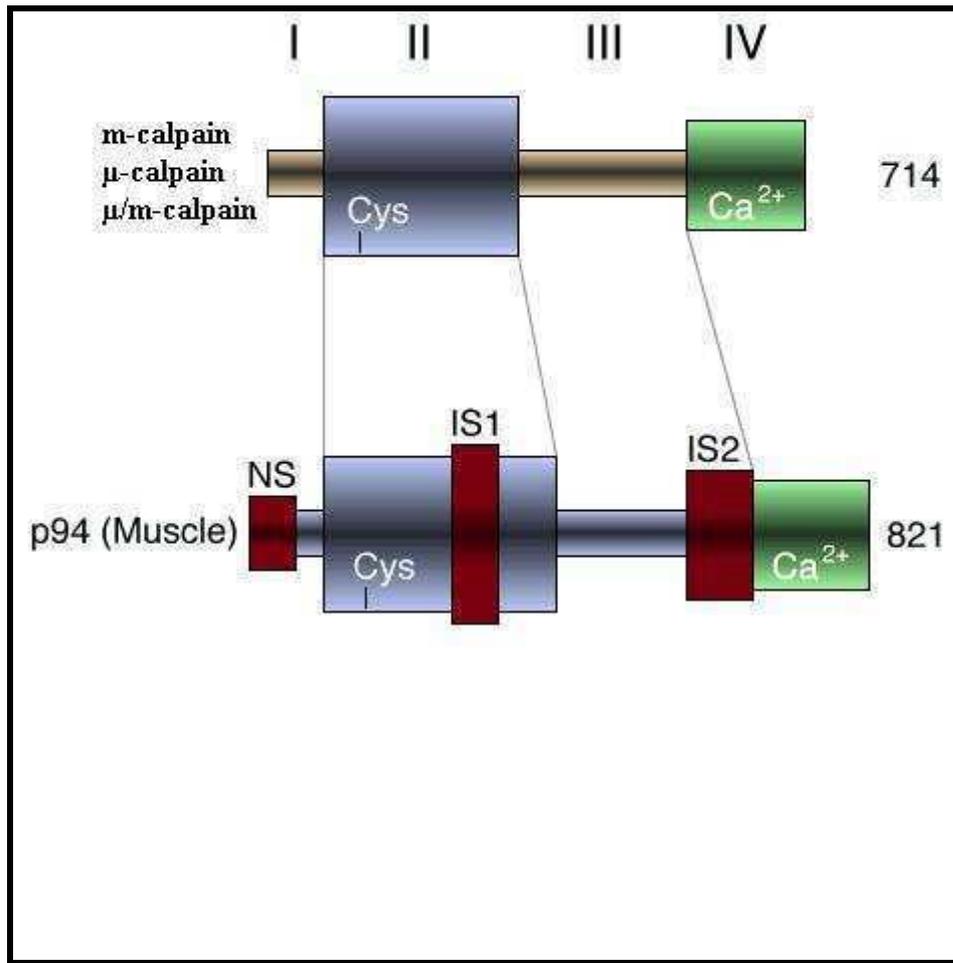
Par définition les calpaïnes sont des protéases intracellulaires, non lysosomales, qui nécessitent une certaine concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  afin d'être activées. Une nouvelle protéine dénommée calpaïne 10 qui présente une distribution tissulaire très large et comparable aux calpaïnes 1 et 2 a été découverte récemment (Ma *et al.*, 2001). Elle présente une différence structurale notable par rapport aux autres calpaïnes ubiquitaires puisque la grande sous-unité de la calpaïne 10 est dépourvue de domaine IV. Celui-ci est remplacé par un autre type de domaine dont la structure est très proche de celle de la calpaïne décrite sous le nom de TRA-3 et identifiée chez *Caenorhabditis elegans*. Ainsi il apparaît clairement que beaucoup de tissus contiendraient une calpaïne qui ne nécessiterait pas de calcium pour son activité ou qui utiliserait un mécanisme d'activation différent du mécanisme conventionnel. Dans le muscle, la calpaïne 10 est présente dans le cytosol au niveau du sarcolemme mais semble absente dans le noyau contrairement à certains autres tissus (Ma *et al.*, 2001).

Des mutations sur le gène codant pour la calpaïne 10 ont été corrélées à l'apparition de diabète de type 2 (Horikawa *et al.*, 2000). Le polymorphisme du gène est associé à une diminution du taux d'ARN messager dans les muscles ainsi qu'une dérégulation de l'insuline augmentant ainsi les risques de diabète de type 2 (Baier *et al.*, 2000). Les recherches sont focalisées sur le ou les substrats de la calpaïne 10 afin de mieux la définir.

► La calpaïne 3 ou p94, calpaïne spécifique du muscle

□ Expression

Le gène codant pour la calpaïne 3 est un enchaînement de 24 exons correspondant à un ARNm de 3316 paires de bases. Les analyses en Northern Blot montrent que cet ARNm est exprimée principalement dans le muscle squelettique mature. Il est dix fois plus important que celui des calpaïnes 1 et 2. L'ARNm codant pour la calpaïne 3 a été également détecté dans le tissu cardiaque (Poussard *et al.*, 1996) ou encore dans le cœur d'embryon humain (Fougerousse *et al.*, 1998). Une autre isoforme a été découverte plus récemment dans le cerveau et les astrocytes (Konig *et al.*, 2003).



**Figure N°15** : Particularités structurales de la p94 ou calpaïne 3  
 Source : [www.molvis.org](http://www.molvis.org)

## □ Structure

Le produit du gène codant pour la calpaïne 3 est une protéine de 94 kDa composée de quatre domaines pour une séquence de 821 acides aminés. Elle a globalement les mêmes caractéristiques que les calpaïnes classiques. Toutefois, elle présente la particularité de posséder trois séquences uniques d'insertion NS, IS1 et IS2 (Figure N°15). La région NS est longue de 20 à 30 acides aminés. Située dans la partie N-terminale, cette région, riche en proline, pourrait à l'instar du domaine I des calpaïnes classiques réguler l'activité de la p94. Par ailleurs des similitudes entre cette région et un propeptide présent chez plusieurs cystéines protéases ont été trouvées (Suzuki et Sorimachi, 1998). La région IS1 est une séquence d'une cinquantaine de résidus située au sein du sous domaine IIb du site actif. Cette séquence serait une hélice  $\alpha$  entourée de deux boucles qui encombreraient stériquement le site actif limitant ses interactions avec les substrats (Diaz *et al.*, 2004). IS1 est le siège de l'autolyse puisqu'il contient trois sites autolytiques. La séquence IS2, produit des exons 15-16, est un peptide de 77 acides aminés environ qui se localise entre le domaine III et le domaine IV. IS2 contient une séquence qui serait un signal de translocation nucléaire (Sorimachi *et al.*, 1993 ; Baghdigian *et al.*, 1999). La séquence IS2 semble être importante dans le contrôle de l'activité de la calpaïne 3. En effet un mutant calpaïne 3 dépourvu d'exon 15 semble avoir une activité protéolytique indépendante du calcium. Par ailleurs la suppression de l'exon 16 produisant un mutant calpaïne 3 induit la perte de spécificité du substrat de l'enzyme (Ono *et al.*, 1998).

L'autolyse rapide de la p94 ne permet pas pour le moment d'obtenir des données cristallographiques quant à sa structure. Toutefois des chercheurs ont établi une structure tridimensionnelle en s'appuyant sur la structure définie de la m-calpaïne (Jia *et al.*, 2001). Ils montrent que la structure tridimensionnelle de la calpaïne 3 serait identique à celle de la m-calpaïne aux exceptions près des séquences IS1 et IS2 qui seraient des boucles protubérantes.

Par le biais de son domaine de liaison au calcium, la calpaïne 3 peut former des homodimères où les sites actifs sont placés à chaque extrémité du dimère (Ravulapalli *et al.*, 2005). Cet aspect structural interviendrait probablement dans la régulation ou l'activation de l'enzyme. C'est une caractéristique qui sera abordée plus tard dans cette synthèse au chapitre régulation de la calpaïne 3.

## ❑ Localisation

Les seules informations dont on dispose sur la localisation de la calpaïne 3 sont un screening par la technique du double hybride. La calpaïne 3 serait fixée à la titine au niveau de la bande I et de la ligne M (Sorimachi *et al.*, 1995 ; Kinbara *et al.*, 1997).

Au niveau de la bande I, la p94 se fixe via sa région IS2, déterminante dans la reconnaissance du substrat, sur un domaine Immunoglobuline Ig83 de la titine. En ce qui concerne l'interaction en C-terminale, elle requiert la calpaïne 3 entière ainsi qu'une séquence particulière de la titine à savoir Mis7. Ces différences de fixation soulignent une fonction physiologique différente selon la localisation de l'enzyme.

Outre ces deux sites de fixation, la p94 se fixerait au niveau de la strie Z (Sorimachi *et al.*, 1995 ; Keira *et al.*, 2003 ; Taveau *et al.*, 2003). Cependant à l'heure actuelle, aucun résultat n'est venu confirmer ces observations immunohistochimiques. Enfin la calpaïne 3 ne se trouve pas uniquement dans le cytoplasme. Elle a été localisée au niveau des jonctions myotendineuses, des costamères et également dans le noyau (Baghdiguian *et al.*, 1999 ; Taveau *et al.*, 2003).

## ❑ Substrats et fonctions physiologiques

Plusieurs études ont montré que la calpaïne 3 était capable de cliver *in vitro* de nombreuses protéines cytosquelettiques telles que la titine, la taline, les filamines A et C, la vinexine ou encore l'eitrine (Taveau *et al.*, 2003). Il est à noter aussi que la p94 se localise à proximité des protéines citées par ailleurs.

A la lumière des résultats, la calpaïne 3 semble cliver les substrats afin de moduler leur fonction dans la cellule. Le fait que la LGMD2A, une myopathie invalidante, soit due à une perte de l'activité de la p94 montre bien que les produits hydrolysés par l'enzyme sont essentiels à l'homéostasie cellulaire.

La calpaïne 3 jouerait donc un rôle dans le maintien de la structure myofibrillaire. L'absence de la protéine conduirait à une déstructuration de la strie Z ainsi qu'un mauvais alignement des filaments d'actine. Cette désorganisation aboutit à la perte de contraction des myotubes (Balcerzak *et al.*, 1995 ; Poussard *et al.*, 1996). Bien qu'elle ne soit pas nécessaire au développement du muscle, elle joue une partition importante dans les fibres musculaires matures.

Par une approche protéomique, des chercheurs américains ont identifiés dix substrats potentiels *in vivo* parmi lesquels la protéine MCL1 (Cohen *et al.*, 2006). Cette observation renforcerait l'idée que la calpaïne 3 est impliquée dans le remodelage du sarcomère. Le

clivage de substrats métaboliques laisse à penser que la calpaïne 3 pourrait contribuer au « turnover » des protéines mitochondriales. La calpaïne 3 jouerait en quelque sorte le rôle de « chef d'orchestre » dans le remodelage du sarcomère (Duguez *et al.*, 2006).

La calpaïne 3 jouerait également un rôle antiapoptotique en ayant une action sur le couple NFκB/IκBα. En effet IκBα est un substrat potentiel de la calpaïne 3 (Baghdiguian *et al.*, 1999). IκBα est un inhibiteur cytoplasmique qui empêche la translocation nucléaire de NFκB à l'origine de la transcription de gènes de survie. Donc outre un rôle de « chef d'orchestre », la p94 pourrait participer à la signalisation cellulaire en régulant au niveau du noyau l'expression d'IκBα et en l'hydrolysant dans le cytoplasme.

#### □ Implication dans la LGMD2A

En 1995, Richard et ses collègues montrent que le gène qui code la p94 est à l'origine de la LGMD2A ou myopathies des ceintures. Elle se caractérise par une atrophie progressive symétrique et une faiblesse des muscles proximaux des membres. Neuf formes de LGMD identifiées à ce jour sont classées en deux groupes. Deux formes dominantes LGMD1A et LGMD1B et sept formes récessives LGMD2A-2G. Les formes 2C à 2F se manifestent par une perte de la fonctionnalité de la dystrophine au niveau du sarcolemme. En ce qui concerne la forme 2A, cet aspect phénotypique est normal mais des mutations et des délétions tout le long du gène ont été détectées au niveau du chromosome 15 (Fardeau *et al.*, 1996; Beckmann *et al.*, 1996). L'analyse des différentes mutations rencontrées confirme que cette pathologie provient d'une perte de l'activité protéolytique de la calpaïne 3 (Ono *et al.*, 1998). Ces mutations se caractérisent soit par une absence totale de la protéine, soit par un défaut dans l'autolyse en IS1 (Fanin *et al.*, 2003) ou encore une absence de reconnaissance de substrat quand la séquence IS2 est atteinte (Ono *et al.*, 1998). D'autres mutations affectant la liaison avec la titine (Kramerova *et al.*, 2004) ce qui perturberait la proximité avec les substrats.

La pathologie se caractérise par une augmentation de la créatine kinase et une nécrose des fibres. La LGMD2A présente une augmentation de l'apoptose par la perturbation de la voie NFκB. Ces conditions pathologiques ne permettraient pas à NFκB d'exercer un rôle antiapoptotique conduisant à l'atrophie des fibres musculaires (Bartoli et Richard, 2005). A l'inverse des protéines ubiquitaires, le taux de calpaïne 3 est inversement proportionnel à la dégradation musculaire survenant dans des conditions atrophiques. La p94 apparaîtrait comme le régulateur des calpaïnes ubiquitaires (Ono *et al.*, 2004).

## ***II. Contrôle et régulation de la protéolyse***

### ***II.1 Etat de l'art***

#### **II.1.1 Généralités**

Les enzymes protéolytiques sont responsables de la dégradation des protéines cellulaires. D'une manière générale, l'activité protéolytique, dans tous les tissus, doit être fortement régulée afin, d'une part, de restreindre l'action des enzymes aux processus dans lesquelles elles sont normalement impliquées et d'autre part de moduler l'activité enzymatique aux stricts besoins des cellules.

La régulation peut se faire au niveau de l'expression du gène codant pour la protéase mais également par l'intermédiaire d'une compartimentation particulière comme c'est le cas pour les protéines lysosomales. L'activité peut aussi être régulée par l'influence d'effecteurs divers ayant une action positive (activateurs) ou négative (inhibiteurs) sur leur activité catalytique. A ce titre, les proenzymes constituent une autre voie de régulation de l'activité enzymatique.

Les inhibiteurs peuvent être divisés en deux groupes d'après le genre d'interaction entre l'enzyme et l'inhibiteur.

Les inhibiteurs réversibles qui obéissent aux règles de Michaelis-Menten. Généralement, ces interactions sont de faible affinité ( $K_i \approx 10^{-6}$ ). Elles nécessitent des taux d'inhibiteurs supérieurs à l'enzyme en raison de la faible durée de vie du complexe.

Les inhibiteurs pseudo-irréversibles qui sont efficaces à des concentrations voisines de celle de l'enzyme cible. La réaction d'hydrolyse est, dans ce cas, bloquée au stade acyl-enzyme c'est-à-dire lorsque l'inhibiteur est associé de manière covalente à l'enzyme. Ces interactions sont généralement très fortes ( $K_i \leq 10^{-9}$ ) et conduisent à des complexes stables pendant une durée variant de quelques minutes à plusieurs jours.

Les inhibiteurs ont un rôle primordial dans la régulation de la protéolyse cellulaire. Aujourd'hui, ils focalisent beaucoup l'attention des chercheurs car ils constituent des cibles de choix dans le traitement thérapeutique de pathologies comme les cancers (Herrera Mendez, 2006).

Dans ce chapitre, nous allons aborder de manière succincte les inhibiteurs de sérine protéases puis des cystéine protéases en détaillant la régulation du système des calpaïnes et notamment la régulation singulière de la calpaïne 3.

## II.1.2 Les inhibiteurs de la protéolyse

### ***II.1.2.1 Les inhibiteurs de métalloprotéases et de protéases acides***

Il y a très peu d'informations sur les inhibiteurs de ces deux familles d'enzymes.

Chez les vertébrés, les inhibiteurs tissulaires de métalloprotéases sont des molécules d'environ 20 à 30 kDa multifonctionnelles. Ce sont des inhibiteurs à forte affinité qui forment des complexes réversibles et stoechiométriques avec leur enzyme cible, bloquant physiquement l'accès des substrats au site actif. Quatre inhibiteurs ont été identifiés et appelés TIMP-1, 2, 3, 4. Seules les trois premières formes sont présentes chez les bovins (Balcerzak *et al.*, 2001).

En ce qui concerne les aspartylprotéinases, aucun inhibiteur naturel n'a été identifié à ce jour. La pepstatine A, inhibiteur d'origine bactérienne, est à ce jour le seul inhibiteur connu des protéases acides comme la rénine, la pepsine ou encore la cathepsine D.

### ***II.1.2.2 Les inhibiteurs de sérine protéases***

Les inhibiteurs appartenant à ce groupe sont très nombreux. Des inhibiteurs de sérine protéinases ont été isolés dans de nombreux tissus d'origine animale et végétale. Ils ont été largement étudiés en raison de la mise en évidence de leur implication dans des processus biologiques aussi importants que la coagulation du sang ou des pathologies comme l'emphysème et certaines maladies hépatiques (Travis et Salvesen, 1983). Ils ont été classés en dix familles différentes sur la base de différentes homologies :

- Homologie de séquence
- La nature, le nombre et la localisation du ou des sites actifs
- L'homologie du mécanisme d'interaction avec les enzymes cibles
- Le nombre de ponts disulfures dans la protéine
- La topologie des ponts disulfures au sein de la protéine

Parmi ces inhibiteurs trois grandes familles se détachent de par leur importance. Il s'agit des inhibiteurs de type Kunitz, Kazal et des serpins.

- **Les inhibiteurs de type Kunitz**

Ces inhibiteurs sont des polypeptides de faible masse moléculaire et considérés comme ubiquitaire. Ils ont pu être identifiés dans divers tissus humains ainsi que chez le bovin et le porc. Cette famille d'inhibiteurs n'est pas spécifique aux vertébrés. La présence de gènes codant pour ces protéines a été rapportée pour de nombreux autres organismes vivants. Le venin de serpent reste une source importante d'inhibiteurs de cette famille. Il a été isolé dans le venin de vipère un inhibiteur de 6,5 kDa appartenant à cette famille (Siddiqi *et al.*, 1991).

Cette famille a été appelée ainsi par référence à l'inhibiteur pancréatique de la trypsine qui a été le premier étudié. Cet inhibiteur est composé de 58 acides aminés. Il s'agit d'une glycoprotéine avec un résidu Asn glycosylé. Il a été retrouvé chez le bovin dans tous les organes étudiés. Des études sur l'inhibiteur inter- $\alpha$ -trypsine (I- $\alpha$ T) ont montré que, par attaque enzymatique avec un excès de trypsine sur l' I- $\alpha$ T, on libère un fragment de 14 kDa constitué de deux domaines en tandem, chacun homologue de l'inhibiteur pancréatique de la trypsine (Pratt and Pizzo, 1987). Ces deux domaines sont connectés par un court peptide, ce qui semble être le cas de nombreux inhibiteurs de cette famille.

- **Les inhibiteurs de type Kazal**

Leur activité est très spécifique de la trypsine même si des inhibitions envers d'autres sérines protéinases ont été notées. Il s'agit de protéines de faible masse moléculaire.

Dans l'oeuf, l'inhibiteur ovomucoïde diffère d'une espèce à l'autre. Chez le poulet, il s'agit d'une simple chaîne alors que chez la tortue il est composé d'une double chaîne avec un site indépendant contre la trypsine et un autre pour la subtilysine. Cet inhibiteur est donc composé de différents domaines, leur nombre pouvant aller jusqu'à trois.

- **Les serpins**

Au niveau du plasma la famille d'inhibiteurs prédominante est celle des serpins (**serine** protéinase **inhibitor**). Les serpins sont impliquées dans la régulation de nombreux

événements biologiques allant de la coagulation à l'inflammation en passant par l'apoptose et certains peuvent jouer un rôle de suppresseur de tumeur. Ce sont des glycoprotéines monomériques de 350 à 500 acides aminés qui interagissent avec leurs protéinases cibles pour former des complexes très stables qui ne se dissocient pas après ébullition en présence de SDS. Cette propriété apparaît spécifique à cette classe d'inhibiteurs (Travis et Salvesen, 1983; Twining, 1994).

En termes structuraux, les serpins se composent de trois feuillets  $\beta$  (A, B et C), de huit à neuf hélices  $\alpha$  (A-I), et d'une boucle de 17 acides aminés appelée RCL pour Reactive Center Loop. Cette boucle RCL agit comme un mimétique du substrat pour la protéase cible, ce qui permet alors aux serpins de former un complexe stable. Ces protéases cibles sont, dans la plupart des cas, des sérine protéinases. Toutefois l'action des serpins serait plus étendue.

La famille des serpins comprend plusieurs membres parmi lesquels l' $\alpha_1$ -antichymotrypsine, l' $\alpha_1$ -protéinase inhibiteur ( $\alpha_1$ -PI), l'antithrombine III et l'angiotensinogène.

L' $\alpha_1$ -antichymotrypsine est un inhibiteur des enzymes chymotrypsine-like, de la cathepsine G et de la chymase; c'est une glycoprotéine de 68 kDa.

L' $\alpha_1$ -PI (53kDa) est un inhibiteur de l'élastase tandis que l'antithrombine III (58 kDa) est un régulateur physiologique de la thrombine.

L'angiotensinogène est un précurseur de l'angiotensine II qui intervient dans la régulation de la vasoconstriction artériolaire.

Un autre inhibiteur de haute masse moléculaire, la contrapsine a été isolé à partir du plasma de souris (55 kDa) (Takahara and Sinohara, 1982), de rat (63 kDa) (Ohkubo et al, 1991) et de cobaye (Suzuki *et al.*, 1990). La contrapsine est homologue à l' $\alpha_1$ -antichymotrypsine au niveau des séquences nucléotidiques. Cependant leur spectre d'inhibition est différent puisque si la contrapsine inhibe les protéinases de type trypsine, elle est inactive contre les protéinases de type chymotrypsine alors que l'inverse est observé pour l' $\alpha_1$ -antichymotrypsine. Cela suggère que la contrapsine et l' $\alpha_1$ -antichymotrypsine proviennent d'un ancêtre commun mais ont acquis des rôles physiologiques différents.

Comme nous venons de le voir, les serpins ont été longtemps considérées comme des inhibiteurs essentiellement extracellulaires ou circulants. Les comparaisons de séquences des membres de cette famille ont permis d'identifier un groupe particulier de serpins caractérisées par (a) une grande homologie de structure avec l'ovalbumine, protéine appartenant à la famille des serpins mais qui ne possède aucune activité inhibitrice ; (b) l'absence de la région N-terminale comprenant 23 acides aminés, région qui est commune à toutes les serpins ; et (c) l'absence d'une séquence signal hydrophobe permettant à ces protéines d'être sécrétés dans le compartiment extracellulaire (Remold-O'Donnell, 1993). Bon nombre des membres des serpins intracellulaires encore appelées Ov-serpins en raison de leurs similitudes avec l'ovalbumine semblent ne pas être sécrétés et reste localisées dans le compartiment intracellulaire (Korpula-Mastalerz et Dubin, 1996). Ces serpins intracellulaires sont caractérisées par :

- l'absence du signal de translocation
- l'absence de l'extension N-terminale communes à toutes les serpins
- la présence au voisinage de la liaison hydrolysée par les sérines protéinases lors de la formation du complexe d'un résidu serine au lieu d'un résidu asparagine en position 390
- la présence d'un résidu différent de la valine en position 388.

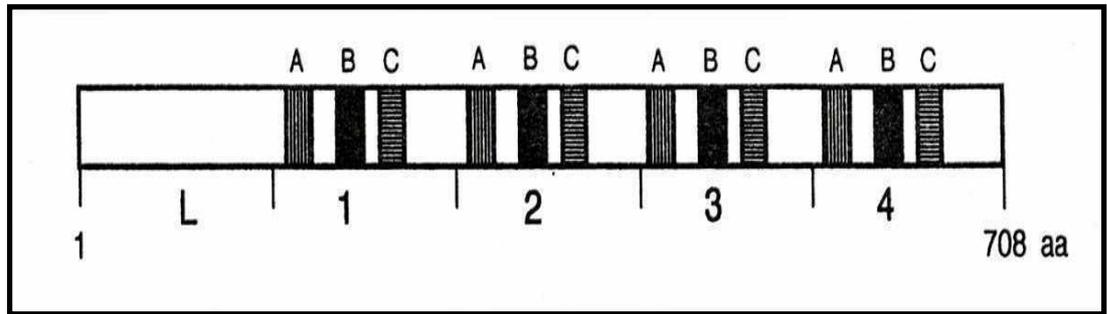
Une autre particularité propre à certaines Ov-serpins comme l'ovalbumine, le plasminogène activateur inhibiteur-2 et la maspaine qui peuvent être totalement ou partiellement sécrétés en raison de la présence au sein de ces protéines d'une séquence signale interne de translocation. Néanmoins, la grande majorité des Ov-serpins sont intracellulaires et reste donc dans le cytosol. (Pour plus de détails, voir revue de Mastalerz et Dubin, 1996). A noter également que certaines de ces Ov-serpins comme l'alpha-1-antitrypsin, l'antithrombine ou le plasminogène activateur inhibiteur-2 ont la capacité de s'agréger pour former des complexes au sein de la cellule ainsi que *in vitro* (Lomas *et al.*, 1993 ; Lomas *et al.*, 1995 ; Mikus and Ny, 1996 ; Fitton *et al.*, 1997 ; Bottomley et Chang, 1997). Cette capacité d'agrégation est particulièrement rencontrée chez les serpins qui présentent une grande instabilité à l'état natif.

### ***II.1.2.3 Les inhibiteurs des cystéines protéases***

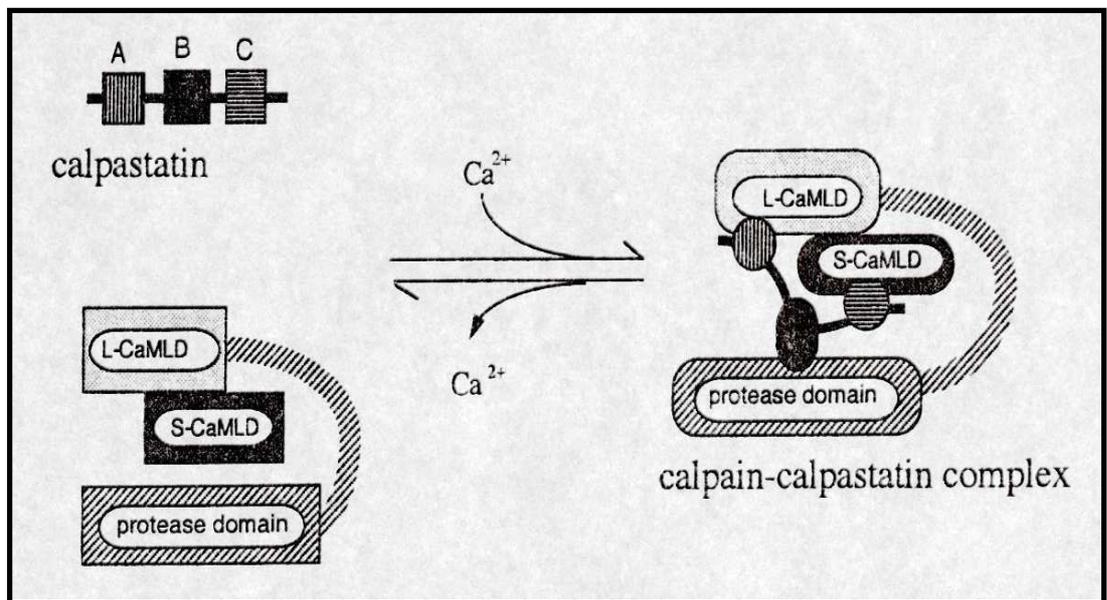
Ces inhibiteurs sont regroupés dans une seule superfamille, la superfamille des cystatines (Rawlings and Barrett, 1990). Les cystatines sont des inhibiteurs de forte affinité qui possèdent un mécanisme d'inhibition de type réversible. Dans cette superfamille, on dénombre quatre familles qui se distinguent par le nombre de copies de segment cystatine et la présence de ponts dissulfures (Barrett, 1986)

- **Les stéfines** : elles ont une chaîne polypeptidique non glycosylée d'une centaine d'acides aminés. La masse moléculaire avoisine 10 à 14 kDa. Ce sont des protéines intracellulaires qui ne possèdent pas de ponts dissulfures.
- **Les cystatines** : La principale caractéristique de cette famille est la présence de deux ponts dissulfures localisés dans la région C-terminale. La chaîne polypeptidique est longue de 115 acides aminés pour une masse moléculaire moyenne de 13 kDa environ.
- **Les kininogènes** : Ce sont les membres les plus évolués de la superfamille des cystatines. La chaîne lourde de ces molécules comporte trois domaines de type cystatine acquis vraisemblablement par duplication de gènes dont deux seulement sont fonctionnels. Les kininogènes se composent d'une chaîne polypeptidique glycosylée de 335 acides aminés munie de deux ponts dissulfures. Cette structure leur permet de fixer et d'inhiber de manière indépendante deux molécules de protéases à cystéine (Turk *et al.*, 1986).
- **Les inhibiteurs glycosylés intermédiaires** contiennent quant à eux deux copies de la structure inhibitrice de base et plusieurs ponts dissulfures.

Les gènes codant pour ces protéines présentent de fortes homologies de séquence ce qui suppose l'existence d'un gène ancestral qui aurait subi des modifications au cours de l'évolution. Tous les membres de la famille des cystatines sont capables d'inhiber les cystéine protéases telles que la papaine et les cathepsines B, H et L. Les kininogènes inhiberaient également les calpaïnes ubiquitaires (Ishiguro *et al.*, 1987). Parallèlement aux cystatines, l'activité des cystéines



**Figure N°16:** Représentation schématique de la calpastatine humaine (Takano and Maki, 1999)



**Figure N°17:** Schéma de l'interaction tripartite entre la calpaïne et la calpastatine (Takano and Maki, 1999).

protéases lysosomales peut également être régulée par des serpins décrites à l'origine comme des inhibiteurs de sérine protéases (Schick *et al.*, 1998).

#### ***II.1.2.4 L'inhibiteur spécifique des calpaïnes: La calpastatine***

. Une activation des calpaïnes due à une dérégulation peut entraîner la mort cellulaire. Si le calcium agit comme un stimulateur des calpaïnes, il faut que ces protéinases subissent un contrôle négatif. C'est le rôle de la calpastatine, inhibiteur endogène spécifique des calpaïnes. En coexistant dans la cellule avec la calpaïne, elle permet une fine régulation dans des conditions physiologiques.

La calpastatine a été décrite dans un premier temps comme l'inhibiteur de l'activateur de la phosphokinase B (Drummond et Duncan, 1966). Une décennie plus tard, la calpastatine fut reconnue comme inhibiteur des protéinases dépendantes du calcium (Waxman et Krebs, 1978; Nishiura *et al.*, 1978). Depuis, la calpastatine a été isolée de nombreux tissus. Ses propriétés biochimiques et biomoléculaires ont été déterminées par plusieurs groupes de chercheurs.

- **Structure**

Au niveau de la structure primaire, la calpastatine comprend 700 acides aminés environ. Ces séquences ont été déterminées par le clonage d'ADN complémentaire. Ainsi on retrouve 708 acides aminés chez l'homme (Asada *et al.*, 1989), 713 chez le porc (Takano *et al.*, 1988) et 718 chez le lapin (Emori *et al.*, 1987).

La protéine se compose de 5 domaines de 140 acides aminés chacun. Dans la région N-terminale, il existe un domaine unique appelé domaine L qui précède 4 domaines similaires, les domaines d'inhibition. Dans ces domaines, les résidus aminés extrêmement bien conservés sont regroupés en trois régions A, B, C (Figure N°16). Il est à noter que seule la région B est inhibitrice.

- **Localisation**

Dans le muscle squelettique de lapin, la calpastatine serait distribuée au niveau du sarcolemme et de son cytoplasme, des myofibrilles, des mitochondries (Nori *et al.*, 1993). La calpastatine est donc localisée dans des zones où l'on retrouve de la calpaïne mais aussi des substrats potentiels des calpaïnes.

Enfin les différents sites de distribution du complexe calpaïne/calpastatine dans le muscle strié supposent différentes fonctions physiologiques dans ces différents compartiments.

- **Diversité moléculaire**

Plusieurs chercheurs ont observé des régions N-terminales différentes selon les espèces et les tissus considérés. Ainsi l'acide aminé terminal dans le cas de la calpastatine purifiée à partir de foie de lapin est un acide glutamique. Il est le 80<sup>ème</sup> acide aminé après le résidu méthionine initiateur de la traduction (Emori *et al.*, 1987). A l'inverse la calpastatine du muscle cardiaque a une glycine pour acide aminé terminal laquelle est située immédiatement après la méthionine (Mellgren *et al.*, 1989). Ces différences ne proviennent pas d'une protéolyse de la calpastatine car un Western Blot fait à partir d'extraits bruts révèle de multiples bandes (Takano *et al.*, 1993). Ces variations en N-terminal, donc du domaine L, répondent aux attentes physiologiques des tissus considérés.

Des différences de masse moléculaire sont à l'origine d'une classification de la calpastatine en deux groupes. La calpastatine tissulaire de 100 à 120 kDa et la calpastatine érythrocytaire d'environ 70kDa (Takano *et al.*, 1986). Le type érythrocytaire ne possède pas les domaines L et 1. La maturation des érythrocytes serait corrélée à la délétion N-terminale de la calpastatine puisque Takano *et al.* (1993) ont observé en Western Blot dans des érythrocytes, la présence concomitante de la forme majeure de 70kDa avec des formes mineures allant de 90kDa à 110kDa; un anticorps dirigé contre le domaine L reconnaissant la forme 110kDa.

Différentes études rapportent des poids moléculaires allant de 20kDa à 240kDa. L'explication de cette large gamme de poids peut provenir de la sensibilité de la calpastatine pour la protéolyse ou de la migration anormale de certaines protéines en électrophorèse.

Contrairement au cytosol, les calpastatines au niveau membranaire sont connues aussi pour leur degré de phosphorylation. Un extrait membranaire contient ainsi plus de formes phosphorylées que de formes non phosphorylées (Adachi *et al.*, 1991).

Enfin le fait qu'il existe plusieurs calpastatines pour un seul gène chez l'homme (Onho *et al.*, 1990) et chez le bovin (Bishop *et al.*, 1993) conduit à penser que leur diversité est le résultat d'épissages (De Tullio *et al.*, 1998 ; Geesink *et al.*, 1998) ou de sites de début de

lecture différents durant la traduction ou la transcription (Cong *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1994). On peut citer l'exemple des deux isoformes du muscle cardiaque chez le porc alors qu'on ne trouve qu'une seule isoforme chez le muscle cardiaque bovin (Geesink *et al.*, 1998).

- **Le Domaine L**

Le domaine L n'a pas d'homologie structurale avec les quatre autres domaines. En conséquence, il n'a pas d'activité inhibitrice et ses fonctions précises n'ont pas encore été élucidées. L'alignement des séquences primaires du domaine L de différentes espèces montre une conservation importante de cette région ce qui dénote l'existence d'une fonction biologique. Le domaine L se fixerait aux membranes via des interactions ioniques (Mellgren, 1988) grâce à un segment particulier riche en résidus basiques pouvant être de type lysine ou arginine.

La calpastatine est hautement phosphorylable. Le domaine XL de la calpastatine cardiaque comporte trois sites possibles de phosphorylation par la phosphokinase A (Cong *et al.*, 1998). Le cycle phosphorylation-déphosphorylation peut moduler la spécificité de l'inhibiteur dans le muscle squelettique de rat (Salamino *et al.*, 1994) ainsi que son pouvoir d'inhibition (Salamino *et al.*, 1997). Récemment Aversa *et al.* (2001) montrent que la phosphorylation par la phosphokinase A permettrait de réguler le stock de calpastatine soluble dans le cytoplasme et par conséquent active.

En conclusion le domaine L serait le principal artisan de la mobilité de la calpastatine tout d'abord en formant au moyen de ses résidus basiques, des agrégats associés à des invaginations nucléaires. Puis l'éventuelle phosphorylation de ses sites lui permettrait de passer de la forme active soluble à l'état agrégé et associé et inactif.

- **Domaines d'inhibition**

L'utilisation de la génomique a permis de montrer que chacun des quatre domaines possédait une activité inhibitrice indépendante (Maki *et al.*, 1987; Emori *et al.*, 1988). Par rapport au nombre de domaines d'inhibition, Imajoh *et al.* (1987) estimait à quatre le nombre de molécules de calpaines que pouvait fixer la calpastatine tissulaire. Une délétion de la région B au sein de domaines recombinants entraîne une absence d'activité inhibitrice ainsi qu'une tendance à la protéolyse. La région B est le centre d'inhibition (Ma *et al.*, 1993). Les mêmes expériences de délétion des régions A et C indiquent que si elles sont nécessaires pour

une inhibition efficace, elles ne sont pas essentielles (Maki *et al.*, 1988, 1989; Kawasaki *et al.*, 1989; Uemori *et al.*, 1990). Leur importance dans l'initiation du processus d'inhibition est tout de même reconnue (Uemori *et al.*, 1990; Kawasaki *et al.*, 1989). Des études récentes menées par Tompa *et al.* (2002) révèlent que les régions A et C seraient capables d'activer les calpaïnes ubiquitaires et d'abaisser leurs exigences en calcium.

- **Mécanisme d'inhibition**

L'association calpastatine-calpaïne est calcium dépendante (Cottin *et al.*, 1981; Imajoh *et al.*, 1985). En piégeant les ions calcium par EGTA ou EDTA, la réaction est réversible; la calpastatine conserve son pouvoir inhibiteur.

L'utilisation de fragments recombinant en cinétique enzymatique a permis de démontrer que la calpastatine avait un type d'inhibition compétitif. La région B semble se fixer à proximité du site actif. Kawasaki *et al.* (1989) aboutissent à cette même conclusion en montrant que la calpaïne associé au domaine B recombinant est protégé de l'inactivation induite par l'E64, un inhibiteur irréversible des cystéines protéases.

- **Fixation de la calpastatine aux domaines de liaison du calcium**

Si le domaine B est la région inhibitrice des calpaïnes, l'interaction calpastatine-calpaïne est assurée par les régions A et C. Elles se fixent sur les domaines de type "calmodulin like" de la calpaïne (Ma *et al.*, 1993). La région A se fixe à la grande sous-unité alors que la région C se fixe à la petite sous-unité (Ma *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1994; Takano *et al.*, 1995) ce qui permet au domaine B d'interagir avec le site catalytique (Figure N°17).

Les domaines EF-Hand en présence de calcium exposerait à la surface des résidus hydrophobes lui permettant de constituer des interactions hydrophobes. Cependant les régions A et C, de par leur séquence, forment plutôt des  $\alpha$ -hélices acides. La destruction des  $\alpha$ -hélices en substituant un résidu Leu par un résidu Pro conduit à l'absence d'interaction. La structure hélicoïdale est importante pour l'association des régions A et C aux domaines IV et VI. Toutefois le type d'interaction et son degré d'implication dans la formation du complexe enzyme/inhibiteur reste à préciser.

- **Conclusion**

La calpastatine est un inhibiteur unique au vu de sa structure primaire puisqu'il n'y a pas d'homologie avec les autres protéines connues. En outre elle possède plusieurs domaines

répétés. Enfin ses propriétés physico-chimiques et son mécanisme d'inhibition la distinguent des autres inhibiteurs.

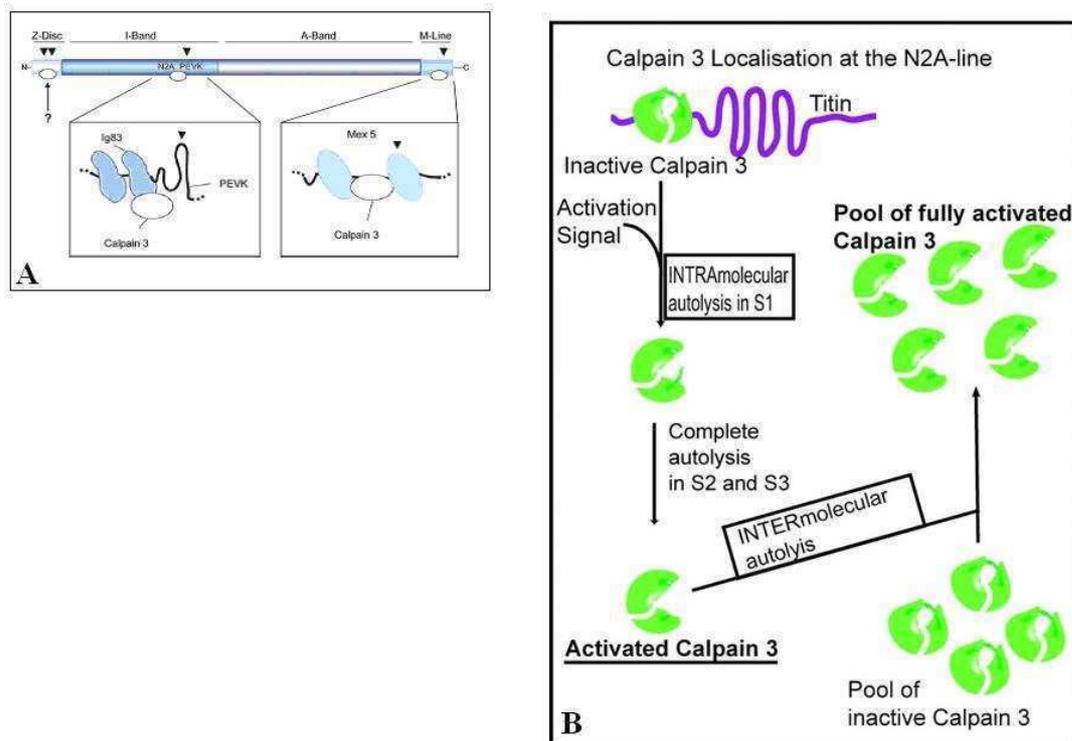
La colocalisation de la calpaïne et de la calpastatine dans le même compartiment cellulaire ne signifie pas que la calpaïne est toujours réprimée par la calpastatine. Hormis la  $\mu$ -calpaïne native, la quantité de calcium nécessaire à la formation du complexe est sensiblement inférieure à celle nécessaire pour activer l'enzyme (Kapprell and Goll, 1989). A l'heure actuelle aucune preuve n'a été apportée sur une éventuelle fixation du calcium sur la calpastatine. Ceci signifierait que la calpastatine se fixe à la forme active ou qu'elle serait capable d'abaisser cette concentration en calcium.

Certes d'énormes avancées ont été effectuées mais l'interaction calpastatine/calpaïne faisant intervenir le calcium et les membranes demeure très complexe. La définition en trois dimensions de ce complexe est la clé pour mieux cerner le mécanisme d'inhibition. Mais pour cela, il faut disposer de quantités suffisantes en calpastatine et calpaïne mais aussi maîtriser l'autolyse que pourrait générer la présence de calcium au cours de la formation du complexe.

Si la calpastatine est le régulateur spécifique de l'activité des calpaïnes classiques, elle n'inhiberait pas l'activité de la calpaïne 3, calpaïne majoritaire dans le muscle (Sorimachi *et al.*, 1993). L'activité de la p94 serait donc régulée suivant un autre mode tout à fait singulier.

#### ***II.1.2.5 La régulation de la calpaïne 3, un chef d'orchestre atypique***

Comme toutes les autres protéases cytoplasmiques, l'activité de la calpaïne 3 doit être parfaitement régulée pour être fonctionnelle et éviter des protéolyses incontrôlées. Outre une régulation au niveau de la transcription ou encore de sa compartimentation, la calpaïne 3 semble être régulée au niveau protéique de façon tout à fait singulière. En effet, en réalisant une électrophorèse en conditions dénaturantes de l'extrait brut myofibrillaire, elle apparaît extrêmement stable suggérant qu'elle est dans une forme inactive (Anderson *et al.*, 1998 ; Taveau *et al.*, 2003). Son activation se produit alors par une autolyse au niveau d'IS1 ce qui induit une cascade d'activation de proche en proche en clivant la boucle IS1. Il s'ensuit une réassociation par des liaisons non covalentes de la molécule qui devient un dimère actif un peu à l'image de l'activation des caspases (Taveau *et al.*, 2003). Il apparaît clairement que la

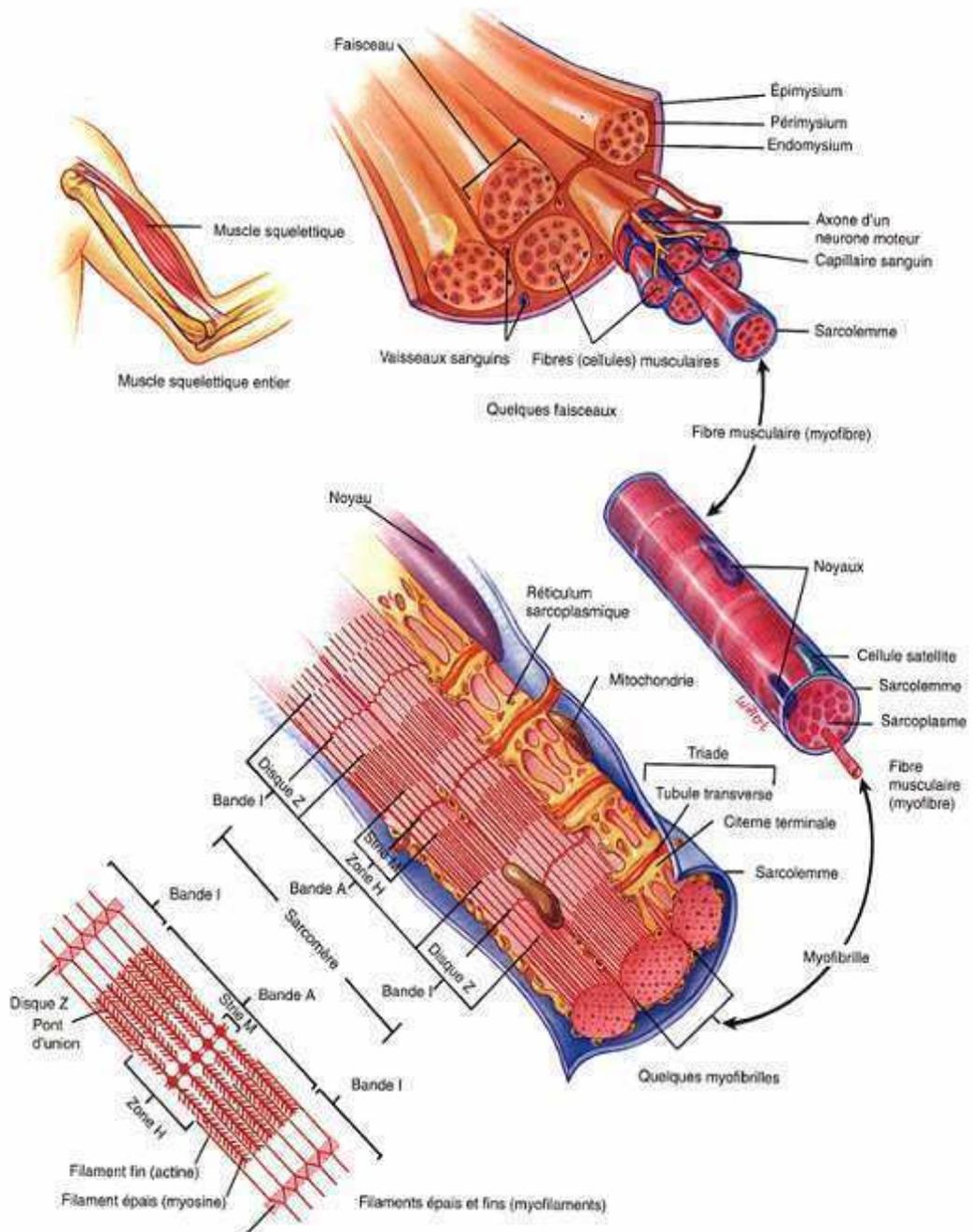


**Figure N°18 :** A. Interactions de la calpaïne 3 avec la titine (Duguez et al., 2006) au niveau des lignes N2A et M. L'interaction en N2 requiert la séquence IS2 alors qu'au niveau de la ligne M, toute la protéine est impliquée dans l'interaction.

B. Modèle d'activation de la calpaïne 3 (Taveau et al., 2003). Sous l'effet d'un signal d'activation, la calpaïne est clivée au niveau de la séquence IS1. Cette autolyse intramoléculaire va donner lieu à un clivage en cascade activant le pool de calpaïnes 3 inactives.

séquence IS1 agit comme un peptide inhibiteur vis-à-vis de la calpaïne 3 en l'empêchant d'accéder aux substrats (Diaz *et al.*, 2004).

L'interaction de la calpaïne 3 avec la titine semble être le principal aspect de la régulation de l'activité de l'enzyme. En effet, elle serait rapidement clivée au niveau de la séquence IS1 dans des systèmes ectopiques (Taveau *et al.*, 2003) alors qu'elle peut être extraite intacte de tissus musculaires quand elle est copurifiée avec des fragments de titine (Sorimachi *et al.*, 1995 ; Kinbara *et al.*, 1997). De plus, une surexpression de la calpaïne 3 dans des systèmes transgéniques n'induit pas de flagrantes modifications ce qui tend à montrer le fort potentiel tampon du muscle (Spencer *et al.*, 2002). A l'inverse une surexpression de la p94 chez des souris atteintes de dystrophies musculaires générées par des mutations survenant au niveau de la région N2A tend à exacerber la pathologie (Huebsch *et al.*, 2005). Ces résultats confirment bien l'importance de la région N2A dans le contrôle de l'activité de la calpaïne 3. Par ailleurs les pathologies musculaires induites par des mutations au niveau de la titine présentent une absence totale ou partielle de la calpaïne 3 (Haravuori *et al.*, 2001 ; Garvey *et al.*, 2002 ; Hackman *et al.*, 2002). La titine se présente donc comme un réservoir de calpaïnes 3 inactives (Figure N°18). Bien que des progrès ont été effectués au niveau de la régulation de l'activité de la calpaïne 3, la question de son signal d'activation reste entière. Les calpaïnes classiques sont activées par une augmentation du calcium intracellulaire. En dépit de nombreuses controverses la p94 est capable de fixer du calcium. Ces résultats ont été obtenus *in vitro* en utilisant des mutants de la calpaïne 3 (Rey *et al.*, 2002 ; Garcia *et al.*, 2006). Toutefois le calcium ne semble pas être le signal d'activation puisque une concentration infime en calcium suffit à l'activer (Sorimachi *et al.*, 1993). Une autre hypothèse probable, l'activation par l'exercice a été remise en cause depuis que des chercheurs ont montré qu'il n'y avait pas d'autolyse de la p94 durant l'exercice (Murphy *et al.*, 2006). L'origine de l'activation de la calpaïne 3 demeure un enjeu majeur pour les chercheurs. La perturbation de l'association titine-calpaïne 3 pourrait provenir non pas de la calpaïne 3 mais de la titine par un changement de conformation ou par sa capacité à fixer de nombreux ligands. Cette dissociation pourrait être également orchestrée par d'autres protéines régulatrices de cette interaction.



**Figure N°19:** Structure du muscle squelettique au niveau macroscopique et microscopique (Tortora et Grabowski., 1994).

### **III. Dégradation intracellulaire des protéines musculaires**

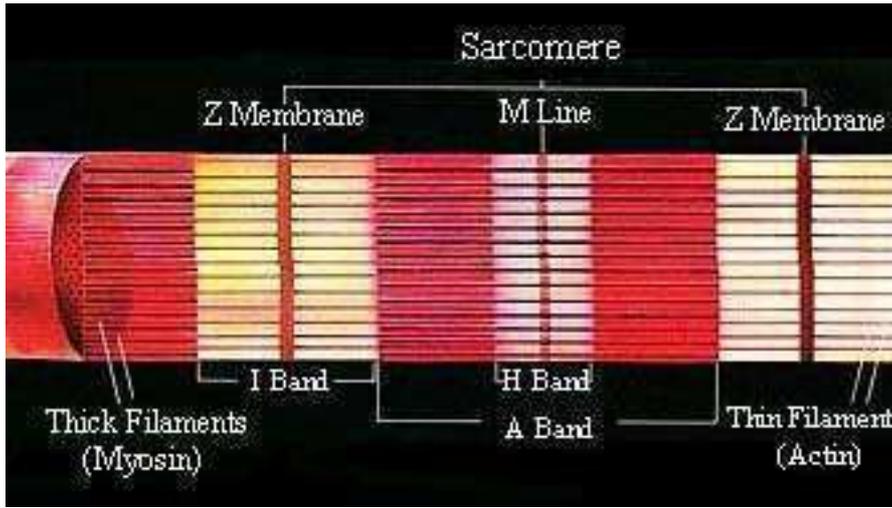
#### **III.1 Préambule sur la structure du muscle et les différentes protéines musculaires**

##### **III.1.1 La structure du muscle**

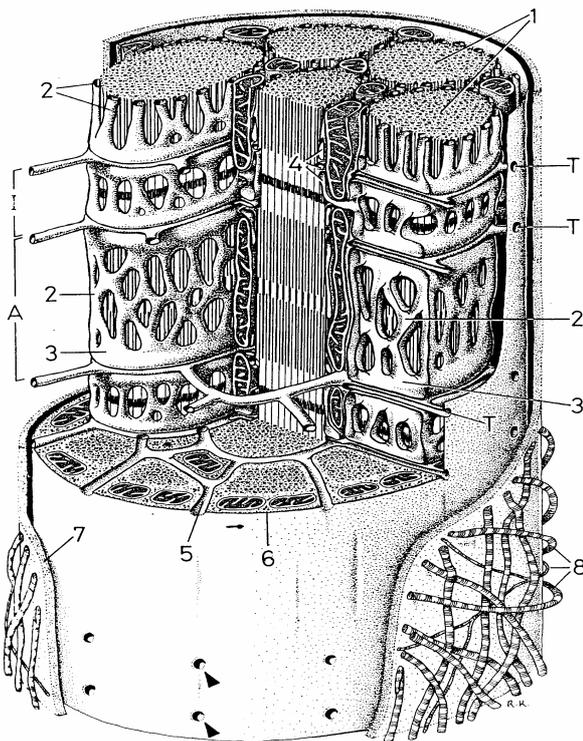
Le muscle squelettique est constitué de fibres musculaires. Provenant de la fusion d'un grand nombre de myoblastes (cellules précurseurs mononuclées), ces fibres ou cellules musculaires sont plurinuclées. Ces cellules sont entourées par du tissu conjonctif, l'endomysium et s'organisent en faisceaux de fibres délimités par le pérимysium. Ces faisceaux sont maintenus par un tissu conjonctif externe appelé épimysium. A noter que, l'épimysium se ramifie pour donner le pérимysium puis l'endomysium constituant ainsi un réseau continu au sein du muscle (Figure N°19). Les cellules musculaires sont délimitées par une membrane plasmique, appelée sarcolemme. Leur cytoplasme peu abondant, nommé sarcoplasme, contient de nombreuses protéines solubles et des granules de glycogène ainsi que tous les organites habituellement présents dans le cytoplasme des cellules (mitochondries, peroxisomes, .....). Une particularité des cellules musculaires est l'organisation du réticulum sarcoplasmique, site de stockage des réserves de calcium, qui se situe à la périphérie des cellules et possèdent des invaginations (tubules T) qui sont en contact étroit avec chaque myofibrille.

##### **III.1.1.1 Les myofibrilles**

En microscopie, les fibres musculaires présentent une alternance de bandes anisotropes, les bandes A et de bandes isotropes, les bandes I (Figure N°20). Le sarcomère, unité de base de l'appareil contractile, représente l'espace myofibrillaire compris entre deux lignes sombres, appelées strie Z situées au milieu de la bande I. la striation des fibres est due à l'organisation de deux types de filaments : les filaments épais, situés dans la bande A, qui occupent la partie centrale du sarcomère et des filaments fins, situés dans la bande I et qui pénètrent la bande A. L'absence des filaments fins au sein de la bande A crée une zone plus claire appelée bande H.



**Figure N°20:** Schéma d'une myofibrille avec alternance des bandes sombres et des bandes claires  
 Source : <http://www.life.uiuc.edu/crofts/bioph354/lect16&17.html>



**Figure N°21:** Organisation spatiale interne d'une fibre musculaire.

Chaque myofibrille (1) est entourée de segments du reticulum sarcoplasmique (2) au niveau des bandes A et I. A la limite entre les bandes A et I, tous les tubules s'unissent pour former les citernes terminales (3). La membrane du reticulum s'invagine pour former les tubules T (T) qui forment, avec deux citernes, une triade (4). Les tubules T (5 et pointes de flèche) ne s'anastomosent que transversalement et communiquent directement avec l'espace intercellulaire. En dehors du sarcolemme (6) se trouve une lame basale (7) et un feutrage dense de microfibrilles de collagènes (8).

### ***III.1.1.2 Le réticulum sarcoplasmique et les tubules T***

Le réticulum sarcoplasmique (Figure N°21) est un système membranaire entourant les myofibrilles. Les tubules transverses T sont constitués d'invagination de la membrane du réticulum sarcoplasmique et permettent une propagation rapide des potentiels d'action lors de la contraction musculaire. A la jonction entre les bandes A et I, le réticulum sarcoplasmique forme des citernes contenant le calcium. La membrane du réticulum sarcoplasmique dans sa partie longitudinale contient une  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase permettant de réabsorber le calcium libéré lors de la contraction.

## **III.1.2 Les protéines musculaires (tableau I)**

### ***III.1.2.1 Les protéines du tissu conjonctif***

Ces protéines représentent 10 % des protéines musculaires et sont insolubles quelle que soit la force ionique du milieu dans lequel elles se trouvent. Elles sont aussi appelées protéines du stroma.

Le constituant principal du tissu conjonctif est le collagène. C'est une protéine fibreuse et non élastique constituée de molécules de tropocollagène. Le tissu conjonctif contient également de l'élastine qui est une protéine fibreuse, insoluble formant des fibres élastiques. On retrouve également au sein du tissu conjonctif des protéoglycans servant de liants du réseau de collagène et assurant la liaison de ce réseau au sarcolemme.

### ***III.1.2.2 Les protéines sarcoplasmiques***

Elles représentent 30% des protéines musculaires. On y retrouve divers systèmes enzymatiques ainsi qu'un pigment tissulaire : la myoglobine.

### ***III.1.2.3 Les protéines myofibrillaires***

Elles représentent environ 60% des protéines musculaires. Elles sont solubles seulement dans un milieu à forte force ionique. On y retrouve des protéines de la structure contractile telle l'actine ou la myosine mais aussi des protéines de régulation.

**Tableau I : Principales protéines musculaires (modifié d'après Got, 1997)**

<b>PROTEINES</b>	<b>% des protéines totales</b>	<b>% des protéines myofibrillaires</b>	<b>Poids moléculaires (kDa)</b>	<b>Localisation dans la myofibrille</b>	<b>Rôle physiologique</b>
<b><u>Myofibrillaires</u></b>	<b>60</b>	<b>100</b>			
<i><b>Contractiles</b></i>					
Myosine		45	520	Filament épais	- Contraction
Actine		22	42	Filament fin	- Contraction
<i><b>Régulatrices</b></i>					
Protéine H		< 1	74	Filament épais	- Régule la contraction
Protéine C		2	130	Filament épais	- Régule la contraction
Myomesine		1	185	Bande M	- Arrange les filaments de myosine de façon ordonnée
Protéine M		2	165	Bande M	- Arrange les filaments de myosine de façon ordonnée
La M-créatine kinase		< 1	80	Bande M	- Régénérateur intramoléculaire d'ATP
Skelemine		< 1	195	Bande M (périphérie)	- Attache les myofibrilles adjacentes entre elles et les myofibrilles aux filaments intermédiaires
Tropomyosine		5	66	Filament fin	- Régule la contraction. Lie le filament fin au disque Z
Troponine C		2	18	Filament fin	- Régule la contraction. Fixe le calcium
Troponine I		2	22	Filament fin	- Régule la contraction. Inhibe l'activité ATPasique de l'actomyosine
Troponine T		2	37	Filament fin	- Régule la contraction. Rôle structural
Paratropomyosine		< 1	34	Jonction A- I	- Inhibe les interactions myosine/actine en présence d'ATP
Tropomoduline		< 1	41	Filament fin (extrémité libre)	- Se lie à la tropomyosine. Régule la contraction. Lie les troponines I et C au filament fin
<i><b>Cytosquelettiques</b></i>					
α-actinine		2	204	Disque Z	- Ancre les filaments fins et élastiques dans le disque Z
β-actinine		< 1	66	Disque Z	- Ancre les filaments d'actine dans le disque Z et les coiffe
Zeugmatine		< 1	2000	Disque Z	- Ancre les filaments d'actine dans le disque Z et les coiffe
Titine		10	2800	Filaments allant de la bande M au disque Z	- Garde les filaments épais au milieu du sarcomère. Régule l'assemblage des protéines du filament épais et contrôle la longueur de la bande A.
Nebuline		4	800	Filaments parallèles au disque Z	- Régule la longueur du filament fin. Régule la contraction en liant l'actine à la myosine
Desmine		< 1	212	Filaments intermédiaires	- Encerle le disque Z et attache les myofibrilles entre elles. Maintient la continuité des sarcomères
Synemine		< 1	460	Filaments intermédiaires	- Lie la desmine aux myofibrilles. Se lie à la desmine et à l'α actinine
Vinculine		< 1	130	Costamères	- Attache les myofibrilles au sarcolemme
Filamine		< 1	245	Costamères	- Attache le disque Z au sarcolemme
Dystrophine		< 1	427	Costamères	- Se lie à l'actine et à la matrice extracellulaire
Spectrine		< 1	240-280	Costamères	- Attache le disque Z au sarcolemme
<b><u>Sarcoplasmiques</u></b> (Enzymes, Myoglobine,...)	<b>30</b>	-		-	- Intervient essentiellement au niveau du métabolisme des muscles
<b><u>Tissu conjonctif</u></b> (Collagène, Elastine)	<b>10</b>	-			-

- **Les protéines contractiles**

- La myosine

Principal constituant de la bande A, la myosine représente 45% des protéines myofibrillaires. C'est une protéine de masse moléculaire d'environ 500kDa. La myosine forme un hexamère composé de deux chaînes lourdes (200kDa) et de quatre chaînes légères (20 à 30 kDa). Les deux chaînes lourdes s'enroulent en hélice et forme la queue de la myosine : c'est la partie fibrillaire de la molécule. En N-terminal, les deux chaînes se séparent pour former chacune une structure globulaire appelée tête de myosine. Chacune des têtes interagit avec deux chaînes légères.

- L'actine

L'actine est la protéine principale du filament fin. Elle existe sous deux formes : l'actine G (globulaire) de 42kDa et l'actine F (filamenteuse). L'actine F est le résultat de la polymérisation de l'actine G.

- **Les protéines régulatrices**

- Au niveau du filament fin

On recense quatre protéines régulatrices intervenant dans le contrôle de la contraction musculaire

- La tropomyosine, dimère formé de deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ . Elle est située dans chacun des deux sillons de l'hélice d'actine. Dans la fibre, elle participe à la régulation de la contraction musculaire sous la forme de complexe  $Ca^{2+}$ -Troponine-Tropomyosine.

- Les Troponines T,I,C sont des protéines associées à chaque molécule de tropomyosine :

- La troponine T participe à la liaison de la tropomyosine à l'actine.

- La troponine I inhibe l'interaction entre l'actine et la myosine en l'absence de calcium.

- La troponine C lie le calcium et entraîne un changement conformationnel de la tropomyosine. Le site de fixation de la myosine sur l'actine est alors démasqué.

- Au niveau du filament épais

Les plus importantes sont les protéines C et H qui facilitent la formation du filament épais par autoassemblage de la myosine.

Au niveau de la bande M on retrouve trois protéines : la myoméline, la protéine M et la M-créatine kinase qui s'associent à la myosine. Les deux premières jouent un rôle dans la structure en assurant l'arrangement ordonné des filaments de myosine. La M-créatine kinase facilite la régénération de l'ATP nécessaire à la contraction musculaire.

- **Les protéines du cytosquelette**

Elles garantissent le maintien de l'architecture myofibrillaire

- La strie Z

Elle est principalement constituée d' $\alpha$ -actinine qui se lie aux filaments d'actine pénétrant dans la strie Z. On trouve d'autres protéines minoritaires comme la zeugmatine, la  $\beta$ -actinine, la desmine ou encore la nébuline.

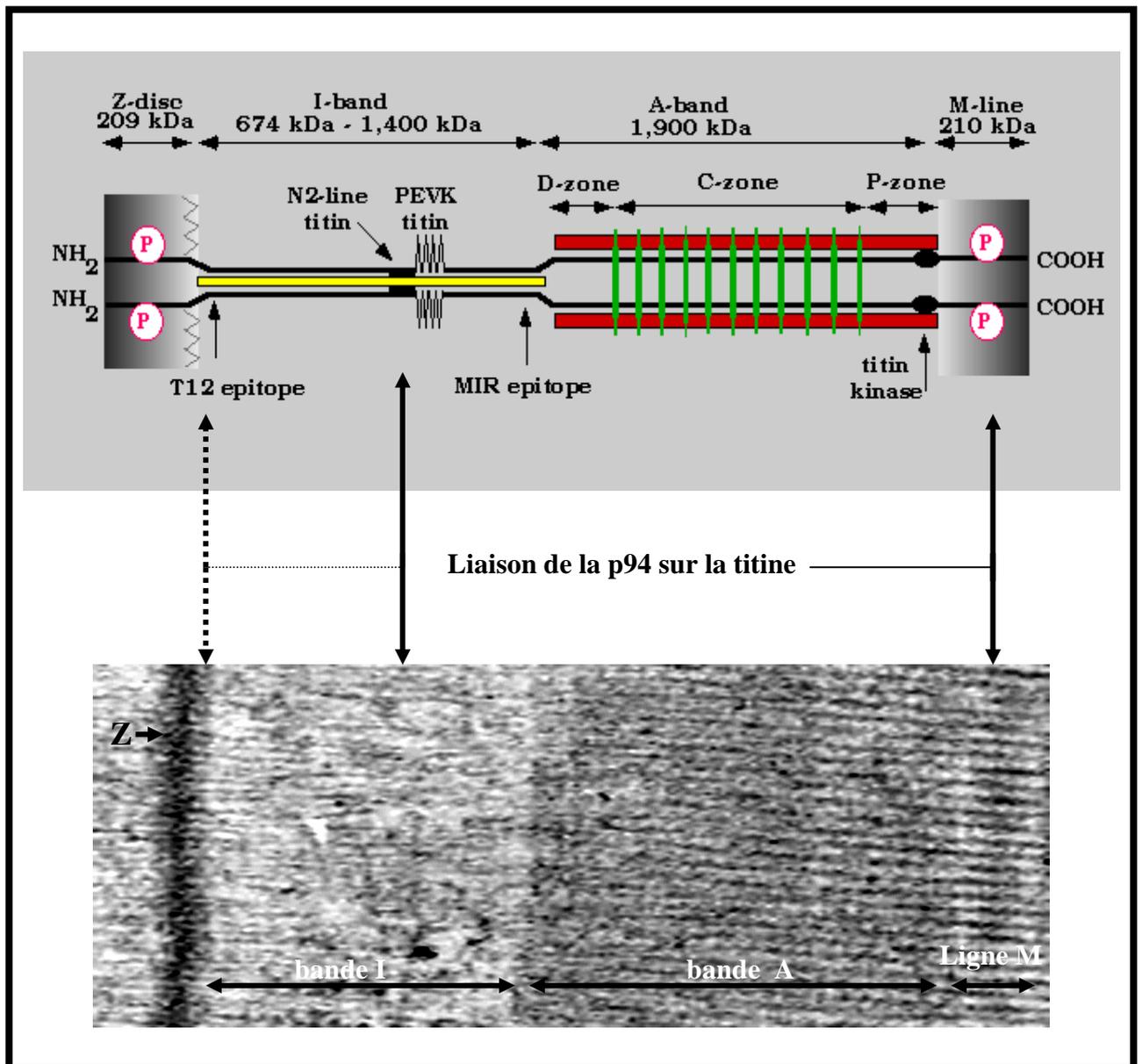
- Les filaments intermédiaires transversaux

C'est un réseau qui permet de maintenir les myofibrilles alignées les unes par rapport aux autres. Il permet également l'attachement des myofibrilles au sarcolemme. Ces liaisons au sarcolemme par le biais de la dystrophine se situent au niveau de la bande M et de la strie Z. A ce niveau on retrouve les costamères, protéines transmembranaires qui assurent la liaison entre les filaments intermédiaires intracellulaires et l'ensemble de la matrice extracellulaire (collagène).

- Les filaments longitudinaux

C'est un réseau parallèle aux filaments fins et épais. Il se constitue essentiellement de nébuline et de titine.

La nébuline est une protéine de 800kDa dont l'extrémité C-terminale se lie à l' $\alpha$ -actinine au niveau de la strie Z. La nébuline contrôlerait la longueur du filament fin mais aussi la contraction en modulant l'interaction entre l'actine et la myosine.



**Figure N°22 : Structure schématique de la titine et localisation des sites de liaison de la p94 sur la titine.**

Le schéma du haut représente la structure schématique d'une moitié de sarcomère. Il est possible de suivre le cheminement de la titine (ligne noire) depuis la ligne Z, le long des filaments d'actine (jaune) puis le long des filaments de myosine (rouge) jusqu'à la ligne M. La photo du bas représente une moitié de sarcomère en microscopie électronique à transmission. La titine interagirait avec la p94 au niveau de la ligne M, de la ligne N2, et éventuellement au niveau de la ligne N1 à proximité de la strie Z.

### III.1.3 La titine, une protéine indispensable à la viabilité du sarcomère

#### **III.1.3.1 Généralités**

L'analyse bibliographique est ici plus détaillée au vu de l'importance de la mise en place de la structure contractile et dans son rôle de fixation de nombreuses protéines cytosoliques.

La titine est la protéine la plus abondante dans le muscle strié après la myosine et l'actine. Elle représente à peu près 10% de la masse myofibrillaire. C'est la plus grande chaîne polypeptidique identifiée à ce jour avec environ 27000 à 33000 acides aminés pour une masse moléculaire de 3000kDa. Une seule molécule de titine s'étend du disque Z à la ligne M, faisant plus d'un  $\mu\text{m}$  de longueur (Figure N°22). La titine a deux fonctions majeures :

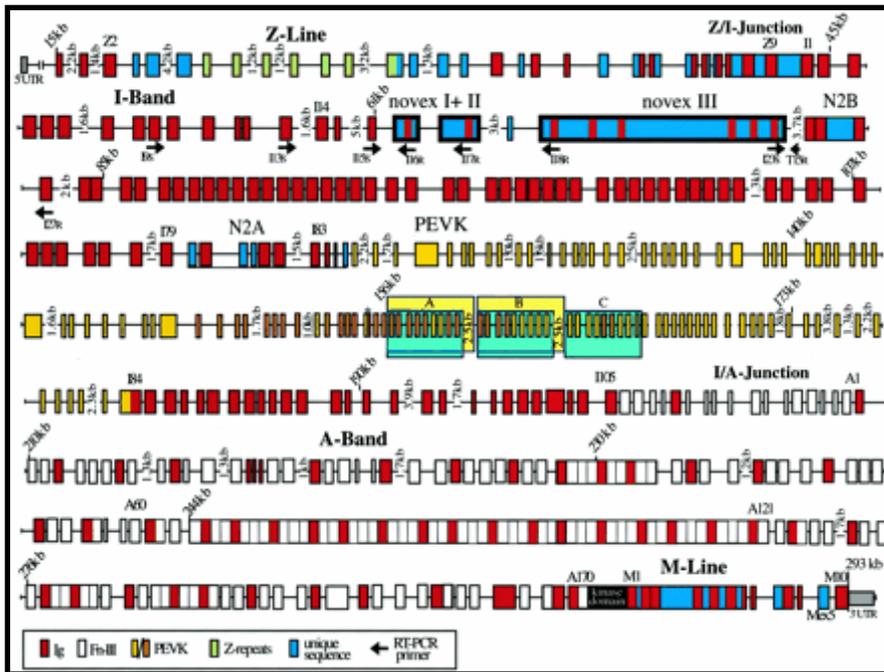
- Elle contrôle l'agencement du sarcomère en interagissant avec de nombreuses protéines (Furst D.O et Gautel M., 1995)
- Elle fournit une certaine élasticité aux sarcomères. Elle assure le maintien de la structure et oppose une résistance passive à l'étirement.

#### **III.1.3.2 Structure**

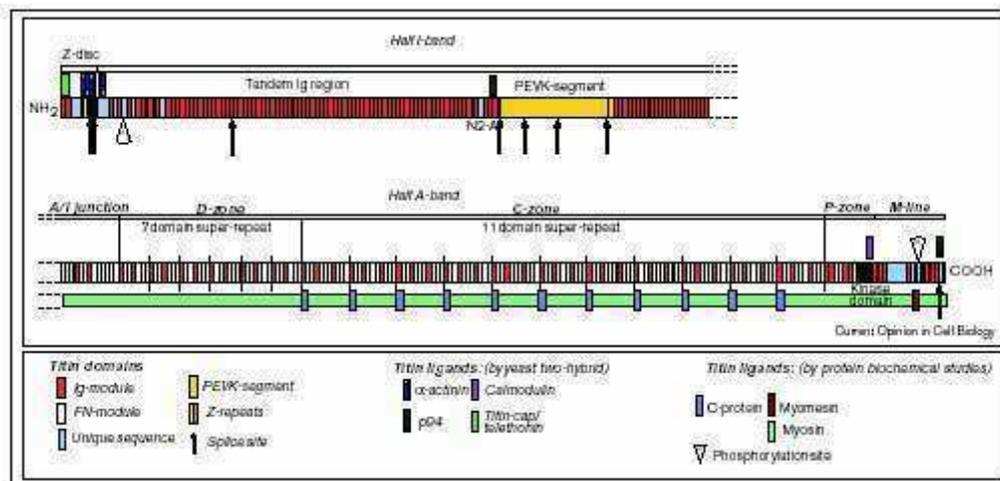
La séquence de la titine est constituée en grande majorité par des répétitions de motif. A ce jour seule la séquence de l'isoforme cardiaque est connue. Elle est composée de 132 répétitions d'un motif de 100 résidus homologue à la fibronectine de type III (FNIII), et de 166 répétitions d'un motif de 90 à 95 résidus homologue au domaine C2 des immunoglobulines.

- **Eléments constitutifs**

La structure tridimensionnelle des domaines de type Ig a été déterminée par résonance magnétique nucléaire. Ils s'organisent en feuillets $\beta$ . Ces domaines sont situés en grande majorité au niveau de la bande I. Ils appartiennent à la classe intermédiaire des immunoglobulines. Les immunoglobulines peuvent fixer une large variété de ligands grâce à leur brin variable. Elles peuvent favoriser également l'interaction en disposant correctement l'agent interactif (Williams A. F. et Barclay A. N., 1988).



**Figure N°23:** représentation schématique du gène de la titine. Le gène comporte 363 exons (d'après Bang *et al.*,2001).



**Figure N°24:** organisation de la titine squelettique au sein du sarcomère. On distingue le site de fixation de la kinase au niveau de la ligne M, la super répétition 11 dans la bande A et la région PEVK flanquée des domaines de type immunoglobuline.

La structure tridimensionnelle des fibronectines est à peu près équivalente à celle des domaines de type Ig. Les domaines de type FNIII se localisent plutôt au niveau de la région de titine appartenant à la bande A. Toutes les deux ou trois répétitions s'intercalent un module Ig (Muhle-Goll *et al.*, 1998). Les extrémités N- et C-terminale des domaines Ig et FNIII sont à des extrémités opposées ce qui favorise la connexion de plusieurs domaines indépendants. La combinaison de domaines Ig et FNIII a déjà été observée dans bon nombre de protéines musculaires (Kenny *et al.*, 1999).

La titine s'étend de la strie Z à la ligne M soit à peu près un demi sarcomère. Elle présente, dans certaines régions, des particularités structurales qui sont corrélées à ses diverses fonctions. La figure N°23 qui représente de manière schématique le gène de titine illustre bien les différentes organisations en fonction de la région du sarcomère.

- **Organisation de la titine au niveau de la ligne M**

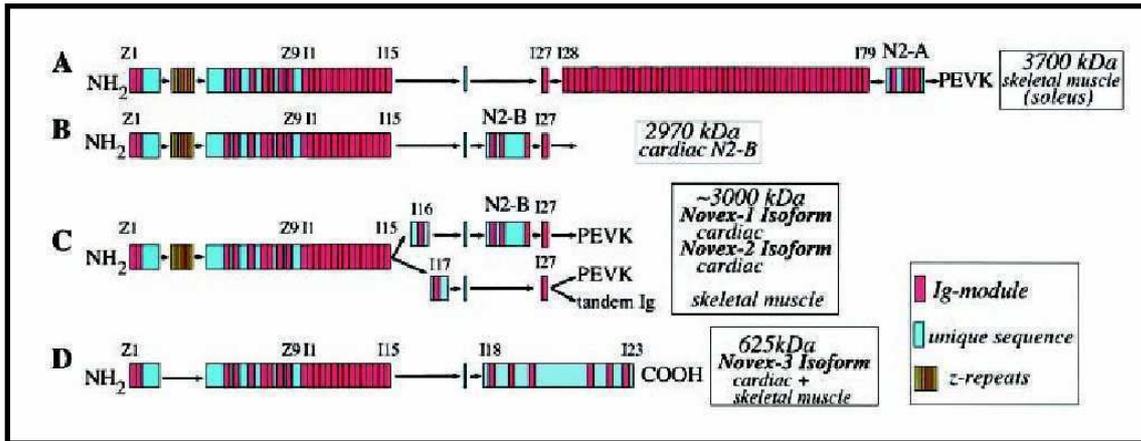
Au niveau de la ligne M, on retrouve une structure de type sérine-thréonine kinase (Benian *et al.*, 1989) (Figure N°24). La téléthonine l'un de ses substrats potentiels, est située au niveau du disque Z soit à 1µm du complexe kinase dans le sarcomère. Pourtant au cours de la différenciation cellulaire, la partie C-terminale de la titine est colocalisée avec la téléthonine dans les précurseurs des myofibrilles. La kinase semble donc agir au niveau de l'assemblage du sarcomère.

- **Organisation de la titine au niveau de la bande A**

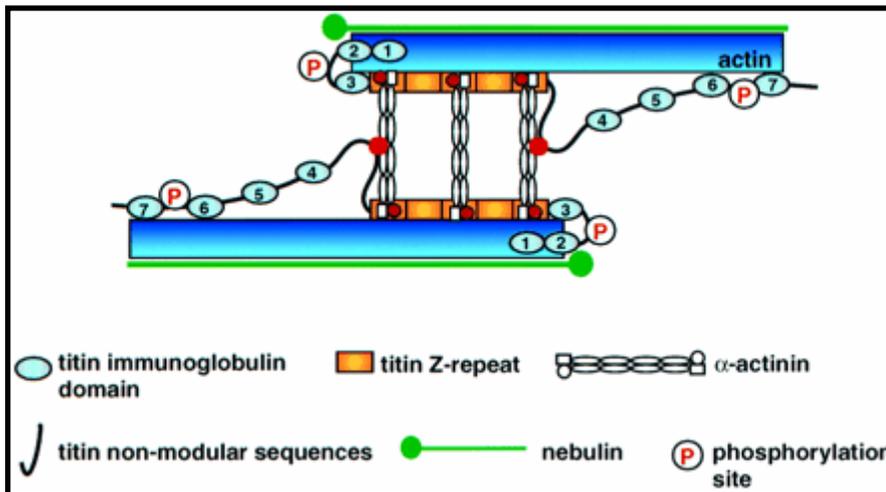
La région de la titine au niveau de la bande A est disposée en un arrangement spécifique de 11 domaines répété 6 fois. Il s'agit de la super répétition 11 (Figure N°24). Sa longueur équivaut à la distance entre deux molécules de myosine. Or dans cette région la titine est fortement associée à la myosine. Bien que la myosine forme *in vitro* des filaments épais en l'absence de titine, ils ont des longueurs différentes à l'inverse des filaments observés *in vivo*. On peut penser que la titine régit l'ordonnement de la myosine et des autres protéines du filament épais.

- **Organisation de la titine au niveau de la bande I**

La région de la titine dans la bande I est riche en domaines de type Ig (Figure N°24). Ils sont à l'origine de l'allongement de la protéine dans les sarcomères de longueur normale. Les études en microscopie électronique montrent que *in situ*, les domaines Ig s'étirent uniquement par redressement de la structure et sans nécessité de déplier les modules. A ce niveau il existe une séquence riche en résidus de type Proline (P), acide glutamique (E),



**Figure N°25: Différentes isoformes de la titine du muscle strié squelettique et cardiaque.** L'isoforme de titine dans le muscle squelettique fait près de 3700kDa et contient les séquences PEVK et N2A(A). Les deux isoformes majeures que l'on retrouve dans le muscle cardiaque sont l'isoforme de 2970kDa comprenant la séquence N2B et l'isoforme de 3300kDa(B). Cependant il existe deux autres isoformes mineures(C). L'isoforme novex-3 de 700kDa environ est exprimée dans tous les muscles striés(D) (d'après Bang *et al.*,2001).



**Figure N°26: Structure moléculaire de la strie Z.**

Les Z-repeats coordonnent l'assemblage des molécules d' $\alpha$ -actinine et par conséquent le nombre de Z-repeats conditionne l'épaisseur des disques Z (d'après Young *et al.*,1998).

Valine (V), lysine (K) qui serait la composante élastique du sarcomère. Toutefois Minajeva *et al.* (2001) suggèrent un modèle où le dépliement des domaines Ig est aussi impliqué dans l'élasticité de la protéine. Ce phénomène demeure néanmoins mineur dans des conditions physiologiques. La région PEVK a une longueur variable selon le type de muscle et son degré d'élasticité. Tatsumi *et al.* (2001) ont montré que la forte charge nette négative de cette région dans des conditions physiologiques lui permettrait de fixer le calcium avec une forte affinité.

La structure du muscle cardiaque posséderait un troisième élément élastique situé au centre de la bande I, la séquence N2-B. Cette isoforme est indispensable dans la cellule cardiaque où elle assure l'extensibilité et le maintien de la structure des myofibrilles. (Linke *et al.*, 1999). Cette séquence contiendrait un segment en N-terminal qui stabiliserait la structure du filament d'actine. Il a été inventorié différentes isoformes que comportent les muscles striés. Citons en exemple, une isoforme comportant un domaine particulier, le domaine novex 3 qui serait présente à la fois dans le muscle squelettique et le muscle cardiaque (Bang *et al.*, 2001) (Figure N°25).

Au voisinage de la jonction AI, Labeit et Kolmerer (1995) identifient une région qui serait reconnue par des sérums d'animaux immunisés contre la protéine entière de titine. Cette région serait le principal site antigénique bien qu'il n'y ait pas de différences notoires au niveau des séquences primaires en cette région et les autres.

- **Organisation de la molécule de titine au niveau de la strie Z**

Au niveau de la strie Z c'est à dire la région N-terminale de la titine on distingue une série de répétitions de 45 acides aminés en alternance avec des séquences uniques et des domaines Ig (Figure N°26). Ces répétitions sont appelées « Z-repeats ». Ces structures se lient à la partie terminale de l' $\alpha$ -actinine. Le nombre de répétitions est corrélé à l'épaisseur des disques Z (Gautel *et al.*, 1996).

### ***III.1.3.3 Interactions avec la structure contractile***

Comme cela fut remarqué précédemment, une seule molécule de titine couvre la moitié d'un sarcomère. Les caractéristiques structurales mettent en lumière les nombreuses possibilités de former des ligands notamment avec les « Z-repeats » ou encore dans la région de la bande A. Donc de la strie Z à la ligne M, on peut établir une cartographie des interactions de la titine avec les protéines myofibrillaires (Figure N°24).

Au niveau de la strie Z, on retrouve la téléthonine qui coiffe la partie N-terminale de la titine (Gregorio *et al.*, 1998). La téléthonine serait un substrat potentiel de la sérine-thréonine kinase. La titine par l'intermédiaire de ses « Z-repeats » interagit avec la partie C-terminale de l' $\alpha$ -actinine (Astier *et al.*, 1992) assurant ainsi son ancrage à la strie Z.

Kimura et Maruyama (1983) ont montré qu'au voisinage de la strie Z, la titine s'associerait à l'actine ; des résultats confirmés par Astier *et al.* (1998). Régulés par les phospholipides, cette interaction agirait sur le dépliement des domaines Ig de la titine et par conséquent garantirait le maintien de l'assemblage myofibrillaire au cours du travail musculaire (Raynaud, 1999).

Au niveau de la bande I, Sorimachi *et al.* (1995) ont observé des sites de liaison entre la titine et la calpaïne, une protéase spécifique du muscle. Cependant la bande I est sujette à un épissage alternatif qui induit une absence de ce site chez certaines isoformes.

La titine pourrait être également en interaction avec la tropomyosine, une protéine de régulation du filament fin (Raynaud, 1999).

Tout le long de la bande A, la titine possède de multiples sites de fixation des protéines du filament épais en particulier la myosine (Labeit *et al.*, 1992) mais aussi la protéine C (Freiburg *et al.*, 1996) ou encore l'AMP désaminase.

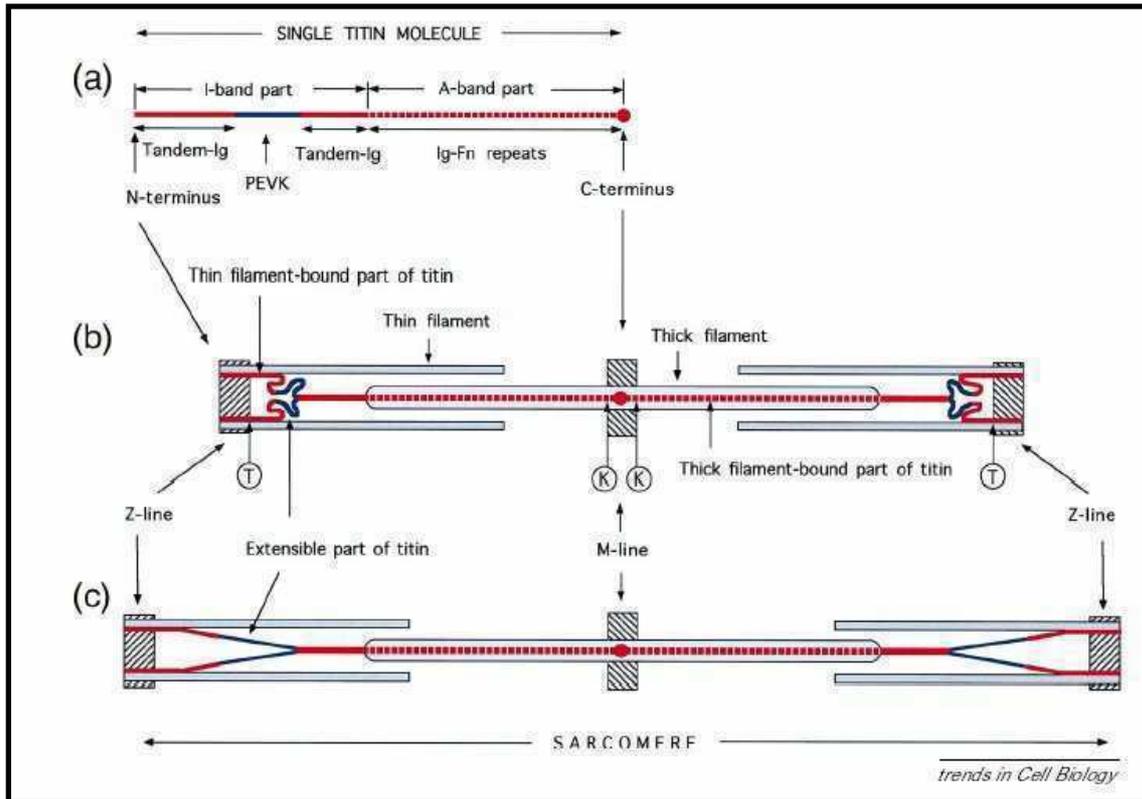
Au niveau de la ligne M, la partie C-terminale de la titine montre des possibilités d'association avec la myoméline qui une fois phosphorylée n'interagit plus avec la titine (Oberman *et al.*, 1997), la protéine C ainsi que la protéine M (Wang *et al.*, 1992).

Sorimachi *et al.* (1995) montrent la fixation de la p94 via la séquence IS2 à la partie C-terminale de la titine au niveau de la ligne M. Ces deux protéines sont plus ou moins impliquées dans la myopathie des ceintures ou LGMD2A.

#### ***III.1.3.4 Fonctions physiologiques***

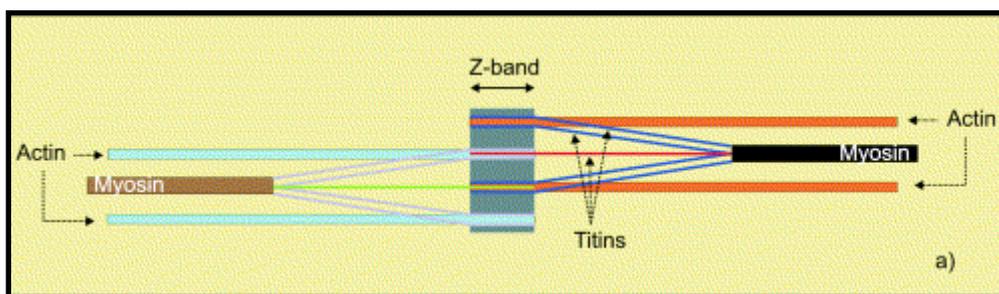
- **La titine: L'architecte moléculaire de la myofibrille**

La titine interagit avec plusieurs protéines musculaires comme l'actine, l' $\alpha$ -actinine, la protéine C, la myosine, la myoméline ou encore la M-protéine. Ce réseau d'interactions est en parfaite adéquation avec les positions de ces protéines au sein du sarcomère. Donc le bon agencement établi par les interactions suppose que la titine tient une place importante dans l'assemblage du sarcomère (Labeit and Kolmerer, 1995). Par ailleurs la fixation de molécules de titine sur deux filaments fins du même sarcomère associé à la fixation d'une troisième



**Figure N°27: La composante élastique de la titine.**

La molécule de titine est en rouge hormis la région PEVK qui est de couleur bleue. Le domaine kinase et la téléthonine sont annotées respectivement par K et T. (a) représente les différents segments de la molécule alors que (b) et (c) illustrent la configuration que prend la molécule lors de deux cas d'étirement du sarcomère. L'étirement du sarcomère s'accompagne dans un premier temps de l'allongement des domaines de type immunoglobuline puis du déploiement de la région PEVK (d'après Trinick and Tskhovrebova, 1999).



**Figure N°28: Schéma du possible arrangement des molécules de titine dans deux sarcomères adjacents (d'après Knupp *et al.*, 2002).**

molécule de titine sur le filament fin de polarité opposé, au niveau de la strie Z garantit la stabilité mécanique du sarcomère (Liversage *et al.*, 2001). La titine contrôle l'intégrité du sarcomère.

Dans une culture de myoblastes issus de muscle de poulet, la titine est exprimée avant les protéines myofibrillaires (Colley *et al.*, 1990). Elle est aussi la première protéine à avoir une certaine organisation au cours du développement du cœur de poulet. Le stade précédant les battements du cœur révèle un cœur avec la titine et l' $\alpha$ -actinine à l'organisation bien définie alors que l'actine est toujours à l'état filamentaire et proche de la membrane (Ehler *et al.*, 1999).

*In vitro*, lors du développement de la cellule musculaire, la titine est organisée avant la myosine. Cependant chaque étape de la maturation de la myosine conduit à une nouvelle organisation de la titine. La titine s'organise donc avant les autres composants myofibrillaires ce qui suggère une implication importante dans la myofibrillogenèse. (Fulton and Alftine, 1997).

Quand on compare l'organisation de la titine avec celle des autres protéines myofibrillaires, il est clair qu'elle précède l'accumulation des filaments épais (Wang *et al.*, 1988). L'ossature stable du sarcomère se compose de l' $\alpha$ -actinine au niveau du disque Z, de la titine et sans doute de la myoméline qui est connue pour ses capacités d'interaction avec la titine et la myosine. Les filaments épais surviennent par la suite. Les régions de la titine situées au niveau des bandes I ainsi que vers la ligne M n'atteignent leur organisation finale que très tard.

- **La composante élastique du sarcomère**

Durant la phase initiale d'étirement du sarcomère, les domaines Ig s'allongent et le sarcomère s'étire sans générer de tension. Quand les régions Ig ont atteint leur étirement maximal, il faut générer une force capable de s'opposer à la tension et ainsi permettant l'étirement du sarcomère. Elle est possible grâce au déploiement de la région PEVK de la titine (Figure N°27). Ce mécanisme n'est pas encore bien connu car la structure tridimensionnelle n'a pas encore été élucidée.

Par ailleurs les travaux menés par Knupp *et al.* (2002) indiquent que l'organisation des molécules de titine au niveau de la bande I permettrait de garantir la stabilité du sarcomère mais également du sarcomère adjacent face aux contraintes mécaniques. Ainsi deux molécules de titine interagissent avec un filament d'actine alors qu'une autre molécule de

titine interagit, au niveau de la strie Z, avec un filament d'actine de polarité opposée (Figure N°28).

- **La titine: L'architecte moléculaire du chromosome**

Machado *et al.* (1998) ont montré que la titine ou une protéine analogue était exprimée dans les chromosomes de la drosophile. Les expériences d'immunohistochimie révèlent une distribution uniforme de la titine dans les chromosomes mettant en lumière son implication au niveau de la condensation des chromosomes lors de la mitose. Cette découverte tend à donner à la titine le rôle d'agenceur au niveau du chromosome.

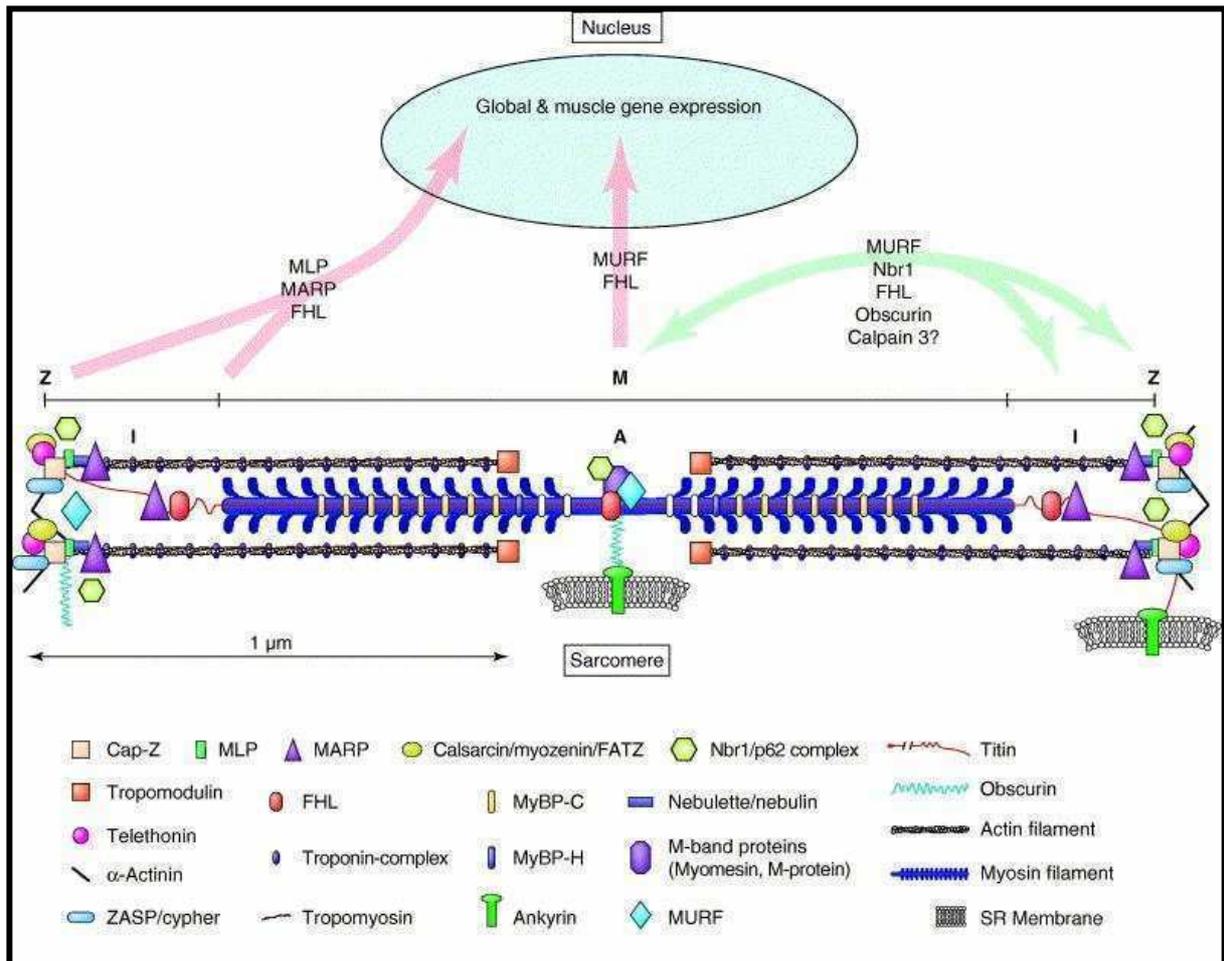
Cette théorie est renforcée par les observations d'un diamètre axial constant ou encore des propriétés élastiques des chromosomes similaires aux propriétés élastiques de la titine dans le muscle (Houchmandzadeh and Dimitrov, 1999). Cette théorie demeure toutefois controversée.

### ***III.1.3.5 Pathologies associées***

La titine a subi peu de mutations au cours de l'évolution. Elle semble être indispensable à la viabilité de la cellule musculaire. A cause de sa taille énorme et en regard de son implication dans l'architecture myofibrillaire, le gène de la titine semble être un bon candidat à de nombreuses pathologies neuromusculaires.

Harris *et al* (2003) ont induit une dégénérescence musculaire chez des rats à l'aide d'un agent myotoxique, afin d'étudier ses différentes étapes. Ils montrent que les premières protéines à être hydrolysées sont la desmine et la titine. Ces dégradations surviennent à l'issue d'une entrée de  $Ca^{2+}$  au niveau du site d'altération de la membrane. Bien avant la dystrophine, la dégradation de la titine et de la desmine entraîne la désintégration du sarcomère. Il s'ensuit alors la libération des protéines contractiles dans le cytoplasme où elles sont dégradées.

Haravuori *et al.* (2001) indiquent qu'un cas de myopathie des ceintures (LGMD2A) présente une perte complète d'activité de la calpaïne 3, ligand de la titine. Pourtant une mutation du gène codant pour la p94 est à exclure dans ce cas. La titine en subissant une mutation sur le chromosome 2q induirait une dystrophie progressive des membres inférieurs. La perte d'activité de la calpaïne 3 serait la résultante de cette mutation qui aboutirait au final à une myopathie des ceintures.



**Figure N°29 : Réseau de protéines cytosquelettiques coordonnées par la titine (Lange *et al.*, 2006)**

### ***III.1.3.6 Conclusion***

Il est indéniable, au travers des données bibliographiques accumulées sur la titine, que cette énorme protéine filamenteuse est vitale pour la cellule musculaire.

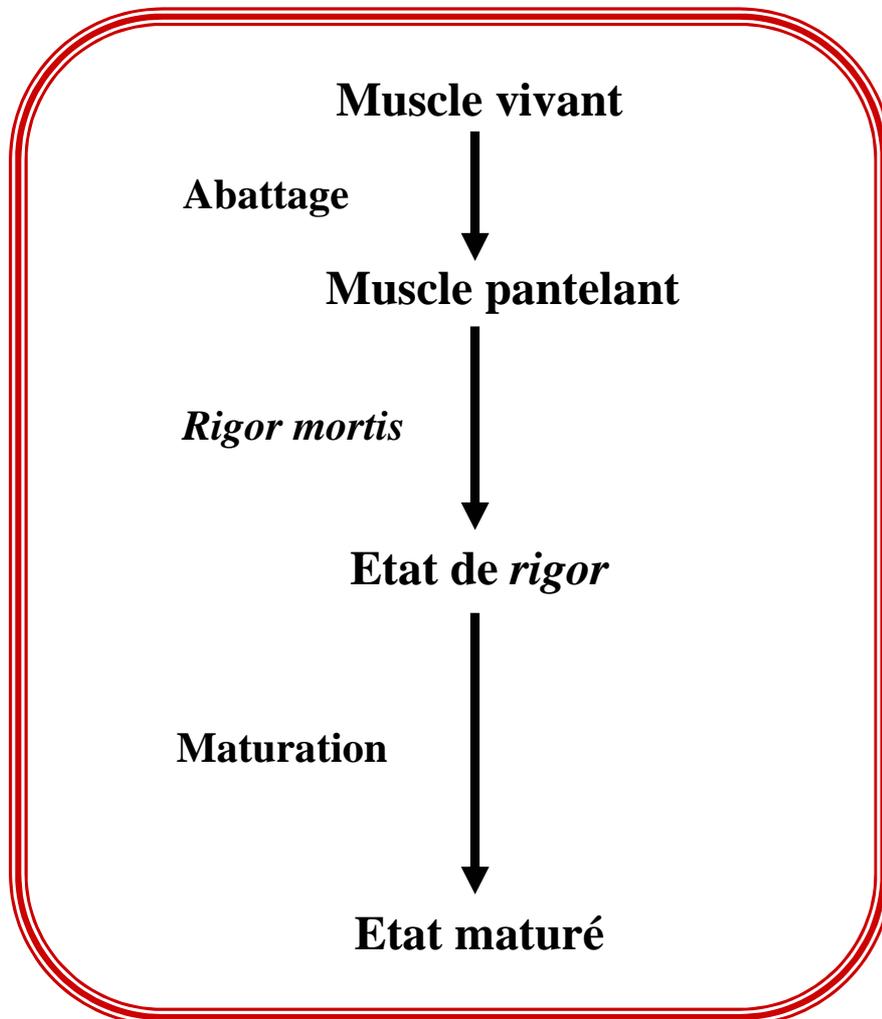
En apparaissant très tôt lors de la myogenèse, elle constitue l'ossature de base sur laquelle les protéines de la structure contractile viennent se greffer. Plus tard dans la cellule, elle définit et régit toute l'architecture myofibrillaire notamment le filament épais qu'elle garde centré et uniforme. La titine tiendrait à peu près le même rôle auprès des chromosomes en phase de mitose. Elle est aussi le garant de l'intégrité physique du sarcomère grâce à ses éléments élastiques situés dans la région de la bande I. Le segment PEVK mais aussi les domaines Ig adjacents ainsi que le segment N2-B spécifique de la cellule cardiaque permettent aux sarcomères de retrouver leur longueur initiale après un étirement quelconque. Il faut signaler que le collagène, les microtubules ainsi que les filaments intermédiaires contribuent à cette élasticité du muscle (Granzier and Irving, 1995).

Il apparaît évident pour les mêmes raisons énoncées précédemment et au regard de la bonne conservation au cours de l'évolution de la protéine, que le gène de la titine semble être un bon candidat aux pathologies. Dans le cas de la myopathie des ceintures, plusieurs études font état de possibles mutations de la titine au niveau du chromosome 2 mais aucune n'a été identifiée à ce jour.

L'apparition de la séquence complète du gène comportant 363 exons serait peut être une voie d'études pour d'éventuelles mutations sur le gène de la titine. Autant de réponses qui permettront de savoir si les dystrophies musculaires et autres cardiomyopathies sont provoquées par des dysfonctionnements de la titine (Bang *et al.*, 2001).

La titine semble agir comme un socle où une douzaine de protéines de la strie Z à la ligne M viennent se fixer. De ce fait, elle est donc indispensable dans la structuration du sarcomère. Récemment, son importance s'est accrue avec l'émergence d'un concept de réseau de protéines cytosquelettiques centrées autour de la titine (Figure N°29), qui échangeraient des signaux moléculaires avec des protéines cytoplasmiques partenaires (Wang *et al.*, 2005).

Ces signaux moléculaires semblent être des réponses adaptatives à des stimuli mécaniques ou exogènes. A ce titre la kinase de type sérine-thréonine serait le parfait relais entre signaux et réponses (Lange *et al.*, 2005). Les échanges se font le long du filament de titine c'est-à-dire de la strie Z vers la ligne M et inversement. En outre, on peut également assister à des translocations nucléaires (Lange *et al.*, 2006). Les auteurs ciblent un certain nombre de protéines comme l'obscurine, MURF (**M**Uscle **R**ing **F**inger) ou encore MARP



**viande** Figure N°30 : Etapes successives de la transformation du muscle en

(**M**Uscle **A**nkyrin **R**epeat **P**rotein). Ils mettent également l'accent sur une possible motilité de la calpaïne 3 au sein du sarcomère. L'enzyme forme déjà au niveau de la région N2A un complexe avec la titine, la myopalladine et MARP qui pourrait être sensible aux stimuli mécaniques (Miller *et al.*, 2003). Il apparaît nécessaire de préciser la localisation de la calpaïne 3 au niveau de la strie Z et de la ligne M au sein de complexes protéiques qui semblent être les bornes du « signalosome » musculaire.

### ***III.2 Cas particulier d'une dégradation multienzymatique : l'attendrissage de la viande***

Après l'abattage des animaux et la réfrigération des carcasses, le temps qui s'écoule jusqu'à l'achat de la viande par le consommateur peut être plus ou moins long selon le mode de distribution. Au cours de cette période de conservation, les muscles sont le siège de transformations complexes qui conditionnent en grande partie les qualités organoleptiques de la viande : tendreté, jutosité, saveur.

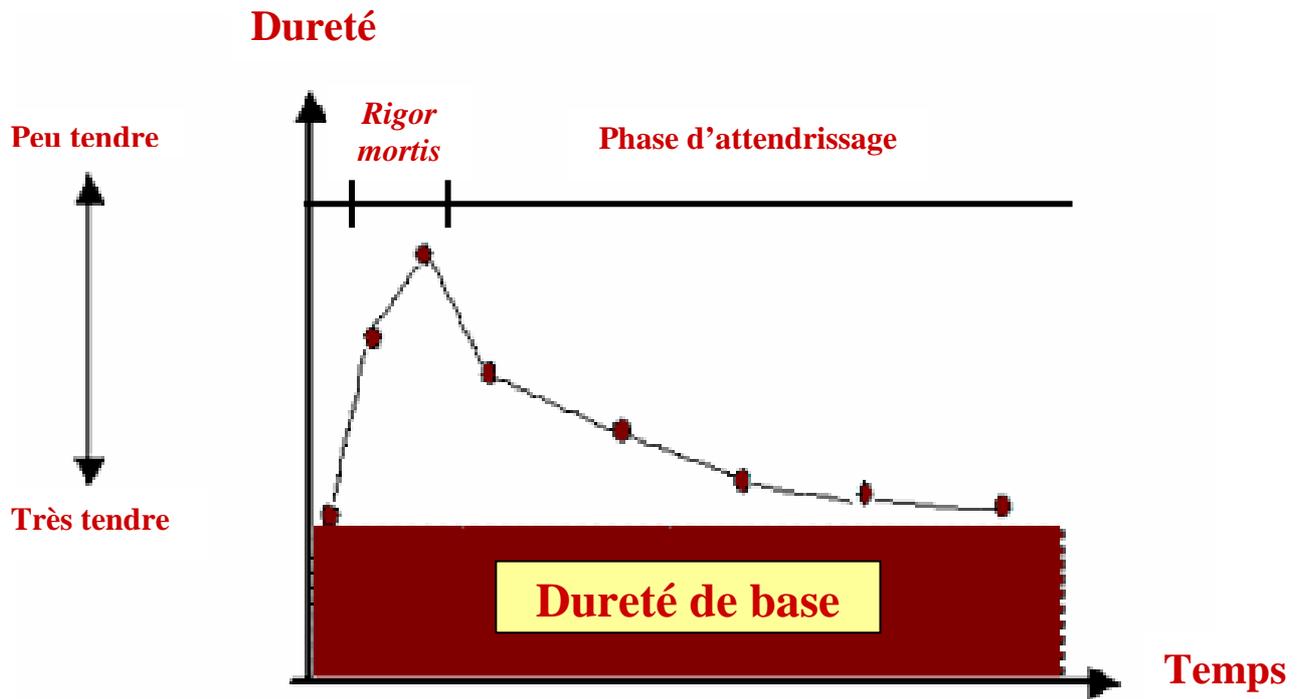
La tendreté est la qualité qui évolue le plus. Le processus de transformation du muscle en viande repose sur trois étapes (Figure N°30) :

- L'état pantelant
- L'état rigide.
- L'état mûré est le point final du processus. Elle est très importante d'un point de vue organoleptique car elle conduit à une augmentation de la tendreté (Figure N°31).

#### **III.2.1 Les différentes phases de cette transformation**

##### ***III.2.1.1 La saignée et l'état pantelant***

Après l'abattage, la saignée vise à éliminer le maximum de sang de la carcasse. Cette action engendre une privation des cellules en nutriments et en oxygène. Le muscle fonctionne jusqu'à épuisement des réserves énergétiques. Le manque d'oxygène conduit également à un certain nombre de mécanismes anaérobies et une diminution du potentiel oxydant du muscle. Parallèlement à ces mécanismes cellulaires, des contractions musculaires subsistent sans doute en raison des excitations nerveuses. Cette phase est dénommée l'état pantelant et a



**Figure N°31** : Schéma d'évolution de la dureté du muscle pendant la phase de conservation à l'état réfrigéré (d'après Ouali, 1990)

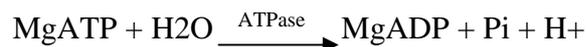
une durée variable selon l'espèce considérée mais qui coïncide avec la durée de vie du système nerveux. Cette phase est encore, à ce jour, mal définie et mal comprise.

### ***III.2.1.2 La rigidité cadavérique ou rigor mortis***

Avec la fin de la phase dite "pantelante", la rigidité cadavérique s'installe progressivement. Elle se caractérise par des tissus musculaires plus durs, inextensibles et des axes osseux plus difficiles à déplacer chez l'animal. La *rigor mortis* est la résultante de 2 grandes caractéristiques:

- une baisse de pH, donc une acidification du tissu musculaire.
- une contraction des fibres musculaires.

Dans le tissu musculaire après l'abattage des animaux l'ATP est constamment et lentement hydrolysée selon une réaction du type :



On libère un proton pour 2 ATP consommées. Les molécules d'ATP utilisées par la réaction proviennent de molécules de glucose dégradées en anaérobiose, tout apport d'oxygène étant interrompu par l'arrêt de la circulation sanguine. Toutefois, interviennent dans le même temps deux réactions de rephosphorylation :

- $\text{MgADP} + \text{PC (phosphocréatine)} + \text{H}^+ \longrightarrow \text{MgATP} + \text{créatine}$
- $3\text{MgADP} + 3\text{P}_i + 1\text{glucose} + \text{H}^+ \longrightarrow 3\text{MgATP} + 2\text{lactates}$

L'acide lactique provenant de la glycolyse s'accumule dans le tissu musculaire. Chaque molécule d'acide lactique produite est associée à la libération d'environ un proton ce qui acidifie progressivement le muscle. On constate que l'acidification est due au turn-over de l'ATP. Donc la vitesse d'acidification sera fonction de la vitesse du turn-over. Après la mort, le turn-over de l'ATP sera assuré tant que les réserves de PC et de glycogène le permettront et que la baisse du pH n'inhibera pas la voie glycolytique. L'amplitude de la baisse de pH sera donc fonction des réserves énergétiques.

Cette contraction ne peut être due à un influx nerveux comme lorsque l'animal est vivant. Sa cause, ici, ne peut être que chimique.

Immédiatement après abattage, le muscle possède une réserve d'ATP suffisante pour maintenir la dissociation de l'actine et de la myosine. Par conséquent il garde son élasticité.

Mais les molécules d'ATP hydrolysées doivent être remplacées par de nouvelles molécules provenant de la glycolyse anaérobie (tout apport d'oxygène étant interrompu par l'arrêt de la circulation sanguine.) ; or nous venons de voir que ce remplacement provoque une acidification du tissu musculaire.

Cette baisse de pH inhibe les ATPases sarcoplasmiques, des pompes à calcium maintenant le gradient de calcium, provoquant une fuite de calcium du réticulum vers le cytosol. Quand la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  atteint  $10^{-6}$  M, l'activité ATPasique de la myosine commence : formation du complexe actine-myosine, la fibre musculaire se contracte.

Les réserves énergétiques du muscle (ATP, PC, glycogène) sont peu à peu consommées et l'acidification augmente inhibant les enzymes de la glycolyse anaérobie. On arrive à un pH ultime de 5,5 où le nombre de liaisons actine-myosine est maximum et où l'ATP a été consommée: C'est la rigidité cadavérique, l'état de *rigor mortis*. Si la fuite de  $\text{Ca}^{2+}$  a lieu quand le pH est de 6.0-5.8 : il n'y a pas de contraction car l'activité ATPasique qui en serait responsable est alors inhibée par les bas pH.

Par ailleurs on observe une variation des espaces intra- et extracellulaires dans le muscle *post mortem*. Des modifications surviennent au niveau myofibrillaire. En effet on observe une diminution de l'espace intramyofibrillaire chez le porc (Dutson *et al.*, 1974). Ou encore chez le bovin (Offer et Knight, 1988).

Les espaces entre les cellules sont également modifiés lors de l'entrée en *rigor*. L'évolution post mortem des espaces intra- et extracellulaires est en relation avec les mouvements de l'eau dans le muscle et la rétention d'eau (Offer et Knight 1988a, b). L'acidification du muscle fait que la charge des protéines diminue et que celles-ci devenant progressivement plus hydrophobes vont fixer de moins en moins d'eau. Ceci est conforté par la corrélation très élevée observée entre l'augmentation de l'espace extracellulaire et le pH du muscle (Guignot, 1992). La résultante de ces phénomènes est une diminution de l'espace intracellulaire associé à une augmentation de l'espace intracellulaire.

### ***III.2.1.3 La Maturation***

Il s'ensuit des modifications de texture au cours de cette phase. L'évolution de la structure myofibrillaire qui agit sur la tendreté, est consécutive à une attaque protéolytique par les protéases musculaires. D'autres mécanismes sont également concomitants aux différentes actions enzymatiques.

- **Evolution de la structure**

Les variations de tendreté de la viande sont presque essentiellement fonction de l'état des protéines du tissu conjonctif et des protéines myofibrillaires.

Les altérations *post-mortem* du collagène sont très discrètes et n'affectent pas les propriétés mécaniques du tissu conjonctif. Sa concentration et son degré de réticulation vont définir une dureté de base variable qui permet de distinguer les viandes à rôtir des viandes à bouillir. Quant aux protéines sarcoplasmiques, elles ne semblent pas être éprouvées par l'activité protéolytique durant le stockage réfrigéré. Dans le cas où elles le sont, cela n'aura aucune incidence sur la dureté du muscle. Dès lors, les transformations subies par le muscle lors de la maturation semblent concerner uniquement les protéines myofibrillaires.

- Evolution des protéines contractiles

Il n'y a pas de preuve de dégradation de l'actine et de la myosine. En revanche on observe une évolution de l'interaction actine-myosine. Le processus de maturation altère notamment l'activité ATPasique de la myosine, sensible au magnésium qui augmente au cours du vieillissement. Au niveau des muscles maturés, on a observé un allongement des sarcomères qui ferait suite à un glissement des filaments fins le long des filaments épais. Il semble donc évident que les interactions actine-myosine en grande partie responsables de la rigidité du muscle, subissent des modifications au cours de la conservation post mortem. Ces modifications contribuent à améliorer la tendreté de la viande. Une évolution de l'interaction actine-myosine sans que l'une ou l'autre ne soit réellement dégradée serait causée par une dégradation des protéines régulatrices. Malgré toutes les controverses sur la dégradation ou non de la myosine et de l'actine, nous avons récemment observé l'apparition de deux fragments d'actine de 40 et 30 kDa et un fragment de myosine S1 dans le muscle *post mortem* (Becila, résultats non publiés).

- Evolution des protéines régulatrices

Le complexe Troponine-Tropomyosine subit des altérations uniquement au niveau de la Troponine T. Plusieurs auteurs signalent l'apparition d'un produit de dégradation de 30kDa dans le muscle maturé (Olson *et al.*, 1977). Ce produit de dégradation coïnciderait avec la disparition de la Troponine T depuis que des bandes de même poids sont apparues lors de la purification de la Troponine T. Cette altération expliquerait l'évolution de l'interaction actine-myosine.

#### ○ Evolution des protéines du cytosquelette

La strie Z se dégrade pendant la phase d'attendrissage. Ce résultat est confirmé en ultrastructure. Cette dégradation est plus ou moins prononcée selon le type de muscle et l'espèce concernée. L' $\alpha$ -actinine ne semble pourtant pas être affectée par la protéolyse post mortem dans des conditions normales de réfrigération au moins pour certaines espèces.

Toutefois un fragment de taille très proche de la protéine native est libéré pour une période d'attendrissage très longue chez le bovin. Ce phénomène provient de la libération d'un fragment de 10kDa de l' $\alpha$ -actinine.

A l'inverse des autres réseaux filamenteux, les filaments longitudinaux sont dégradés. La nébuline est rapidement dégradée pendant les premiers jours post mortem mais il est difficile de lui attribuer un rôle significatif dans le phénomène d'attendrissage des viandes. En effet la nébuline est dégradée aussi bien dans les viandes dures que dans les viandes dites tendres.

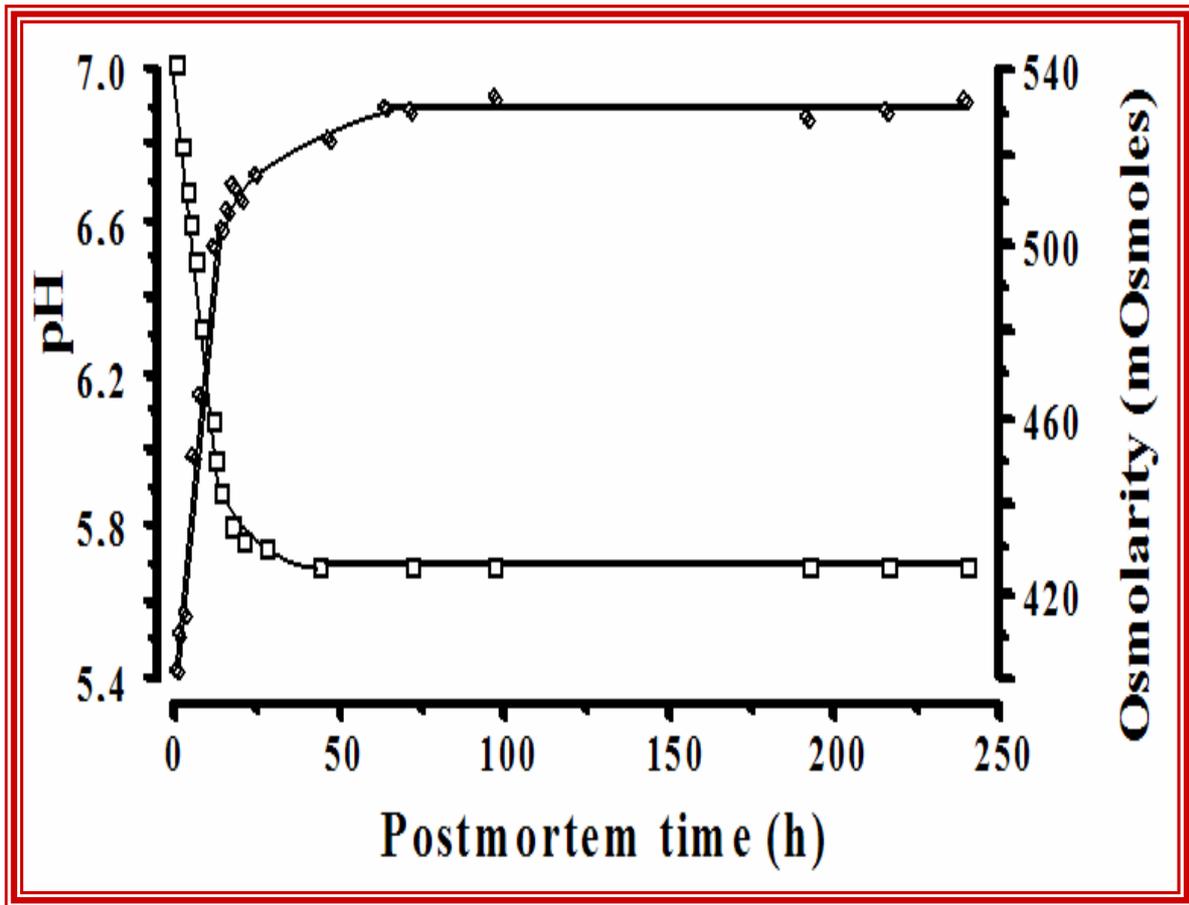
La titine subit des altérations dans le muscle mûri. Néanmoins l'apport de ces altérations dans le processus de maturation demeure controversé. Ainsi Paterson et Parrish (1987) ont montré qu'après sept jours post mortem, la concentration de titine dans un muscle tendre est beaucoup moins importante que dans un muscle "dur". Les différences préexistantes entre le type de fibre et la longueur des sarcomères conduisent à minimiser ce résultat. A l'inverse certains muscles en phase d'attendrissage n'enregistrent que très peu de changements au niveau de la titine.

L'évolution des différentes structures est provoquée par l'action protéolytique de différents systèmes enzymatiques endogènes mais il ne faut pas occulter la pression exercée par les facteurs physico-chimiques.

### ***III.2.1.4 Mécanismes physico-chimiques***

- **La température**

Elle a une influence importante sur le déroulement du processus. La température du muscle n'étant plus régulée, elle décroît de 38°C à 4°C, température habituelle de stockage des carcasses. La chute de température altère le réticulum sarcoplasmique. Une réfrigération rapide peut provoquer une diffusion précoce du calcium dans la fibre musculaire et engendrer



**Figure N°32** : Evolution *post mortem* du pH et de l'osmolarité du muscle *Longissimus dorsi* bovin stocké 24h à 15°C puis à 4°C (d'après Ouali, 1990b)

une contracture à froid. Ce phénomène affecte de façon irréversible le degré de contraction au moment de l'entrée en rigor mortis et par voie de conséquence, la tendreté ultime de la viande.

- **Le pH**

Le pH du muscle au cours de l'installation de la rigor mortis passe d'une valeur physiologique (7.0-7.2) à une valeur avoisinant les 5.3-5.8 (Figure N°32). Cette acidification a les mêmes répercussions sur le réticulum sarcoplasmique que la chute de température. La baisse de pH réduit la solubilité des protéines contractiles et diminue l'activité des protéases endogènes actives à pH neutres.

- **La pression osmotique**

L'accumulation d'acide lactique dans le milieu et l'augmentation d'ions mono- et divalents libres entraînent une augmentation de la pression osmotique (Figure N°32). La valeur physiologique s'en trouve quasiment doublée. Cette augmentation de l'osmolarité agit à deux niveaux distincts. Elle va d'abord contribuer directement à une altération des structures contractiles qui auront tendance à devenir plus lâches. Par conséquent, les protéines myofibrillaires augmentent leur solubilité. Elles deviennent plus vulnérables aux protéases. Enfin l'augmentation de la pression osmotique influence également l'activité de certaines enzymes sensibles aux fortes concentrations salines. C'est le cas des calpaïnes. C'est l'illustration d'une action synergique entre des mécanismes physico-chimiques et enzymatiques.

### ***III.2.1.5 Mécanismes enzymatiques***

- **Les sérines protéases**

La majorité des sérines protéases aurait une localisation extracellulaire au niveau des mastocytes (Park 1973). Cette localisation confère un rôle mineur aux sérines protéases. Toutefois, plusieurs observations font l'état de la présence de sérines protéases dans le muscle comme la kallikréine (Margolius *et al.*, 1996) ou encore la plasmine et son précurseur le plasminogène (Birkedal-Hansen *et al.*, 1993). Par ailleurs l'injection de Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride (PMSF), un inhibiteur irréversible des sérines protéases, dans la viande de bœuf aboutit à des résultats controversés. Si pour certains l'action de l'inhibiteur n'a aucun

effet sur la dureté finale, d'autres signalent une dureté finale plus élevée (Alarcon-Rojo and Dransfield, 1995) suggérant une contribution des sérines protéases dans la maturation.

Ces observations combinées à l'étude des marqueurs biologiques de la tendreté de la viande réalisée au laboratoire qui révèle de forts taux d'inhibiteurs spécifiques de ces enzymes (Zamora 1997) mettent en lumière l'hypothèse d'une possible contribution des sérines protéases au processus de maturation.

- **Le protéasome**

Pour ce complexe multicatalytique, l'étude d'une possible action au cours de la phase *post-mortem* est très limitée. Taylor *et al.*, (1995) ont montré toutefois que l'incubation de myofibrilles avec du protéasome purifié conduirait à une altération des stries Z et des bandes A et I. Plus récemment, Dutaud (1998) met en exergue la possible action du protéasome dans le muscle *post-mortem*. Cependant son action se limiterait aux viandes de type oxydatif présentant un pH voisin de 6 mais aussi aux viandes dont le pH est élevé (pH>6.0). Elle se caractérise par une large diffusion de la strie Z jusqu'à couvrir partiellement la bande I. Ces modifications structurales communes à ces deux types de viande ne sont pas reproduites par les autres systèmes enzymatiques.

Il a plus souvent été suggéré que le protéasome n'était pas impliqué dans les premiers stades de la maturation *post mortem* de la viande ou dans la désorganisation des myofibrilles. Ce rôle est plus souvent attribué aux myofibrilles (Boehm *et al.*, 1998). Néanmoins une possible hydrolyse par le protéasome est envisageable mais supposerait une action synergique de différentes protéases. Ainsi, la calpaïne donnerait des peptides hydrolysés ensuite par le protéasome.

- **Les enzymes lysosomales**

Leur action demeure controversée. En effet des inhibiteurs spécifiques des cathepsines ne suppriment pas la protéolyse *post mortem*. Par ailleurs, lors de la maturation il n'y a pas de preuve de dégradation de l'actine et de la myosine. Or ce sont des protéines contractiles sensibles à l'action des cathepsines (Ouali *et al.*, 1987, 1988 ; Koohmaraie *et al.*, 1991). Autre controverse, c'est la compartimentation des enzymes lysosomales qui les empêcherait d'accéder aux myofibrilles (Koohmaraie, 1996) sans rupture au préalable de la membrane lysosomale. A l'inverse de nombreux résultats visent à démontrer l'implication des cathepsines dans la maturation de la viande. Des études menées en histochimies montrent que dans la viande maturée, il y a une rupture du lysosome du à l'abaissement du pH (Moeller *et*

*al.*, 1977) ou à l'arrêt des pompes ioniques suite à l'épuisement de l'ATP (Hopkins, 2000). Les cathepsines sont libérées du lysosome lors de la phase *post-mortem* (Kudryashov *et al.*, 1988).

En outre l'activité des cathepsines est corrélée au phénomène d'attendrissage de la viande (Etherington *et al.*, 1987 ; O'Halloran *et al.*, 1987).

Il existerait des similitudes structurales entre le muscle maturé et l'action des cathepsines sur les myofibrilles notamment une dégradation au niveau des lignes N2 mais aussi au niveau de la jonction A-I. En plus de l'actine et de la myosine, les cathepsines dégradent beaucoup de protéines de la structure contractile et il est possible qu'elles aient plus d'affinité pour ces protéines que pour l'actine et la myosine lors de la phase *post-mortem*. Parce que certains changements biochimiques et structuraux ne peuvent être attribués à l'action des calpaïnes on peut raisonnablement penser que les cathepsines jouent un rôle dans le processus de maturation des viandes.

- **Les calpaïnes**

Elles seraient l'acteur majeur dans le phénomène d'attendrissage. Beaucoup de chercheurs convergent en ce sens.

La dégradation engendrée par les calpaïnes, à savoir la dégradation des stries Z, sont similaires aux dégradations qui surviennent lors de la phase de maturation. En outre les calpaïnes quand elles sont incubées avec les myofibrilles, sont les seules protéases qui génèrent un produit de dégradation de 30kDa, similaire à celui qui apparaît en phase d'attendrissage (Ouali, 1992). La présence de calcium augmenterait l'activité protéolytique alors qu'employé seul il n'y a aucune modification structurale. En parallèle l'addition d'inhibiteurs des calpaïnes ou encore des chélateurs du  $Ca^{2+}$  aboutit à une inhibition de l'attendrissage et des dégradations des myofibrilles (Koohmaraie *et al.*, 1988). Durant la phase *post-mortem* l'activité de la m-calpaïne reste stable alors que les activités respectives de la  $\mu$ -calpaïne et de la calpastatine diminue. La  $\mu$  calpaïne serait la seule impliquée dans la maturation de la viande (Koohmaraie *et al.*, 1987).

Le rôle de la calpaïne 3 dans le contexte de la maturation de la viande demeure à l'heure actuelle obscur. Pourtant la calpaïne 3, qui est comme on l'a vu spécifique du muscle, se fixe sur la titine au niveau de la ligne N2 (Sorimachi *et al.*, 1995 ; Kinbara *et al.*, 1997 ; Spencer *et al.*, 2002), une région où le clivage est associée à la tendreté (Taylor *et al.*, 1995). Cette observation conduit à des travaux sur l'influence de la calpaïne 3 dans la maturation de la viande. Jusqu'à aujourd'hui, les avis sont partagés sur son implication. Parr *et al.* (1999) ne trouvent pas de corrélation entre la variabilité de la tendreté et le degré

d'autolyse de la calpaïne 3 dans le muscle *post mortem*. La calpaïne 3 ne prendrait part au processus d'attendrissage (Geesink *et al.*, 2005).

A l'inverse des travaux montrent des corrélations entre l'expression de la calpaïne 3 et l'attendrissage (Ilian *et al.*, 2001a, b) et entre le degré d'autolyse de la calpaïne 3 et la tendreté de la viande d'autre part (Ilian *et al.*, 2004a, b). Tous ces résultats aussi controversés soient ils montrent l'ampleur du problème face à la p94 et son mode de régulation particulier. Son expression dans le muscle plus importante que les calpaïnes classiques, sa supposée régulation vis-à-vis de ces dites calpaïnes (Ono *et al.*, 2004) ainsi que son interaction avec la titine, protéine clé dans la maturation, sont autant d'arguments qui doivent nous amener à ne pas négliger l'importance de la calpaïne 3 *post mortem*. Nul doute qu'elle n'a pas un rôle effecteur dans le processus d'attendrissage, mais sa sensibilité limitée pour le calcium et surtout les mécanismes qui la poussent à s'activer donc à se dissocier de la titine pourraient faire de la calpaïne 3 une des premières protéases en action au même titre que les caspases.

Ainsi la participation des calpaïnes dans le processus d'attendrissage de la viande semble avoir une importance majeure. Cependant il est vraisemblable que les calpaïnes se soient pas les seules responsables du processus d'attendrissage des viandes. En effet il existe des différences entre les changements biochimiques et structuraux induits par la maturation et ceux issus de l'action des calpaïnes. Ces observations confortent l'hypothèse de l'apport d'autres systèmes protéolytiques.

- **Les caspases**

Ces cystéines protéases sont des effecteurs de mort cellulaire. Il apparaît évident que les cellules musculaires face aux conditions de survie extrêmement défavorables rencontrées après l'abattage, n'ont d'autres alternatives que de s'engager sur la voie de la mort cellulaire programmée ou apoptose. Les effets engendrés par l'apoptose pourraient alors expliquer certaines observations faites et ne pouvant être attribuées aux autres systèmes protéolytiques (Herrera Mendez *et al.*, 2006). A ce titre, les caspases pourraient être le système enzymatique le premier en action dans le processus de maturation de la viande et ce dès la *rigor mortis*. Elles sont beaucoup mieux placées que les autres pour déstructurer les structures cellulaires. Une intervention immédiate de ces peptidases apporterait la réponse aux affirmations souvent entendues, attestant que les premières heures qui suivent l'abattage sont essentielles pour le bon déroulement de la maturation de la viande.

L'analyse de l'ensemble de la littérature publiée à ce jour dans le domaine de la science de la viande indique que le processus d'attendrissage des viandes résulte très vraisemblablement de l'action synergique de plusieurs systèmes enzymatiques endogènes.

Les systèmes protéolytiques impliqués dans le processus d'attendrissage des viandes sont les mêmes que ceux qui, du vivant de l'animal, vont assurer la dégradation des protéines au cours des cycles de renouvellement successifs (Ashgar et Bhatti, 1987). Après l'analyse de l'implication de ces systèmes en phase *post-mortem*, il apparaît fondamental de les caractériser *in vivo*.

#### **IV. Conclusion générale**

Les systèmes protéolytiques et leurs inhibiteurs endogènes sont désormais relativement bien décrits dans la littérature. De tous les systèmes étudiés, le système calpaïnes/calpastatine est un de ceux où il reste beaucoup de questions en suspens. La revue de Goll *et al.* (2003) en est la parfaite illustration. Les auteurs soulèvent un certain nombre de problèmes tels que le mécanisme d'action des calpaïnes, l'interaction avec la calpastatine ou encore avec leurs substrats.

Au sein de ce système, le cas de la calpaïne 3 nous intéresse tout particulièrement. Elle représente un enjeu aussi bien pour les chercheurs en biologie musculaire que pour les scientifiques de la viande. D'un côté son implication dans la maturation n'est pas encore bien définie alors que dans le muscle *in vivo*, son absence d'activité induit une dystrophie musculaire. Dans cette revue bibliographique, nous avons pu constater que les résultats confirment une interaction de la p94 avec la titine au niveau des lignes N2 et M du sarcomère. Cette interaction confère une certaine inactivité à l'enzyme. Alors, la problématique commune des deux communautés scientifiques est de caractériser ce qu'il convient d'appeler « l'environnement protéolytique » de la calpaïne 3 à savoir les signaux et le mécanisme d'activation ainsi que les substrats qu'elle hydrolyse *in vivo* une fois activée.

Notre laboratoire et tous nos collaborateurs ont choisi cette démarche avec une priorité, préciser le ou les mécanismes d'activation de la calpaïne 3 qui se manifeste par une dissociation de l'enzyme de la titine. Cette protéine gigantesque par sa capacité à interagir avec différents ligands semble former des réseaux où des signaux moléculaires sont échangés en réponse à différents stimuli (Lange *et al.*, 2006). Dans cette revue, les réseaux centrés autour de la titine se situent au niveau des lignes N2 et M et de la strie Z. L'objectif de cette thèse est de montrer au niveau moléculaire à l'instar des lignes N2 et M que les calpaïnes,

notamment la calpaïne 3, s'associent à la titine au niveau de la strie Z. Cette hypothèse découle de résultats obtenus en microscopie électronique et localisant la calpaïne 3 au niveau des lignes N2 mais également N1. Nous montrerons la localisation de la p94 au niveau des lignes N1 et N2. Nous aborderons ensuite l'identification des sites d'interaction de cette peptidase ainsi que de la calpaïne 1 au niveau de la région N1 de la titine. Par ailleurs, nous allons aborder le rôle du calcium dans ces interactions.

Ce résultat inédit permettrait en outre de la relation avec la titine, d'étudier le comportement de la calpaïne 3 vis-à-vis des autres partenaires de la titine dans cette région dans le but d'ouvrir des voies d'exploration dans le mécanisme d'activation de la calpaïne 3.

# *Matériels et Méthodes*

## **Matériels et méthodes**

### ***I. Matériel biologique***

#### ***I.1 ADN complémentaires***

Les échantillons d'ADNc codant pour la calpaïne 3 et pour la région I2-I6 de la titine nous ont été fournis gracieusement par le Dr Isabelle Richard (Généthon, Evry, France).

#### ***I.2 Vecteur***

Pour réaliser nos clonages, nous avons utilisé un vecteur pET101/D-TOPO (Invitrogen, N° K101-01) qui nécessite l'utilisation d'ampicilline comme criblage sélectif.

#### ***I.3 Protéines***

Pour les expériences d'interaction, nous avons utilisé de la calpaïne 1 porcine, d'origine commerciale (Calbiochem, N° 208712) ainsi que de la calpaïne 3 gracieusement fournie par le Dr Isabelle Richard (Généthon, Evry).

#### ***I.4 Anticorps***

Pour réaliser les différentes immunodétections nous avons eu recours à plusieurs anticorps :

Un anticorps monoclonal commercial (Invitrogen,) dirigé contre l'étiquette Histidine placée en C-terminal a été utilisé pour la détection des protéines recombinantes possédant une étiquette histidine.

Un anticorps polyclonal dirigé contre la calpaïne 1 entière (Calbiochem)

Un anticorps polyclonal produit au laboratoire dirigé contre une séquence peptidique unique (KQESEEQQFRNIFKQK) située dans la région IS2 de la calpaïne 3

Un anticorps polyclonal commun aux 3 calpaïnes (1, 2, 3) réalisé au laboratoire dirigé contre une séquence peptidique (KSEEEIDENFKSLFRQK) correspondant à la région N-terminale du domaine III.

### ***1.5 Matériels de chromatographie***

Les supports et les colonnes pour système FPLC (Fast Protein liquid chromatography) utilisés lors de la purification des protéines recombinantes : Q-Sepharose, DEAE Sephacel ou NiNTA Sepharose ont été obtenu chez Pharmacia.

### ***1.6 Matériels de spectrométrie***

Un spectrofluorimètre Perkin Elmer de type LS-50B et un lecteur de plaques  $\mu$ QUANT (BIOTEK) ont été utilisés.

### ***1.7 Matériels relatifs à la biologie moléculaire***

Les PCR ont été effectués dans un thermocycleur Gene Amp PCR system 2400 (Perkin Elmer). L'électrophorèse ADN a été réalisée dans une cuve RUN-ONE (EmbiTec). Enfin les séquençages ont été effectués avec un ABI-310 (Applied Biosystem).

## ***II. Méthodes relatives aux acides nucléiques***

### ***II.1 Mini-préparation d'ADN plasmidique***

Toutes les purifications d'ADN plasmidique ont été conduites à partir du kit « High Pure Plasmid Isolation » (Roche, N°11 754 785 001). A partir d'une culture de la souche désirée de 4 mL on peut obtenir 10 à 15  $\mu$ g d'ADN. Après avoir culotté les bactéries par centrifugation, elles sont reprises dans un tampon 50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, RNase A 10  $\mu$ g/ $\mu$ L. La présence de RNase est essentielle pour éviter la contamination de l'ADN plasmidique par de l'ARN. Après resuspension, ajouter 250  $\mu$ L de tampon de lyse (NaOH 0.2 M, SDS 1%). Mélanger en inversant doucement le tube 4-5 fois jusqu'à ce que la solution prenne un aspect visqueux, signe que l'ADN est libéré. Ne jamais laisser agir plus de 5 min. Pour arrêter la lyse, ajouter 350  $\mu$ L de tampon de neutralisation (4 M guanidine hydrochloride, 0.5 M acétate potassium, pH 4.2). Mélanger doucement en inversant le tube. La précipitation des protéines confère un aspect trouble à l'échantillon. Pour s'en débarrasser, centrifuger (12,000 rpm, 15 min, 4°C). Prélever le surnageant en évitant le culot blanchâtre de protéines et le placer sur la colonne. Centrifuger à vitesse maximale 30s. Rincer avec 500  $\mu$ L d'une solution éthanolique dénaturante (éthanol 37%, 5 M guanidine hydrochloride, 20 mM Tris-HCl, pH 6.6) puis avec une solution saline (éthanol 80%, 20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl,

pH 7.5). Centrifuger deux fois pour éliminer toute trace résiduelle d'éthanol (Vitesse maxi, 30 s.). Eluer l'ADN en ajoutant 50µL d'eau stérile au centre de la colonne puis centrifuger (Vitesse maxi, 30 s.). L'ADN est alors conservé à -20°C.

## ***II.2 Clonage en vecteur TOPO par PCR***

### **II.2.1 Principe**

La PCR permet l'amplification, grâce à des couples d'amorces spécifiques, d'une séquence d'ADN particulière située sur un ADNc d'intérêt. Dans le cas d'un clonage par PCR, il s'agit également d'introduire au niveau des extrémités de la séquence d'intérêt des nucléotides pour permettre le clonage dans le vecteur d'expression. Dans notre cas, nous utilisons le vecteur pET101/D-TOPO® (Invitrogen). Ce clonage directionnel repose sur l'activité de la Topoisomerase I. In vivo, l'enzyme a pour rôle de couper et de religuer l'ADN lors de la réplication d'un virus. La Topoisomerase reconnaît une séquence spécifique de 5 nucléotides à laquelle elle se fixe de manière covalente pour la cliver par la suite. In vitro, l'enzyme joue le double rôle d'enzyme de restriction et de ligase. Nous avons donc fait synthétiser divers oligonucléotides (MWG) de manière à pouvoir amplifier différentes régions de l'ADNc de la calpaïne 3 humaine et de la région I2-I6 de la titine humaine. Par rapport à notre stratégie du clonage en vecteur TOPO linéarisé, nous avons adopté les principes de base suivants pour déterminer la séquence des amorces. Chaque amorce doit inclure au moins 17-18 bases complémentaires à la séquence de l'insert, pour garantir la spécificité de l'amplification. Pour médier le clonage, il est impératif de rajouter à l'extrémité 5' de l'amorce 5'→3' la séquence **CACC**. C'est cette séquence qui permet la ligature de l'insert avec le vecteur. En ce qui concerne l'amorce 3'→5', la synthèse des nucléotides doit commencer à partir du codon précédent le codon STOP. Autre précaution à prendre, éviter que le début de l'amorce 3'→5' ne comporte la séquence **CACC** ce qui pourrait induire un clonage dans la mauvaise orientation. La température approximative d'hybridation ( $T^{\circ}H$ ) de chaque oligonucléotide est calculée en utilisant la relation :  $T^{\circ}H = T^{\circ}M[(A+T) \times 2 + (G+C) \times 4] - 5^{\circ}C$  (A, nombre d'adénines; T, nombre de thymidines; G, nombre de guanines; C, nombre de cytosines de chaque amorce). La température d'hybridation retenue est généralement la  $T^{\circ}H$

la plus basse des deux oligonucléotides. Il est conseillé d'essayer dans la mesure du possible d'avoir des amorces avec une T°H proche pour éviter l'amplification aspécifique.

## II.2.2 Schéma expérimental

### **II.2.2.1 Polymerase Chain Reaction (PCR)**

La réaction en chaîne par polymérase (PCR) permet d'amplifier énormément le nombre de copies d'un fragment d'ADN double brin. L'ADN est synthétisé par la polymérase de la bactérie thermophile *Thermus aquaticus* (Taq polymérase) par extension à partir de deux amorces oligonucléotidiques.

Les PCR sont effectuées dans un volume final de 50 µl. Dans le milieu réactionnel, on utilise 10ng d'ADN moyenne, 2mM MgSO<sub>4</sub>, 0.2mM de chaque désoxynucléotide triphosphate (dNTPs), 0.2mM d'amorces sens et anti-sens correspondant aux extrémités de la région que l'on veut amplifier. Enfin on rajoute 0.2µl de *Taq platinum* (Invitrogen 11304-011) et 5µl de son tampon 10X.

La réaction est constituée de 3 étapes :

- une étape initiale de dénaturation thermique réalisée à 94°C pendant 3 minutes qui permet de déshybrider l'ADN double brin et casser les structures secondaires.
- une étape d'amplification de l'ADN totalisant 35 cycles où s'enchaînent une dénaturation de 30s à 94°C, une hybridation des amorces sens et anti-sens sur l'ADN matrice à 55°C pendant 30s et enfin une étape d'élongation qui est la synthèse du brin complémentaire par la polymérase à partir des dNTPs présents dans le milieu. Cette étape est opérée à 68°C pendant 1 min.
- une étape de terminaison de la synthèse d'ADN de 7 min à une température de 68°C qui comme son nom l'indique permet de parachever la synthèse des fragments d'intérêt.

Ce programme est un programme standard que nous avons utilisé pour le clonage de tous nos fragments.

### **II.2.2.2 Digestion enzymatique par la Dpn I**

Afin d'éviter que l'ADN provenant du plasmide d'origine ne diminue notre rendement de ligature, on procède à une digestion enzymatique par la *Dpn I*. Cette enzyme de restriction a la propriété de cliver uniquement l'ADN méthylé et semi-méthylé ce qui n'est pas le cas de nos amplicons obtenus en PCR. Dans un volume réactionnel de 60µl, on ajoute

la totalité de notre produit PCR (50µl) en présence de 2µl de *Dpn I* et de 6µl de tampon d'incubation 10X. Enfin on rajoute 2µl d'eau stérile pour compléter notre volume réactionnel à 60µl. La digestion enzymatique est réalisée à 37°C pendant une heure.

### ***II.2.2.3 Purification de l'ADN***

Pour séparer les fragments clivés de notre séquence nucléotidique d'intérêt, on procède à une purification sur une colonne STRATAPREP® (400771 Stratagène). Cette purification est articulée en deux étapes distinctes. La première repose sur la fixation de l'ADN sur une matrice de silice. Cette fixation est rendue possible par l'action d'un agent chaotrope. La seconde étape consiste à éluer l'ADN dans un tampon de faible force ionique (Tris-HCl, 10mM pH 8,0). Il est nécessaire d'effectuer un lavage à l'éthanol entre ces deux étapes pour éliminer toutes traces des contaminants.

### ***II.2.2.4 Electrophorèse en gel d'agarose***

Les analyses se font par électrophorèse en gel d'agarose (dont la concentration varie en fonction de la taille des fragments d'ADN étudiés) contenant du Bromure d'Ethidium (Bet 0,5 µg/ml). Le tampon utilisé est du TBE (Tris-borate pH 8,0 89 mM, EDTA 2 mM pH 7,5). La migration s'effectue à 100 V environ. L'échantillon d'ADN auquel est ajouté du tampon de charge (bleu de bromophénol 0,25 %, xylène cyanol 0,25 %, glycérol 40 %) est déposé sur gel. Un marqueur de taille approprié, comme par exemple le 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen), est déposé en regard des échantillons et permet ainsi d'estimer la taille des fragments d'ADN.

### ***II.2.2.5 Toporeaction***

Pour une bonne réussite de la ligature dans le vecteur TOPO, il est important de déterminer le ratio optimal insert : vecteur. D'après la littérature du fournisseur, l'efficacité de ligature est reconnue pour une plage de ratios comprise entre 0.5 : 1 et 2 : 1. Nous avons choisi arbitrairement de travailler à un ratio 1 : 1 et par conséquent ajuster toutes les concentrations des produits PCR sachant que nous avons utilisé 10 fmoles de vecteur. Tous ces calculs de ratio ont pu être réalisés grâce à la formule fournie (Invitrogen, p9 technical bulletin 15244-2).

Dans des microtubes, 0.5 à 4µl de produit PCR sont ajoutés en fonction du ratio 1 : 1 fixé. Ensuite, 1µl de solution saline concentrée (NaCl et MgCl<sub>2</sub>) est rajouté au milieu réactionnel. Par ailleurs la concentration de la solution saline est importante selon si l'on utilise des bactéries *E coli* compétentes ou électrocompétentes. Dans notre cas, nous utilisons

des bactéries compétentes TOP10 fournies avec le kit donc la solution saline est utilisée telle quelle. Le volume réactionnel est complété à 5µl avec de l'eau stérile. Enfin, 1µl de vecteur TOPO est rajouté pour un volume final de 6µl. Après une légère agitation, on laisse incuber 5 minutes à température ambiante. A la fin du temps d'incubation, le milieu réactionnel est placé dans la glace avant la transformation des bactéries compétentes TOP10

#### ***II.2.2.6 Transformation de bactéries compétentes One Shot® TOP10***

Après le clonage des fragments ADN dans le vecteur TOPO, il faut intégrer ce vecteur recombinant dans un micro-organisme afin de l'amplifier, de le purifier, de le conserver ou d'exprimer le gène qu'il contient. Cette intégration se fait par transformation génétique. Le principe est d'intégrer dans une cellule bactérienne les vecteurs TOPO recombinants obtenus après clonage. Ici on utilise des bactéries compétentes One Shot® TOP10 afin de conserver nos constructions.

Dans un tube contenant les bactéries compétentes, on rajoute 3µl de vecteur recombinant provenant de la toporéaction. Le tube est agité doucement puis incubé dans de la glace pendant 15 minutes. On rend la membrane plasmique momentanément perméable par un choc thermique de 30s à 42°C. Les tubes sont immédiatement remis dans la glace. On incorpore 250µl de milieu S.O.C aux bactéries transformées qui sont incubées à 37°C sous agitation pendant une heure. On dispose alors 100µl du mélange sur milieu gélosé Luria-Bertani (LB) contenant de l'ampicilline, l'antibiotique correspondant au gène de résistance porté par le plasmide. L'application de l'ampicilline permet aux seules bactéries ayant intégré un plasmide de pouvoir se développer. Elles vont se développer sur le milieu LB en formant une colonie équivalent à un ensemble de bactéries identiques. La croissance bactérienne dure toute une nuit à 37°C.

#### ***II.2.2.7 Analyse des clones***

- **PCR sur colonies**

Afin de vérifier la viabilité de notre construction c'est-à-dire la présence de l'insert mais aussi son orientation, on effectue une PCR à partir des clones présents sur le milieu gélosé sélectif (LB+Ampicilline).

On prélève les clones que l'on dilue dans 200µl d'eau stérile. On porte à ébullition pendant 5 minutes. De cette solution, on prélève 5µl que l'on utilise combinés à un mix PCR comprenant la Taq polymérase, le tampon 10X associé, les dNTP et les amorces. Le choix des amorces permet de vérifier également l'orientation de l'insert. En effet, en prenant comme amorce sens l'amorce T7 et comme amorce anti-sens l'amorce anti-sens de l'insert on peut

prédire la taille du fragment attendu. A titre d'exemple, un fragment de 520 paires de bases (pb) aura dans la bonne orientation une taille de 620 pb environ correspondant à la taille de l'insert plus celle du promoteur T7 longue d'une centaine de paires de bases. A l'inverse, une mauvaise orientation donnerait des fragments ADN de taille supérieure.

- **Séquençage**

Les séquences de fragments d'ADN sont déterminées selon la technique de Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Son principe repose sur un séquençage enzymatique par incorporation de didésoxynucléotides (ddNTPs). Les ddNTPs sont des désoxynucléotides (dNTPs) modifiés, capables de s'intégrer dans une chaîne d'ADN en synthèse, mais empêchant l'incorporation du nucléotide suivant. Les réactions de séquençage sont menées grâce à l'utilisation d'une enzyme thermostable sur de l'ADN plasmidique purifié dans des thermocycleurs selon le même schéma de la PCR. On utilise la méthode dite du Dye terminator où ce sont les ddNTPs qui sont marqués chacun avec un fluorophore spécifique. Elles nécessitent 10 à 50ng de matrice, un mélange réactionnel commercial BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems 4337450) ainsi qu'une concentration finale de 20 pmol d'amorce. Le programme d'amplification est le suivant : dénaturation à 96°C pendant 10s, hybridation de l'amorce à 50°C pendant 5s et élongation à 60°C pendant 4 min. L'ADN synthétisé *de novo* est précipité et lavé par 100µl de MgCl<sub>2</sub>, 93.8µl eau stérile et 261.2µl éthanol absolu respectivement, afin d'éliminer les réactifs non utilisés qui pourraient perturber la migration. Le culot d'ADN est ensuite séché 5 minutes à température ambiante et repris dans 20 µl de TSR (Template Sequencing Reagent) avant d'être dénaturé par traitement thermique à 96°C pendant 3 minutes. Les produits sont ensuite séparés par électrophorèse capillaire sur un séquenceur automatique (ABI Prism 310 Genetic Analyser, Applied Biosystems)

#### ***II.2.2.8 Transformation de bactéries compétentes BL21 (DE 3)***

Après les analyses de contrôle de la présence et de la séquence de l'insert, il faut transformer des bactéries avec notre vecteur recombinant afin qu'il exprime le gène ou la portion de gène qu'il renferme. Pour ce faire, nous allons utiliser des bactéries compétentes BL21 (DE3) qui sont des bactéries dédiées à l'expression des gènes clonés sous le promoteur T7. Des mini-préparations des clones présentant une séquence conforme sont effectuées et on récupère 50µl de vecteur recombinant purifié.

Une suspension de 50 µl de bactéries compétentes BL21 (DE3) est mélangée à 2µl de vecteur recombinant purifié. Ce mélange est conservé dans la glace pendant 30 minutes.

Comme précédemment, la transformation s'effectue selon un choc thermique opéré à 42°C pendant 30s. Les tubes sont remis dans la glace et à cette suspension on rajoute 250µl de milieu S.O.C. Il s'ensuit une incubation de 30 minutes à 37°C sous agitation (150 rpm). La totalité du produit de transformation est ensuite ajouté à 100 ml de milieu liquide LB contenant 100 µg/ml final d'ampicilline. La croissance bactérienne se déroule à 37°C pendant la nuit. Ici, à cette étape nous avons le matériel nécessaire pour pouvoir exprimer le gène sous un promoteur T7 et par conséquent obtenir nos protéines recombinantes.

### ***III. Méthodes relatives aux protéines***

#### ***III.1 Obtention des protéines recombinantes***

##### III.1.1 Expression

On ensemence les 100 ml de culture dans 4 litres de milieu LB contenant 100µg/ml d'ampicilline. La croissance bactérienne s'opère à 30°C sous constante agitation. La traduction est induite par l'addition d'1mM IPTG lorsque la Densité Optique (D.O) à 600nm atteint une valeur voisine de 0.6. La croissance bactérienne est alors poursuivie à température ambiante pendant 4 heures environ.

##### III.1.2 Purification

###### ***III.1.2.1 Solubilisation***

Pour optimiser la solubilisation de nos protéines, nous avons opté pour l'action combinée d'un traitement lytique au lysozyme et d'un traitement mécanique, la sonication.

- **Traitement lytique au lysozyme**

Après 16 heures d'induction à température ambiante, les bactéries sont culottées par centrifugation de 20 minutes à 20000g et à 4°C. Le culot bactérien est alors repris dans un tampon de lyse 50mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7.4, NaCl 500mM, MCE 5mM, Glycérol 10%, Triton X-100 1%, Lysozyme 1mg/ml, Imidazole 40mM (dépendant de la protéine). Le lysozyme permet de détruire la paroi cellulaire qui protège la membrane plasmique des bactéries par une hydrolyse des polysaccharides.

- **Traitement mécanique : la sonication**

Elle consiste en la destruction des cellules par les ultrasons. Ici, une tige de métal à l'extrémité très fine est introduite dans la suspension de cellules et induite à vibrer violemment. Les vibrations ultrasoniques réussissent à briser les ponts hydrogènes qui assurent l'état liquide de l'eau, ce qui les convertit en gaz. Il s'agit en quelque sorte d'une ébullition à froid, effectuée en agitant les molécules d'eau. Il s'ensuit une condensation du gaz dans le liquide. En se condensant, le gaz perd du volume et laisse derrière lui un espace vide. L'eau liquide se précipite dans l'espace vide pour le remplir, et les molécules d'eau liquides entrent en collision au coeur de la cavité. L'onde de choc de cette collision s'étend alors dans le voisinage. L'addition de toutes ces ondes de choc peut pulvériser les cellules. Il est à noter que le sonicateur génère beaucoup de chaleur dans le matériel biologique. Pour prévenir une élévation de la température, l'échantillon est conservé durant tout le traitement dans la glace. La sonication est réalisée 4 fois 30 secondes. A chaque sonication succède une période de repos de 30 secondes. Après la sonication on procède à une étape d'ultracentrifugation de 30 minutes à 100000g afin de clarifier le lysat et par conséquent de séparer les protéines solubles des protéines insolubles.

### ***III.1.2.2 Etapes chromatographiques***

- **Cas des protéines solubles**

- Colonne Ni Sepharose

Le lysat clarifié est alors injecté sur une colonne de Ni sepharose High performance (Amersham Biosciences, N° 17-5268-01) (8x0.5) préalablement équilibrée dans un tampon A Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50mM pH 7.4, MCE 5mM, NaCl 500mM, Imidazole 40mM. On fait passer du tampon A jusqu'à retour à la ligne de base. Les protéines contaminantes qui pourraient être accrochées sur la matrice sont éliminées dans 15% de tampon B Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50mM pH 7.4, MCE 5 mM, NaCl 500 mM, Imidazole 500 mM. Enfin notre protéine d'intérêt est éluée dans 20% de tampon B. Après électrophorèse et Western Blot, notre protéine d'intérêt est poolée et dialysée contre 40 volumes de tampon Tris 20mM pH 7.5, EDTA 5mM, MCE 5mM

- Colonne échangeuse d'anions

Le pool de protéines recombinantes est injecté sur une colonne échangeuse d'ions Q-Sepharose Fast flow (10x1.6) qui a été équilibrée dans un tampon TEM pH 7.5. Après lavage des protéines non retenues, on procède à un gradient linéaire 0 à 500 mM NaCl en 90 minutes puis de 0.5 à 1 M NaCl en 30 minutes à un débit de 2 ml/min. Des fractions de 2 ml sont collectées puis testées en électrophorèse et en Western Blot.

- **Cas des protéines insolubles**

- Dénaturation des protéines

Dans le cas des protéines insolubles, le culot après l'ultracentrifugation est conservé puis dénaturé dans un tampon Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50mM pH 7.4, MCE 5mM, NaCl 500mM, Imidazole 40mM, 10% glycérol, Triton X-100 1%, Guanidine 6M. Une fois que le culot est solubilisé, on procède à une ultracentrifugation à 100000g pendant 30 minutes pour séparer la portion soluble de l'insoluble.

- Colonne Ni Sepharose

On charge les protéines insolubles sur une colonne Ni Sepharose préalablement équilibrée avec du tampon A Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50mM pH 7.4, MCE 5mM, NaCl 500mM, Imidazole 40mM, Urée 8M. Après lavages des protéines non retenues, on élue les protéines recombinantes dans 20% de tampon B Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50mM pH 7.4, MCE 5 mM, NaCl 500 mM, Imidazole 500 mM, Urée 8M. Nous analysons les fractions en électrophorèse et en western Blot pour identifier nos fractions d'intérêt. Les fractions sont ensuite poolées pour être renaturées par dialyse.

- Renaturation ou Refolding

Les protéines récupérées sont certes purifiées mais sont dans un état dénaturé c'est-à-dire dans une forme dépliée. Pour qu'elles soient fonctionnelles, elles doivent être dans une forme repliée. C'est le refolding ou la renaturation qui permet de récupérer les protéines dénaturées dans une forme fonctionnelle.

Des dialyses successives sont effectuées pendant 72 heures à température ambiante pour permettre le refolding des protéines dénaturées.

Les protéines dénaturées sont dialysées contre 40 volumes de Tris-HCl 20mM pH 7.5, EDTA 5mM, MCE 5mM, 100mM NaCl, Urée 3M, Triton X-100 1%, Glycérol 5% puis contre 40 volumes de Tris-HCl 20mM pH 7.5, EDTA 5mM, MCE 5mM, 100mM NaCl, Urée 100 mM, Triton X-100 1%, Glycérol 1%.

### III.1.3 Analyses de contrôle

#### ***III.1.3.1 Electrophorèse***

Dans un tube eppendorf, on met 40µl d'échantillon avec 10µl de tampon de solubilisation 5X donnant lieu au final à un tampon Tris 0.05 M, SDS 3%, MCE 1%, Glycérol 7.5%, pH 6.8. On procède à une dénaturation des protéines par chauffage pendant 5 minutes. La migration des protéines s'effectue sous un courant électrique d'une tension de 80V durant la phase de concentration pour finir à 120V en phase de résolution. Le dégagement de chaleur généré par le courant électrique nécessite un circuit de refroidissement qui est assuré dans notre cas par une circulation d'eau.

Pour colorer et par conséquent mettre en évidence les protéines on dispose de deux méthodes dont la sensibilité diffère :

- la coloration au bleu de Coomassie

Les protéines sont fixées et colorées dans une solution aqueuse contenant 30% d'éthanol et 5% d'acide acétique et 1% de bleu de Coomassie pendant 20 minutes environ. Pour décolorer le gel dans le but d'augmenter le contraste, on effectue deux rinçages de 15 minutes environ dans le même tampon de fixation dépourvu de bleu de Coomassie.

- La coloration à l'argent :

. Cette coloration est plus sensible que la précédente. Nous l'avons utilisée souvent en fin de purification afin de bien contrôler le degré de pureté de nos échantillons car elle permet de détecter des contaminants pas forcément visibles au bleu de Coomassie.

Elle consiste en une fixation (2 fois 15 minutes) dans une solution aqueuse comprenant 10% d'acide acétique et 40% d'éthanol. Suite à la fixation, le gel est incubé dans une solution aqueuse de sensibilisation contenant 6.8% d'acétate de sodium et 30% d'éthanol à laquelle on rajoute 0.2% de thiosulfate de sodium dissout dans de l'eau ultrapure. La sensibilisation dure 30 minutes. Le gel est rincé abondamment par passage dans trois bains d'eau de 5 minutes. Ensuite le gel est incubé avec une solution aqueuse de coloration où le nitrate d'argent est utilisé à une concentration de 0.25%. Cette incubation se déroule à l'obscurité pendant 20 minutes. Il s'ensuit deux rinçages successifs d'une minute à l'eau

distillée. La révélation des protéines est obtenue en immergeant le gel jusqu'à l'obtention de la coloration désirée, dans une solution aqueuse de développement incluant 2.5% de sodium carbonate et 0.04% de formaldéhyde. La réaction est alors arrêtée par une solution aqueuse d'EDTA 1.46%.

### ***III.1.3.2 Western Blot***

Le Western Blot est l'analyse de détection immunochimique par excellence. Durant la thèse, cette technique m'a permis de détecter dans les fractions de purification mes protéines d'intérêt.

- **Transfert des protéines**

On dispose pour cela d'une membrane immobilion-P type PVDF (sigma ref. P-2563), de papier filtre 9x10.5 cm (GE healthcare 80-6205-40 TE26). Muni de gants, on découpe cette membrane et les deux papiers filtre à la taille du gel (6x9cm pour un mini gel). Ensuite on immerge les papiers dans du tampon de transfert (Tris 48 mM, glycine 39 mM, éthanol 20%, pH 8.7). La membrane de PVDF est trempée dans de l'éthanol 100%, rincée quelques secondes dans de l'eau distillée puis équilibrée dans le tampon de transfert.

On réalise un sandwich :

En contact avec la cathode, on dispose un papier filtre imbibé de tampon de transfert. Le courant passant de la cathode à l'anode, on doit mettre le gel puis la membrane. Enfin pour compléter ce sandwich, on rajoute le second papier. L'optimisation du transfert passe par la totale élimination des bulles pouvant être emprisonnées mais également en mettant une quantité suffisante de tampon de transfert.

On ferme doucement l'appareil de transfert sans déplacer le sandwich. Pour les minigels, on applique une tension de 10 V pendant 30 minutes ou une intensité de 0.8 mA/cm<sup>2</sup> de gel.

- **Hybridation des anticorps : cas des protéines recombinantes**

Toutes les protéines recombinantes produites au laboratoire ont une leur étiquette histidine placée en C-terminal. En se basant sur cette particularité nous avons utilisé un anticorps monoclonal (Invitrogen R932-25) dirigé contre l'étiquette histidine. En outre, cet anticorps est couplé à l'alcaline phosphatase ce qui permet de s'affranchir de l'hybridation d'un anticorps secondaire couplé à l'alcaline phosphatase.

La membrane est colorée au rouge ponceau deux à trois minutes afin de repérer les bandes de migration puis plongée dans une solution de saturation qui est le **PBS 1X+10% de**

**lait écrémé** (lait en poudre 10%, PBS 10X, triton X-100 0.1%, eau distillée). La saturation dure environ une heure.

La membrane est rincée trois fois dans un tampon de lavage PBS 1X+1% de lait écrémé puis incubée avec l'anticorps monoclonal (Invitrogen R932-25) dilué au 2000<sup>è</sup> pendant une heure minimum. On procède alors à quatre lavages de PBS 1X+1% successifs de 5 minutes chacun puis un dernier avec du PBS 1X pendant 5 minutes. La membrane est alors incubée avec le substrat.

- **Hybridation des anticorps : cas des calpaïnes**

A la différence des protéines recombinantes, nous disposons au laboratoire de sérums dirigés contre des séquences uniques de la calpaïne 1 et 3 qu'on a utilisé pour la détection des calpaïnes.

Suite à la saturation, on effectue 3 rinçages au PBS 1X+1% de lait écrémé de 5 minutes chacun. On incube alors la membrane dans le tampon de lavage dans lequel est dilué au 500<sup>è</sup> le sérum anti-calpaïne.

Après 3 rinçages successifs de 5 minutes au PBS 1X+1% de lait écrémé, on incube la membrane avec l'anticorps secondaire dilué au 2000<sup>è</sup> dans le tampon de lavage. C'est un sérum de chèvre anti-lapin couplé à la phosphatase alcaline. Cette enzyme en hydrolysant le substrat permettra de révéler les protéines reconnues par l'anticorps. L'incubation dure une heure à l'obscurité, la phosphatase alcaline étant sensible à la lumière.

Pour laver la membrane, on effectue 4 rinçages dans le tampon de lavage puis un dernier lavage dans du tampon PBS 1X avant d'incuber la membrane avec le substrat.

- **Révélation**

Ici, l'activité de l'enzyme est révélée par un kit de chimioluminescence (Pierce). Après rinçage, la membrane est incubée 5 minutes avec 1 ml de substrat, égouttée puis mise sous un film plastique transparent. Elle est ensuite mise au contact d'un film photographique (Hyperfilm, Amersham) dans une cassette pour autoradiographie. Le temps d'exposition varie selon l'intensité du signal.

### ***III.1.3.3 Détermination de la concentration en protéines***

La concentration en protéines est déterminée selon la méthode de Bradford (1976). On utilise le kit Biorad et la gamme étalon est établie à partir d'immunoglobulines de lapin.

## ***III.2 Etude de l'interaction Titine/calpaïnes***

### **III.2.1 Pontage**

On met en contact 25µg de calpaïne 1 avec 25µg de calpaïne 3 et 20µg I2-I6, pendant 30 minutes dans un tampon P Tris-HCl 50mM pH 7.5, NaCl 100mM, EGTA 4mM, DTT 1mM en présence de 0.6µM E64. Ensuite on ajoute une solution EDC (1-ethyl-3-(3-(dimethylamino)-propyl)carbodiimide) à 50nM final et une solution NHS (N-Hydroxysuccinimide) à 20nM final. On laisse incuber 45 minutes. La réaction est stoppée avec l'addition d'une solution de glycine 250mM, DTT 100mM. Les échantillons sont alors dénaturés dans un tampon de solubilisation (*cf* électrophorèse) puis chargés sur un gel acrylamide 10%. Les protéines migrées sont alors transférées sur membrane PVDF pour détecter les calpaïnes ou le fragment de titine au moyen des anticorps Anti-calpaïne 1 et 3 dilués au 500<sup>ème</sup> et de l'anticorps anti-histidine dilué au 2000<sup>ème</sup>.

### **III.2.2 Pulldown assays**

Nous allons utiliser l'étiquette histidine et la résine Ni sépharose pour montrer une éventuelle interaction et par conséquent induire une fixation en chaîne entre la résine et le fragment de titine avec son étiquette de fusion histidine et enfin la calpaïne 1.

On met en présence 25µg de calpaïne 1 avec 10µg de I2-I6 dans le tampon P sans EGTA (l'EGTA décroche les ions nickel de la matrice). On rajoute un milieu réactionnel où l'on a omis de mettre la titine afin de voir si la calpaïne 1 se fixe sur la résine. On laisse incuber 1H à température ambiante sous légère agitation. Aux milieux réactionnels, on rajoute 50 µl de résine Ni Sépharose High performance. On laisse sous agitation pendant une heure à température ambiante. Ensuite les protéines non fixées sont éliminées par centrifugation de 2 minutes à 13000 rpm. On récupère un aliquot du surnageant pour analyse. On procède alors à des lavages successifs de la résine dans 200µl de tampon P sans EGTA. Chaque lavage dure 5 minutes suivi d'une centrifugation de 2 minutes à 13000 rpm. On élimine les surnageants en prenant soin de récupérer un aliquot de chaque lavage. L'élution du fragment I2-I6 de la résine est réalisée dans un tampon P sans EGTA contenant 500mM d'imidazole. Le tampon d'élution est laissé en contact avec la résine pendant 5 minutes. Le mélange est centrifugé dans les mêmes conditions, le surnageant contenant les protéines éluées est solubilisé dans un tampon de dénaturation pour une analyse en Western Blot dirigé contre la calpaïne 1.

### ***III.3 Régulation de l'interaction***

#### **III.3.1 Titration calcium des fragments Z9-I1, I2-I6, I3-I4**

##### ***III.3.1.1 Préparation du tampon sans calcium***

Afin d'éviter que le calcium libre contenu dans les tampons ne faussent les calculs, on décide de passer l'eau distillée qui sert à faire les tampons mais aussi tous les tampons sur une chelex100, une résine disposant d'ions iminodiacétate capables d'agir comme des chélateurs envers les ions dits "métalliques". Toutes les expériences seront réalisées à partir d'un tampon P 50mM Tris/HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 1mM DTT, 4mM EGTA. L'EGTA nous permet ici de minimiser la quantité de calcium libre contenue dans le tampon T. Il faut aussi tenir compte de ces 4mM EGTA au moment de titrer avec le calcium. A cet effet, Eqcalwin un logiciel nous permet de déterminer la concentration de calcium libre en fonction des concentrations respectives d'EGTA et de calcium. A partir d'un micro-Osmomètre, nous avons déterminé la pression osmotique de 292 mOsm. Cette valeur est dans la gamme de valeurs correspondant aux conditions physiologiques.

##### ***III.3.1.2 Titration calcium des peptides Z9-I1, I2-I6, I3-I4***

Le fragment de titine à 250 µg/ml est incubé toute la nuit à 4°C et sous agitation permanente dans un tube eppendorf contenant quelques milligrammes de résine chelex. La résine a été au préalable équilibrée dans le tampon P. La phase liquide est séparée de la résine par centrifugation à 1000g pendant 5 minutes. On récupère alors le peptide dans la phase liquide afin de procéder à la titration. La méthode de titration employée ici est décrite par Johnson and Tikunova (2002). A 1 µM de peptide dans le tampon P, on ajoute des concentrations croissantes de calcium à partir d'une solution stock de 2 M. A chaque aliquot de calcium ajouté on enregistre au spectrofluorimètre PERKIN ELMER LS50 les changements de la fluorescence intrinsèque du tryptophane ( $\lambda_{exc}$ :305 nm; $\lambda_{em}$ :358 nm).

La qualité des dilutions des aliquots de calcium ainsi que la concentration en EGTA dans le tampon P sont éprouvées en effectuant une titration du quin-2, un chélateur fluorescent. La titration est réalisée pour 1 µM de quin-2 dans le tampon P à une longueur d'onde d'excitation et d'émission de 330 et 495 nm respectivement.

Les résultats sont traités par l'équation non linéaire de Hill:  $y = y_{\max} / (1 + 10^{(n * (Kd - pCa))})$  où y est la fluorescence calculée,  $y_{\max}$  la fluorescence maximale exprimée en %, n le nombre de Hill, Kd la concentration en calcium induisant 50% de fluorescence et pCa le logarithme négatif de la concentration en calcium exprimée en molaire.

### ***III.3.1.3 Polymérisation des fragments de titine en présence de calcium***

Le fragment de titine à 250 µg/ml est incubé à température ambiante sans calcium, cette condition constituera la référence. En parallèle on réalise deux autres situations où l'on incube le peptide avec 0.1 et 1 µM respectivement pendant 30 minutes. Un volume de 250 µl de chaque milieu réactionnel est prélevé pour être injecté sur une colonne de gel filtration, la superose 12 qui aura été au préalable équilibré avec du tampon T. Les protéines sont éluées à un débit de 0.3 ml/min et des fractions de 0.3 ml sont collectées. La calibration de la superose 12 a été effectué en utilisant un mélange de protéines comprenant la ferritine (440 kDa), la catalase (232 kDa), l'aldolase (158 kDa), la BSA (67 kDa) et la βlactoglobuline (36 kDa).

### ***III.3.1.4 Caractérisation des fragments de titine fixant le calcium***

Cette méthode est adaptée de la technique de détection des calcium binding proteins (Tastumi *et al.*, 1997). Les fragments de titine I2-I6, I2-I3, I3-I4, I5-I6 sont dénaturés par chauffage dans un tampon de dénaturation et chargés en conditions électrophorétiques (cf électrophorèse) puis transférés sur une membrane PVDF dans les conditions utilisées pour le Western blot. La membrane transférée est alors lavée pendant 10 minutes dans de l'eau distillée passée au préalable sur la chelex C-100. Ensuite, on procède à trois lavages successifs de 5 minutes avec le tampon P afin d'éliminer toutes traces du tampon de transfert. La membrane est alors immergée dans le tampon P contenant 1mM calcium libre pendant une heure à température ambiante. Après 2 lavages de 5 minutes dans de l'eau distillée, la membrane est incubée avec une solution aqueuse de 1mM quin-2 pendant une heure. L'excès de chélateur est éliminé en procédant à trois lavages successifs à l'eau distillée de 5 minutes chacun. La membrane est séchée à température ambiante puis illuminée sous UV (GELDOC, BIORAD) afin d'observer les éventuels complexes protéines-calcium-quin2.

### III.3.2 Fixation de la calpaïne 1

#### **III.3.2.1 Fluorescence**

La calpaïne 1 à 250 µg/ml est incubée toute la nuit à 4°C et sous agitation permanente dans un tube eppendorf contenant quelques milligrammes de résine chelex. La résine a été au préalable équilibrée dans le tampon P. La phase liquide est séparée de la résine par centrifugation à 1000g pendant 5 minutes. On récupère alors la protéine dans la phase liquide afin de procéder à la titration.

On couple la calpaïne 1 à un fluorochrome le FITC (Fluorothioisocyanate, Sigma). Ce couplage s'effectue en excès de fluorochrome (ratio 10 :1). On ajoute 50µg dans 50µl de tampon carbonate 0.5M, EGTA 5mM pH 8.8. A cette solution, on incorpore 3.6µl de FITC à 1mg/ml. La solution de couplage est laissée en contact toute la nuit à 4°C à l'obscurité.

La réaction s'effectue au fluorimètre (Perkin Elmer LS50B) dans une microcuve aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission de 495nm et 520 nm respectivement. On travaille avec 25µg/ml de calpaïne 1 couplée au FITC en présence de 0.6µM E64. On mesure la fluorescence de la calpaïne couplée et on observe une variation de la fluorescence après ajout de concentrations croissantes de fragments de titine. Ci- dessous, les différentes interactions réalisées en phase soluble sont résumées dans ce tableau où les cases colorées représentent les conditions utilisées.

Interaction en fluorescence	Concentrations Calcium utilisées			
	2.4 10 <sup>-11</sup> M	50nM	12µ M	10mM
Capn 1* Vs I2-I6				
Capn 1* Vs tandems				
Capn 1* Vs I3-I4				

### **III.3.2.2 ELISA**

- **Coating**

Les plaques sont coatées avec 100  $\mu$ l de fragment de titine à 1  $\mu$ g/ml dans du tampon P avec une concentration en calcium libre déterminée par les conditions de l'expérience. L'adsorption a lieu à 4°C pendant la nuit. On procède ensuite à cinq lavages successifs de la plaque avec du PBS 1X pH 7.5.

- **Surcoating**

Avant de réaliser l'interaction avec la calpaïne 1, il faut saturer les sites aspécifiques en disposant dans les puits 200 $\mu$ l de PBS 1X tampon contenant 5% de gélatine de poisson. La saturation dure une heure à température ambiante. On effectue de nouveau 5 lavages avec le tampon PBS 1X.

- **Incubation calpaïne 1**

On distribue dans les puits une gamme de calpaïne 1 de 0.1 à 50  $\mu$ g/ml dans du tampon P. Le volume d'incubation est de 100 $\mu$ l et dure une heure à température ambiante. On procède de nouveau à 5 lavages successifs au PBS 1X, 1% de gélatine de poisson, 0.1% tween.

- **Hybridation anticorps primaire**

L'anticorps anti-calpaïne 1 est dilué au 500<sup>ème</sup> dans le tampon de lavage précédent. On dispose alors de 100 $\mu$ l dans chaque puits. L'incubation dure une heure à température ambiante. La solution d'anticorps primaire est éliminée par une succession de 5 rinçages dans la solution de lavage PBS 1X, Tween 0.1%, 1% gélatine de poisson.

- **Hybridation anticorps secondaire**

On dépose dans les puits 100 $\mu$ l d'une solution d'anticorps anti-rat couplé à la peroxydase dilué au 2000<sup>ème</sup> dans le tampon de lavage. L'hybridation dure une heure à température ambiante et à l'obscurité.

- **Révélation**

On utilise l'OPD comme substrat pendant 20 minutes à l'obscurité.

La réaction enzymatique est stoppée par addition de 50 µl d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.5 M dans chaque puits. L'intensité colorimétrique est déterminée par un spectrophotomètre à la longueur d'onde de 492nm.

Nous avons résumé dans le tableau ci-dessous les différentes expériences d'interaction que nous avons réalisées en ELISA avec la calpaïne 1.

Interaction en ELISA	Concentrations Calcium utilisées			
	2.4 10 <sup>-11</sup> M	50nM	12µ M	10mM
Capn 1 Vs I2-I6*				
Capn 1 Vs tandems*				
Capn 1 Vs I3-I4*				

\*protéines immobilisées

### III.3.3 Titration calcium de la calpaïne 3

La calpaïne 3 à 250 µg/ml est incubée toute la nuit à 4°C et sous agitation permanente dans un tube eppendorf contenant quelques milligrammes de résine chelex. La résine a été au préalable équilibrée dans le tampon P. La phase liquide est séparée de la résine par centrifugation à 1000g pendant 5 minutes. On récupère alors la protéine dans la phase liquide afin de procéder à la titration.

Pour la calpaïne 3, nous allons étudier les variations de fluorescence de la protéase couplée au FITC quand des concentrations croissantes de calcium sont rajoutées. On couple la calpaïne 3 à un fluorochrome le FITC (Fluorothioisocyanate, Sigma). Ce couplage s'effectue en excès de fluorochrome (ratio 10 :1). On ajoute 50µg dans 50µl de tampon carbonate 0.5M, EGTA 5mM pH 8.8. A cette solution, on incorpore 3.6µl de FITC à 1mg/ml. La solution de couplage est laissée en contact toute la nuit à 4°C à l'obscurité. On passe cette solution sur une colonne PD10 équilibrée au préalable dans du tampon P de manière à séparer la calpaïne marquée du fluorochrome libre, puis conservé à 4°C à l'abri

de la lumière. La réaction s'effectue au fluorimètre (Perkin Elmer LS50B) dans une microcuve aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission de 495nm et 520nm respectivement. Dans 500 µl de calpaïne 3 inactive (25µg/ml), on rajoute des concentrations croissantes de calcium et on mesure la variation de fluorescence. La même opération a été réalisée avec le domaine I-II inactif produit au laboratoire.

### III.3.4 Fixation de la calpaïne 3

#### ***III.3.4.1 Fluorescence***

La calpaïne 3 couplée au FITC est mise en présence de concentrations croissantes de fragments de titine. La variation de fluorescence est alors suivie dans les mêmes conditions expérimentales que pour la calpaïne 1. En parallèle, le fragment I2-I6 est couplé au FITC selon le schéma de couplage énoncé précédemment puis soumis à interaction avec des concentrations croissantes de la calpaïne 3 inactive entière ou avec des domaines recombinants de calpaïne 3. Ce tableau récapitulatif permet de visualiser les différentes expériences pour des concentrations calcium données que nous avons effectuées pour cette étude.

Interaction en fluorescence	Concentrations Calcium utilisées			
	2.4 10 <sup>-11</sup> M	50nM	12µ M	10mM
I2-I6* Vs Capn 3				
Capn 3* Vs tandems				
Capn 3* Vs I5-link				
I2-I6* Vs domaines p94				

\* couplage au FITC

### **III.3.4.2 ELISA**

- **Coating**

Les plaques sont coatées avec 100  $\mu$ l de fragments de titine à 1  $\mu$ g/ml dans du tampon P avec une concentration en calcium libre déterminée par les conditions de l'expérience. L'adsorption a lieu à 4°C pendant la nuit. On procède ensuite à cinq lavages successifs de la plaque avec du PBS 1X pH 7.5.

- **Surcoating**

Avant de réaliser l'interaction avec la calpaïne 3, il faut saturer les sites aspécifiques en disposant dans les puits 200 $\mu$ l de PBS 1X tampon contenant 5% de gélatine de poisson. La saturation dure une heure à température ambiante. On effectue de nouveau 5 lavages avec le tampon PBS 1X.

- **Incubation calpaïne 3**

On distribue dans les puits une gamme de calpaïne 3 de 0.1 à 50  $\mu$ g/ml dans du tampon P. Le volume d'incubation est de 100 $\mu$ l et dure une heure à température ambiante. On procède de nouveau à 5 lavages successifs au PBS 1X, 1% de gélatine de poisson, 0.1% tween. Les domaines recombinants de la calpaïne 3 suivent le même schéma.

- **Hybridation anticorps primaire**

L'anticorps anti-calpaïne 3 est dilué au 2000<sup>ème</sup> dans le tampon de lavage précédent. On dispose alors de 100 $\mu$ l dans chaque puits. L'incubation dure une heure à température ambiante. La solution d'anticorps primaire est éliminée par une succession de 5 rinçages dans la solution de lavage PBS 1X, Tween 0.1%, 1% gélatine de poisson. En ce qui concerne les domaines calpaïne 3, le domaine I-II est révélé avec l'anticorps commun aux 3 calpaïnes alors que les domaines III et IV sont révélés avec l'anticorps anti-IS2. Les deux anticorps sont utilisés au 2000<sup>ème</sup>.

- **Hybridation anticorps secondaire**

On dépose dans les puits 100 $\mu$ l d'une solution d'anticorps anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase dilué au 2000<sup>ème</sup> dans le tampon de lavage. L'hybridation dure une heure à température ambiante et à l'obscurité.

- **Révélation**

On utilise l'OPD comme substrat pendant 20 minutes à l'obscurité.

La réaction enzymatique est stoppée par addition de 50 µl d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.5 M dans chaque puits. L'intensité colorimétrique est déterminée par un spectrophotomètre à la longueur d'onde de 492nm.

Nous avons résumé dans le tableau ci-dessous les différentes expériences d'interaction que nous avons réalisées en ELISA avec la calpaïne 3.

Interaction en ELISA	Concentrations Calcium utilisées			
	2.4 10 <sup>-11</sup> M	50nM	12µ M	10mM
I2-I6* Vs Capn 3				
Capn 3 Vs tandems*				
Capn 3 Vs I5-link*				
I2-I6* Vs domaines p94				

\* protéine immobilisée

# *Résultats et Discussion*

## **Résultats et Discussion**

### ***I. Production et purification des protéines recombinantes***

#### ***I.1 Introduction***

L'étude d'un interactôme *in vitro* nécessite d'avoir des partenaires protéiques bien caractérisés. A l'exception de la calpaïne 1 qui est d'origine commerciale, il est nécessaire de produire nos protéines. Deux particularités empêchent l'obtention de la titine et de la calpaïne 3 par des méthodes chromatographiques classiques. D'une part, la titine est une protéine gigantesque (30000 acides aminés) ce qui nous amène à la fragmenter pour l'étudier. D'autre part, la calpaïne 3 est une protéine très instable qui s'autolyse rapidement et rend vaine toute tentative d'extraction selon des procédés classiques. Nous avons donc opté pour une stratégie de production et de purification des protéines recombinantes.

#### ***I.2 Stratégie et Design des amorces***

Notre stratégie de clonage impliquant le vecteur pET-101D Topo® (Invitrogen) nous a permis de réaliser la restriction et la ligature de l'insert en une seule fois à des concentrations en insert et en vecteur minimales.

## Design des amorces

<u>Fragments recombinants</u>	<b>Amorces sens</b>	<b>Amorces antisens</b>
I2-I6	5'-CACCATGCCAAGCAATTGATCACTTTCACAC-3'	5'-CTTCAACTTTGAGTTTGGCAGATGTTTTGGAGG-3'
I2-I5+linker	5'-CACCATGCCAAGCAATTGATCACTTTCACAC-3'	5'-CTCAAACACCACATTTTGTAGTTTCTGTACAGGT-3'
I2-I3	5'-CACCATGCCAAGCAATTGATCACTTTCACAC-3'	5'-GTTTCATCTTTAATTTACAGGTTGTCTTTTTCCCGTCGA -3'
I3-I4	5'-CACCATGCAGTTGTTGAGTTTGTGAAAGAAGCTTC-3'	5'-TATAGACAGAGACACGCCCACTGGTGG-3'
I5+linker	5'-CACCATGGTGTGGACGTGATAACACCTC-3'	5'-CTCAAACACCACATTTTGTAGTTTCTGTACAGGT-3'
dI-dII	5'-CACCATGCCAACTGTTATTAGTCCAAGCTGTG-3'	5'-GGTCTGAAGCTTATCGGACTCCAGGGC-3'
dI-dIII129S	Megaprimer : 5'-GATCTAGGGGACAGCTGGTTTCTTGCA-3'	
dIII	5'-CACCATGTGGACGGTGTCTGTAAACGAG-3'	5'-CTGCCTGAAGATGTTCCGGAATTGCTGCTG-3'
IS2	5'-CACCATGACAATCTCTGTGGATCGGCCAGTGAAG-3'	5'-CTGCCTGAAGATGTTCCGGAATTGCTGCTG-3'
dIV	5'-CACCATGCAGGAAAGTGAGGAGCAGCAG-3'	5'-GGCATAATGGTAAGTGCAGCCACAAGTAC-3'

### ***1.3 Résultats***

Les amorces dessinées nous ont permis donc d'amplifier le fragment ADN d'intérêt puis de le cloner dans notre vecteur TOPO par le biais de la topoisomerase. Des clones sont recueillis sur milieu sélectif (Ampicilline dans notre cas) et analysés en PCR afin de voir si l'insert est bien présent et bien orienté. Le séquençage constitue alors la première vérification de la qualité des inserts clonés. Les séquences obtenues sont conformes dans 90% des clones testés. Le résultat tend à diminuer quand la longueur du fragment augmente. Cette fiabilité est assumée par la *Taq* polymérase platinum (Invitrogen) qui est d'une haute fidélité dans la réplication de l'ADN. Les tests d'expression permettent par la suite de déterminer le ou les clones susceptibles de produire la protéine en quantité suffisante. L'expression des protéines recombinantes s'est déroulée à 37°C, sous agitation permanente, dans le système bactérien *E. coli* BL21 sous le contrôle d'un promoteur T7. Il confère une vitesse de transcription très supérieure à celle des promoteurs d'*E. coli*. En conséquence, nos inserts placés sous le contrôle d'un promoteur T7 sont transcrits à très grande vitesse et les protéines correspondantes sont produites en très grande quantité. Nous avons essayé de limiter au maximum le temps d'induction à 4 heures afin de limiter la protéolyse bactérienne envers nos protéines exogènes, pouvant se révéler nocives pour la bactérie et ce quand bien même les

Fragments recombinants	Poids moléculaire	Solubilité	Solubilisation	« Renaturation »	Quantité
dI-dII	50kDa	Soluble	Lysozyme	-	3.5mg
dI-dIII129S	50kDa	Soluble	Lysozyme	-	12mg
dIII	30kDa	partielle	Guanidine 6M	Dialyse	10mg
dIII-IS2	30kDa	insoluble	Guanidine 6M	Dialyse	18mg
IS2	10kDa	soluble	Lysozyme	-	8mg
dIV	23kDa	insoluble	Guanidine 6M	Dialyse	5mg
I2-I6	60kDa	soluble	Lysozyme	-	20mg
I2-I5+linker	53kDa	soluble	Lysozyme	-	14mg
I2-I3	23kDa	soluble	Lysozyme	-	5mg
I3-I4	22kDa	soluble	Lysozyme	-	3mg
I5-I6	30kDa	insoluble	Guanidine 6M	Dialyse	3.5mg

**Figure N° 1 : Récapitulatif des différents fragments recombinants produits**

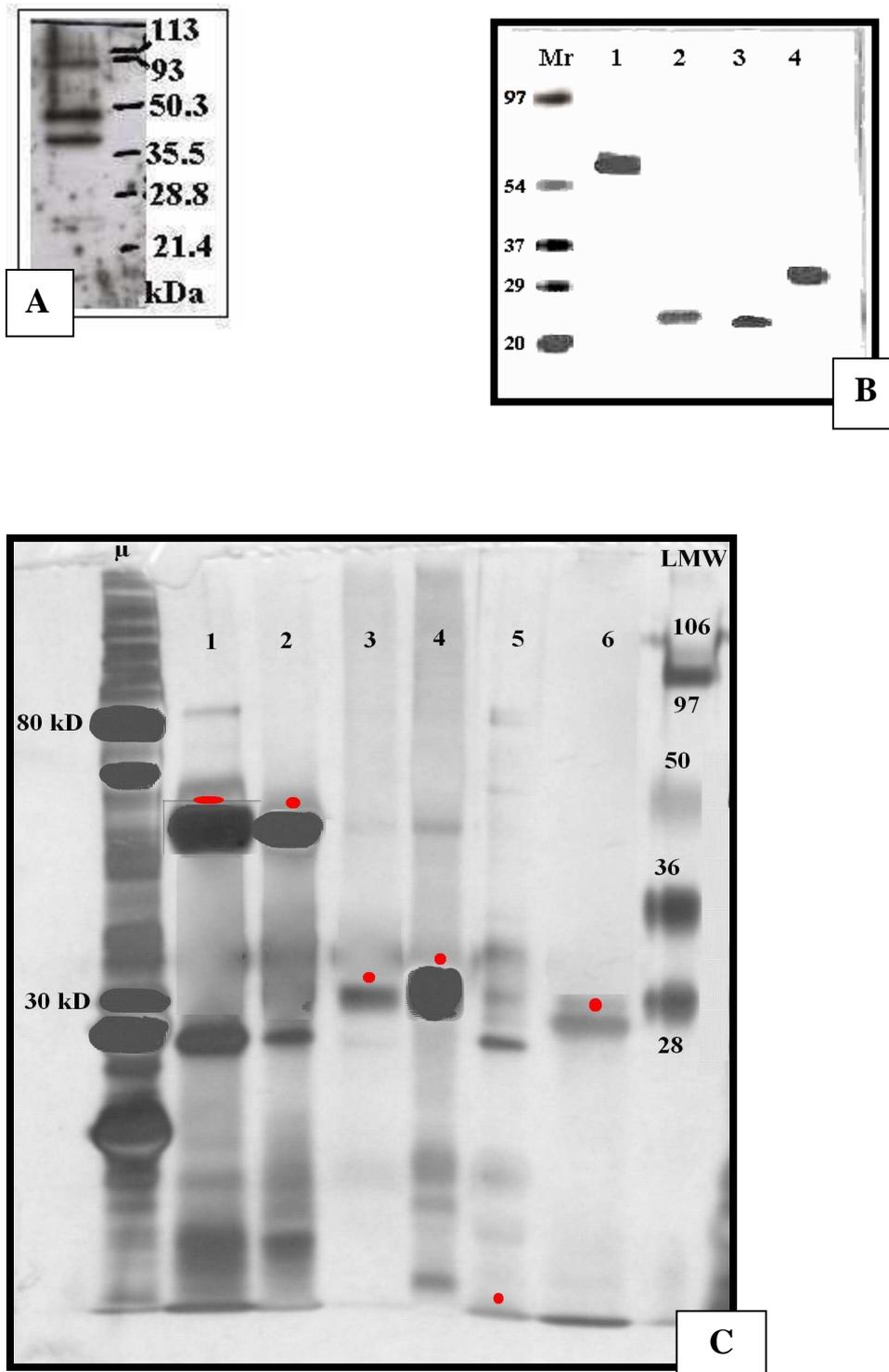
souches utilisées ont été modifiées génétiquement dans le sens d'une limitation de l'action protéolytique.

Pour récupérer les protéines recombinantes, nous avons recours à la combinaison d'une action par le lysozyme afin de fragiliser la membrane bactérienne et d'une action mécanique, la sonication qui détruit les cellules par ondes de choc successives. Deux cas de figures peuvent alors se présenter :

- Les protéines sont solubles ou partiellement solubles. Elles sont alors purifiées sur une colonne Ni Sépharose (Amersham) dont la matrice a une forte affinité pour les groupements histidine. Cette interaction peut être atténuée soit par une diminution du pH soit par une augmentation de la concentration en imidazole qui se comporte comme un compétiteur. Au laboratoire en fixant une certaine concentration en imidazole dans l'échantillon, nous avons pu éliminer une grande majorité de contaminants. Ensuite, on procède à une élution par paliers qui permet de purifier la majorité de nos protéines solubles à 90%.

- Dans le cas des protéines insolubles, la solubilisation s'effectue en conditions dénaturantes. En effet les corps d'inclusion sont récupérés par centrifugation (culot bactérien lavé) et mis en présence d'un agent vigoureux la guanidine HCl à 6M. L'action de la guanidine permet la solubilisation des corps d'inclusion. Dans notre cas, nous avons choisi de faire la purification des protéines dans des conditions dénaturantes parfaitement supportées par la matrice. La purification est plus efficace dans ce cadre précis dans la mesure où les protéines sont dépliées ce qui a pour effet de limiter au minimum la fixation des contaminants sur la matrice. Le problème d'un point de vue expérimental est de jongler entre les conditions dénaturantes et les conditions natives. La réversibilité de la dénaturation par ces agents est une phase délicate qui peut s'effectuer selon différents schémas (dialyses, dilution ou encore renaturation sur colonne)

(<http://refold.med.monash.edu.au>). Nous avons procédé à des dialyses successives pour éliminer l'urée 8M présente dans le tampon d'élution des protéines. Ces dialyses sont effectuées à température ambiante suivant un processus progressif afin de retrouver une conformation proche ou identique à la conformation native (Rudolph and Lilie, 1996). Le tableau récapitulatif (figure n°1) montre l'ensemble des protéines obtenues. Par ailleurs la figure N° 2 renseigne aussi sur la qualité des purifications réalisée de manière optimale et ce malgré la coélution de contaminants bactériens. Ainsi la pureté de purification avoisine 80 à 85% en moyenne. Il est à noter que nous



**Figure N°2 : Electrophorèse des différentes protéines recombinantes.** A) Electrophorèse en conditions dénaturantes sur gel à 10% coloré à l'argent de la calpaïne 3 inactive.  
 B) Migration en conditions dénaturantes des fragments recombinants de titine sur un gel à 10% acrylamide coloré à l'argent. 1 : fragment recombinant I2-I6 ; 2 : fragment I2-I3 ; 3 : fragment I3-I4 ; 4 : fragment I5-I6; Mr: marqueurs de masse moléculaire  
 C) Electrophorèse de la calpaïne 1 commerciale et des domaines recombinants de calpaïne 3 en conditions dénaturantes.  $\mu$  : calpaïne 1 ; 1 : domaine I-II C129S ; 2 : domaine I-II ; 3 : domaine III ; 4 : domaine III sans IS2 ; 5 : séquence IS2 ; 6 domaine IV ; LMW : marqueurs de masse moléculaire.

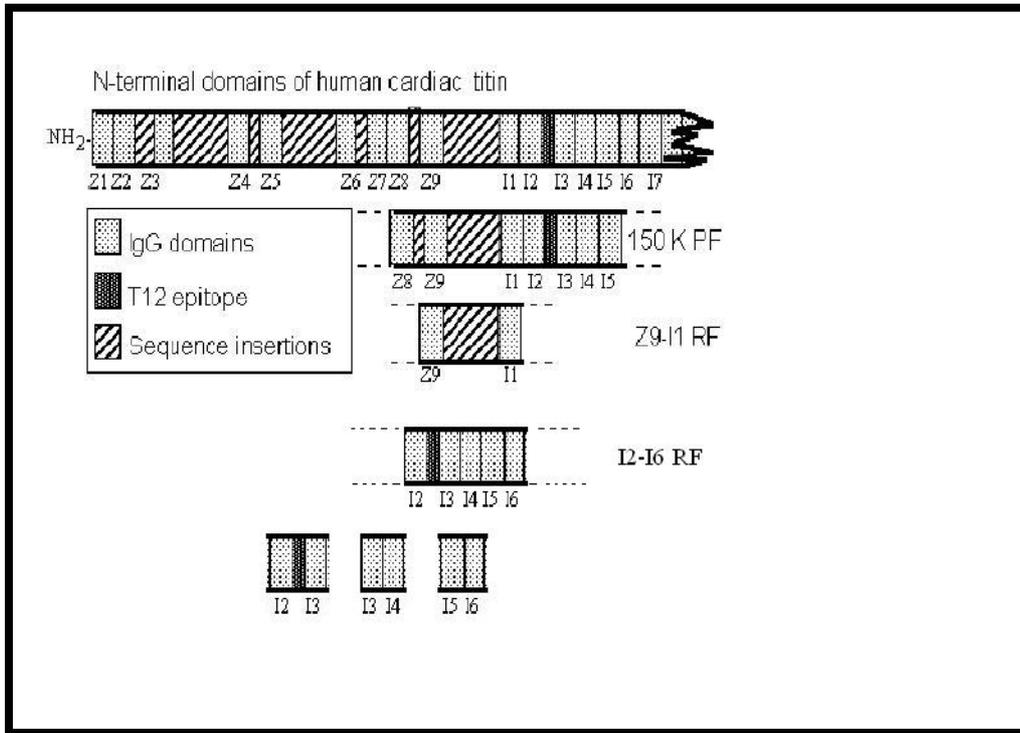
avons conservé l'étiquette histidine pour des raisons expérimentales. Enfin, les différents fragments de calpaïne 3 ont été choisis de manière à englober les épitopes de nos différents anticorps polyclonaux que ça soit l'anti-IS2 pour les domaines III et IV ou l'anticorps dirigé contre un épitope du site actif pour les domaines dI-dII et dI-dIII129S.

A partir de cette banque protéique, nous avons pu mettre en œuvre diverses expériences d'interaction afin de caractériser *in vitro* la fixation des calpaïnes sur la titine au voisinage de la strie Z et d'étudier l'importance du calcium dans cette fixation.

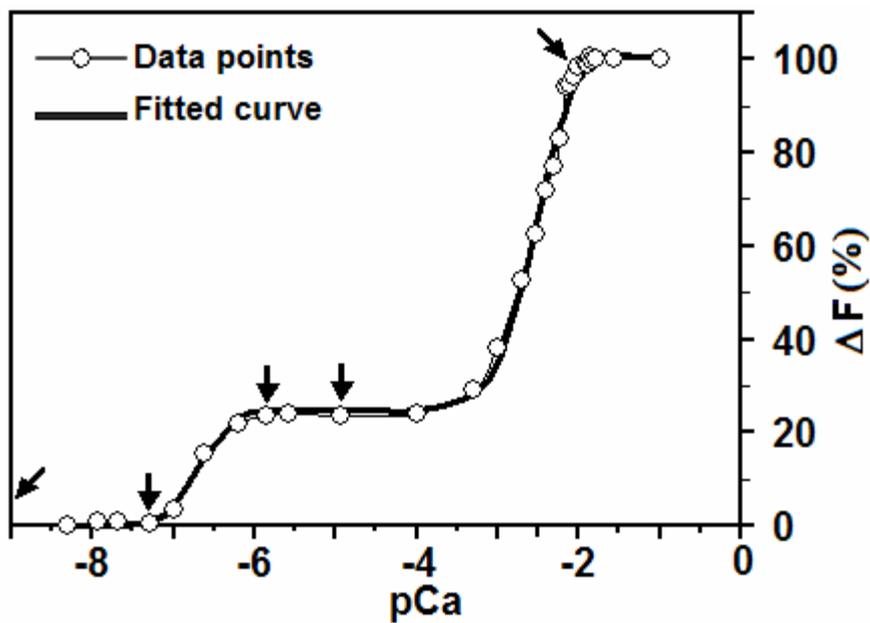
## ***II. Fixation du calcium sur la titine et conséquences structurales***

### ***II.1 Introduction***

Le calcium intracellulaire est contenu dans le reticulum sarcoplasmique associée à la calsequestrine, une calcium binding protein (CaBP). Son relargage dans le cytoplasme active la contraction musculaire. Une partie de ce calcium s'associe fortement aux myofibrilles au niveau des lignes N1 et N2 (Yarom and Meiri, 1971 ; Vignon *et al.*, 1989). La titine semblerait être le parfait candidat à une fixation du calcium (Wang, 1985). Cette hypothèse a été en partie renforcée avec les résultats publiés par Tatsumi et ses collaborateurs (1997) qui démontrent la capacité de la région PEVK de la titine à fixer du calcium. Nous avons donc voulu établir si la titine au niveau de la région N1 était capable de fixer du calcium et auquel cas apporter des éléments de réponse sur la signification physiologique de cette fixation. Pour ce faire, nous disposons dans notre banque protéique de plusieurs fragments de titine qui correspondent à des régions proche de la ligne N1 et qui couvrent les domaines Igs Z9 à I6. Si la titine est une CaBP, la fixation du calcium entraînera des changements structuraux qui perturberont l'environnement de certains acides aminés fluorophores comme le tryptophane ou la tyrosine. C'est sur cette propriété que nous nous sommes appuyé pour titrer les différents fragments avec des concentrations croissantes en calcium. Ensuite, nous avons essayé de caractériser les conséquences structurales de la fixation du calcium sur ces mêmes fragments.



**Figure N°3 :** Schéma des différents fragments de titine produits au laboratoire



**Figure N°4 :** Titration calcium du fragment I2-I6. Les flèches représentent les différentes concentrations calcium équivalentes à une transition dans la structuration.

## *II.2 Titration Calcium de la titine*

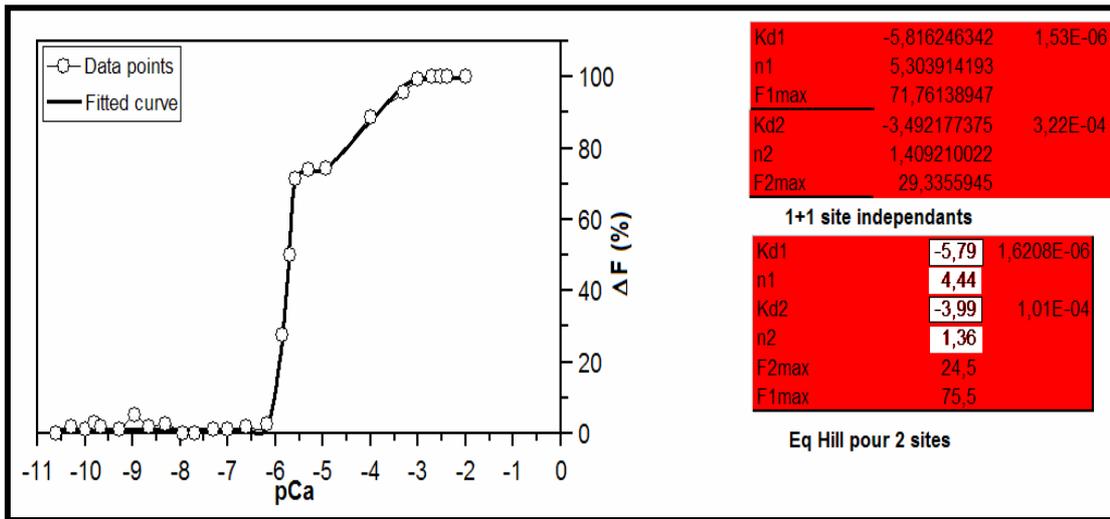
### II.2.1 Fragment Z9-I1 (Coulis *et al.*, 2004)

Compte tenu des caractéristiques physico-chimiques de l'insertion assurant la liaison des domaines Z9 et I1 dans le fragment recombinant Z9-I1 et de son contenu élevé en résidu acide glutamique, cette région pourrait constituer un site potentiel de fixation du calcium.

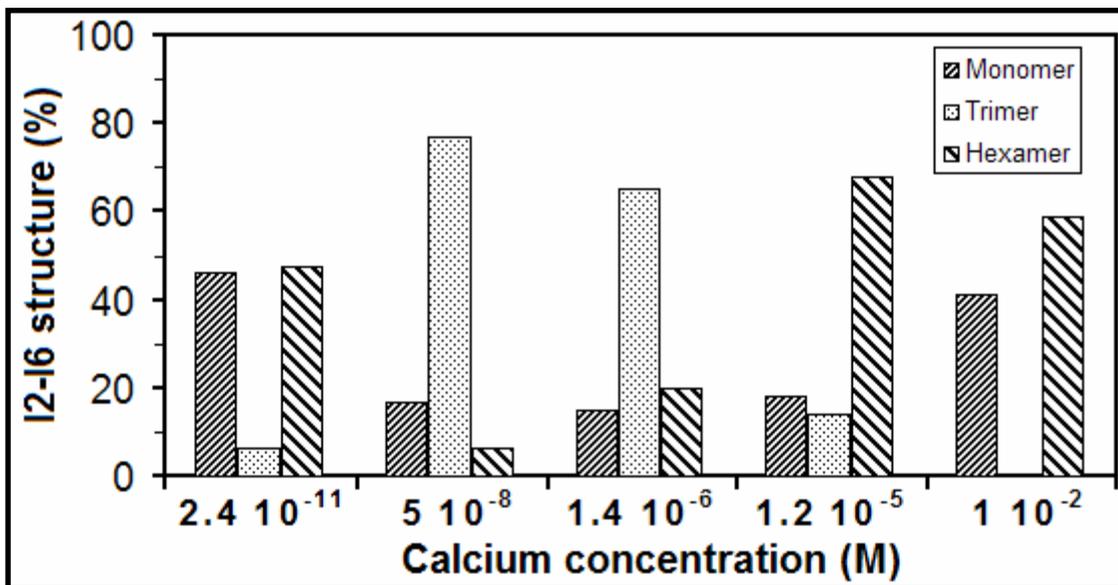
Nous avons étudié la fixation du calcium sur le peptide en suivant au spectrofluorimètre les variations de la fluorescence intrinsèque du tryptophane. L'addition de concentrations croissantes de calcium entraîne une augmentation de la fluorescence. La courbe est une fonction logarithmique et la concentration de calcium correspondant à mi-saturation intervient pour un  $-pCa$  de  $10.31 \pm 0.03$  ce qui équivaut à un  $K_d$  de 0.05nM environ. Le nombre de Hill donné par le solveur est de 4 ce qui signifie qu'il y a coopérativité dans la fixation de calcium.

### II.2.2 Fragment I2-I6

Ce fragment est intéressant car il comprend l'insertion N1 reconnu par l'anticorps monoclonal T12 (Raynaud *et al.*, 2005) (Figure n°3). En effectuant une titration dans les mêmes conditions que le fragment précédent, nous avons voulu montrer que la titine était capable de fixer du calcium au sortir de la strie Z jusqu'à l'insertion N1. La titration calcium du fragment I2-I6 (Figure n°4) montre une variation de la fluorescence avec deux paliers de saturation. Le premier palier de saturation est atteint pour des concentrations calciques proches du  $\mu M$  alors que le deuxième palier de saturation est atteint pour des concentrations calciques voisines de 10mM. Les constantes d'affinités correspondantes sont 206nM et de 3mM avec une coopérativité dans la fixation du calcium ( $n=2.3$ ) pour le premier site de fixation. On peut s'apercevoir sur ce graphe que la première saturation n'implique que très peu de changement structuraux (20% environ). En revanche pour des concentrations supérieures au  $\mu M$ , on observe une importante modification structurale provoquant une variation maximale de la fluorescence. Il est à noter que l'affinité de la titine pour le calcium est beaucoup plus faible ce qui suggère une influence différente dans cette zone par rapport au fragment Z9-I1. Ces résultats suggèrent la présence de deux fixations distinctes de calcium ou une polymérisation du fragment sous l'effet de la fixation du cation. Comme tous les domaines Ig ont à peu près



**Figure N°5 :** Titration calcium du fragment I3-I4



pCa	Monomer	Trimer	Hexamer
2,42E-11	45,99629715	6,364267531	47,63943532
5,00E-08	16,73183073	77,05841766	6,20975161
1,40E-06	15	65	20
1,20E-05	18,21862348	13,9290534	67,85232312
1,00E-02	41,22120578	0,110217128	58,6685771

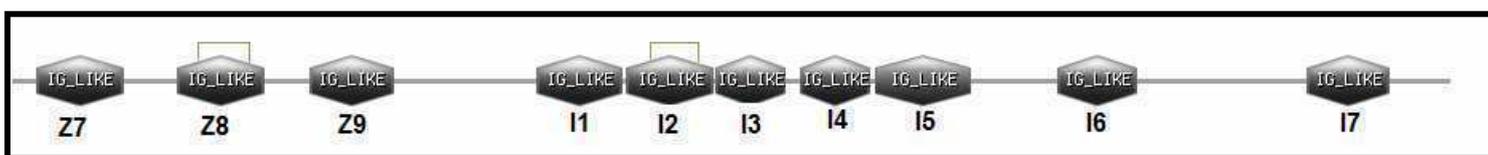
**Figure N°6 :** Différentes structurations du fragment I2-I6 en fonction de la concentration en calcium

la même structure dans cette région, nous avons opté pour une structuration de la titine en présence de calcium. Une telle adaptation est montrée pour le fragment PEVK qui devient plus flexible en présence de calcium (Labeit *et al.*, 2003).

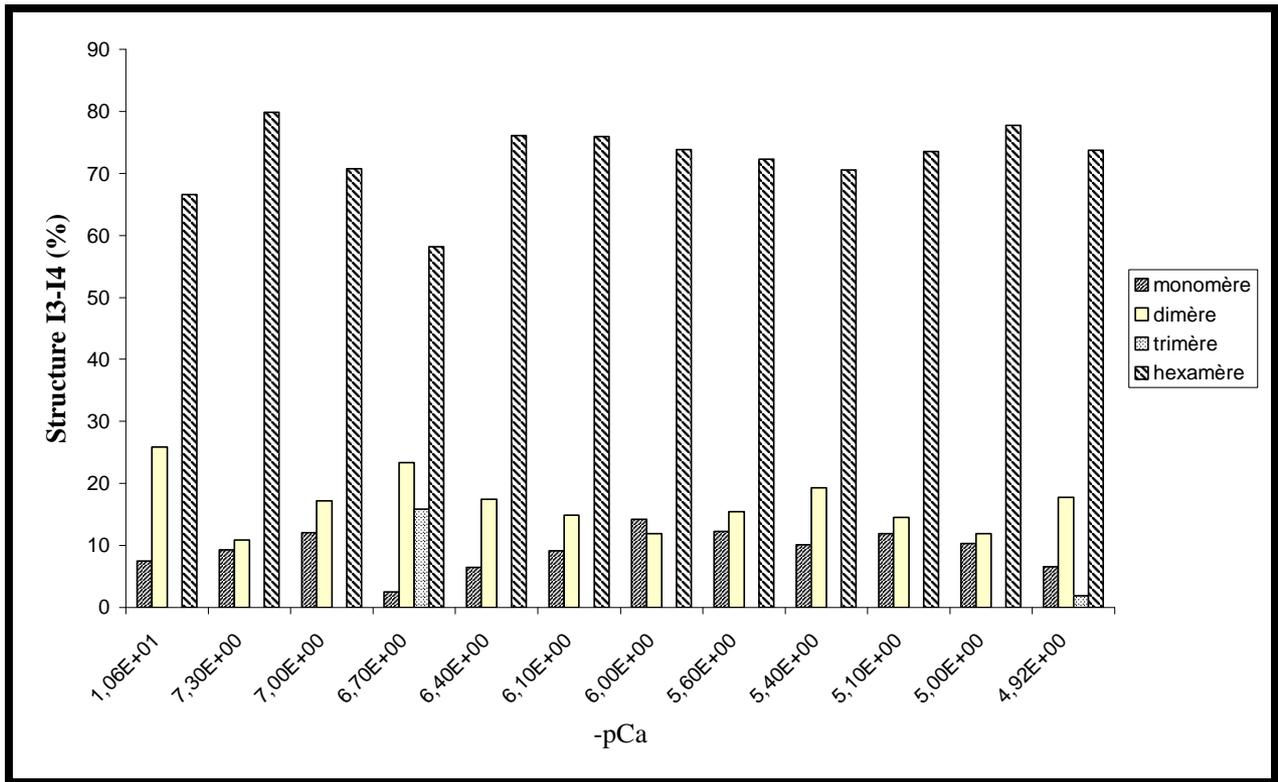
### II.2.3 Fragment I3-I4

En ce qui concerne le fragment I3-I4, nos études structurales (PROSITE) révèlent la présence d'une structure flexible entre les deux domaines I3 et I4 qui coïnciderait avec l'insertion N1 en accord avec les résultats obtenus par Sebestyen et ses collaborateurs (1995) (Insert n°1). La titration calcium de ce fragment (Figure n°5) révèle un profil qui suit la même évolution que le fragment I2-I5 à savoir deux paliers de saturation. Les constantes d'affinité qui s'y rapportent sont de 1.5 $\mu$ M et 0.14 mM. Dans le cas du fragment I3-I4, on constate que la première saturation est plus tardive mais qu'elle induit beaucoup plus de changements structuraux (70% environ). Dès lors, le maximum de variation est obtenu plus rapidement que le fragment I2-I5 (0.14mM contre 3mM). Par ailleurs, il est à noter une certaine coopérativité entre domaines qui permet au fragment I2-I5 d'être plus sensible au calcium que le tandem I3-I4.

La fluorescence intrinsèque des fragments est modifiée lors de la fixation de calcium ce qui souligne que d'importantes modifications structurales surviennent. Nous avons tenté de caractériser ces changements en utilisant une gel filtration, la superose 12.



*Insert n°1 : prédiction de la structure de la région N1 (PROSITE).*



**Figure N°7 : Différentes structurations du fragment de titine I3-I4 en fonction du calcium**

## ***II.3 Conséquences structurales***

### **II.3.1 Polymérisation des molécules de titine en présence de calcium**

#### ***II.3.1.1 Fragment Z9-I1 (Coulis et al., 2004)***

Nous avons montré qu'en absence de calcium, il y avait trois formes qui cohabitaient à savoir le monomère, mais aussi une forme tetramérique de 213kDa et enfin une forme mineure hexamérique à 294kDa. L'addition de 100nM calcium induit une diminution de la forme monomérique au détriment d'une forme intermédiaire dimérique ou trimérique de 117kDa. Le passage de 0,1 $\mu$ M à 1 $\mu$ M de calcium entraîne une disparition totale du monomère au profit de la forme intermédiaire de 117kDa. On note également une légère augmentation de la forme à 294kDa. L'addition de calcium semble donc entraîner une polymérisation du peptide en passant par une forme dimérique ou trimérique transitoire plus moins stable.

#### ***II.3.1.2 Fragment I2-I6***

Le fragment I2-I6 suit le même comportement que le fragment Z9-I1 c'est-à-dire une polymérisation de la titine jusqu'à une forme hexamérique. Nous avons déterminé les différents polymères en présence de concentrations en calcium qui correspondent aux différentes transitions observées sur la courbe de titration. Pour des concentrations faibles en calcium, on retrouve dans notre échantillon un équilibre entre le monomère (46%) et l'hexamère (48%) (Figure N°6). Dans des conditions physiologiques normales (sous le  $\mu$ M de calcium), la forme prédominante semble être un trimère. Dès que ces concentrations augmentent et passent au deçà du  $\mu$ M, on assiste à une disparition inversement proportionnelle à l'apparition de l'hexamère. En corrélation avec notre titration, on peut noter que la première variation de la fluorescence intrinsèque correspond à l'émergence du trimère. La seconde augmentation de la fluorescence cadre bien en terme de concentration calcique avec l'apparition de l'hexamère au détriment du trimère. Le calcium module en phase aqueuse l'organisation spatiale du fragment I2-I6. En outre, le trimère semble être la forme qui a le plus d'affinité vis-à-vis du calcium.

#### ***II.3.1.3 Fragment I3-I4***

Le tandem Ig comme nous avons pu observer précédemment est lui aussi capable de fixer du calcium. Les effets structuraux engendrés par le calcium sont les mêmes que pour les fragments précédents à savoir une polymérisation du peptide (Figure n°7). Comme pour le

fragment I2-I6, la modification structurale synonyme de l'apparition du trimère correspond à la variation de fluorescence menant au premier palier de saturation. Par ailleurs on peut noter la présence d'un dimère dans notre échantillon qui peut provenir d'un traitement insuffisant de la Chelex 100. Par rapport au fragment I2-I6, on note la présence constante de la forme hexamérique en quantité majoritaire. Il semblerait que la combinaison ou la coopérativité de plusieurs domaines soit nécessaire pour initier l'état transitoire à des concentrations calciques plus faibles.

## ***II.4 Discussion***

Il est bien établi dans la littérature qu'une partie du calcium intracellulaire est fortement associé aux myofibrilles. Plusieurs études font état d'une fixation au niveau des lignes N1 et N2 du sarcomère (Yarom and Meiri, 1971 ; Vignon *et al.*, 1989). Des interrogations sont survenues dès lors au niveau du support moléculaire capable de fixer le cation. Wang (1985) est le premier à émettre l'hypothèse d'une fixation de calcium par la titine. La région PEVK a été identifiée comme un site de fixation du calcium (Tatsumi *et al.*, 2001). En revanche, hormis les travaux en ultrastructure, aucune observation n'a été faite concernant la capacité de fixation des régions N1 et N2 du sarcomère.

Nos travaux tentent d'apporter des éléments de réponse tant au niveau moléculaire que structural. Nous nous sommes appuyés sur le fait que l'environnement d'une CaBP était fortement modifié quand elle fixait du calcium pour suivre la variation de la fluorescence intrinsèque (Johnson and Tikunova, 2002) des différents fragments proches de la ligne N1 dont nous disposons. Les expériences ont été menées à partir de trois fragments représentatifs de la ligne N1. Le fragment Z9-I1 possède une séquence riche en résidus acides susceptibles de lier des cations et notamment le calcium. Les deux autres fragments I2-I6 et I3-I4 constituent des associations de domaines Ig. Or ces domaines ont une structure proche des domaines C2 donc on peut penser qu'ils soient capables de fixer du calcium à l'instar des domaines C2 (Nalefski and Falke, 1996).

Les résultats que nous avons obtenus permettent de tirer plusieurs enseignements. La titine dans la région de l'insertion N1 est capable de fixer du calcium. Il suffit de deux domaines Ig, voire un seul pour fixer du calcium. Toutefois les constantes d'affinités observées suggèrent un effet différent selon si le calcium est fixé sur le fragment Z9-I1 ou sur le fragment I2-I6. Concernant le fragment Z9-I1, nous avons déterminé une forte constante

d'affinité ( $K_d=4.92.10^{-11} \pm 0.38.10^{-11}$ ) qui résume le potentiel électronégatif de l'insertion. Par ailleurs, cette constante est si importante qu'on peut penser qu'une association de ce type est irréversible. On peut donc penser également que la titine au niveau de cette région Z9-I1 est constamment saturée. En revanche le fragment I2-I6 présente un profil différent du fragment Z9-I1 puisqu'on assiste à une double saturation du fragment. Il est à noter que le tandem Ig I3-I4 présente le même profil que I2-I6 ce qui souligne l'interdépendance des domaines Ig dans cette région. Au niveau de la constante d'affinité déterminée pour I2-I6, elle est 5000 fois inférieure à celle du fragment Z9-I1 (200nM contre 0.04nM) ce qui montre bien la différence d'effet engendré par le cation. L'association du calcium sur la titine semble induire des changements structuraux notoires. Nous avons tenté de les mettre en évidence. En se basant sur le caractère amphiphilique de la séquence d'insertion entre Z9 et I1 ou encore la précipitation du fragment de titine de 800kDa en présence de calcium, nous avons émis l'hypothèse d'une agrégation de la titine. Nous avons utilisé une gel filtration afin de montrer ce processus de polymérisation. Les différents résultats obtenus montrent une polymérisation des fragments de titine en présence de calcium. On assiste dans tous les cas de figure au passage d'une forme monomérique à une forme hexamérique. On note la présence d'une forme transitoire qui est un trimère. En 1993, Funatsu *et al.*, affirment qu'une région de la molécule de titine serait capable de s'agréger jusqu'à six molécules de titine dans un demi sarcomère (Liversage *et al.*, 2001). Le fragment Z9-I1 a une forme hexamérique quasi invariable et ce même si on augmente la concentration du calcium. Par contre, le fragment I2-I6 a une polymérisation modulée par le calcium. En effet, on peut noter une diminution des formes présentes au détriment d'une forme intermédiaire stable. C'est la forme prédominante pour des concentrations inférieures au micromolaire. Au deçà, il y a un réarrangement manifesté par le passage du trimère à l'hexamère. Nous sommes convaincus que l'agrégation de la titine dans la région N1 garantirait une meilleure organisation dans l'espace des molécules de titine. Dans cette région, tous les domaines Ig seraient en mesure d'être un ligand du calcium de part leur structure analogue aux domaines C2 mais aussi par nos résultats obtenus. En outre, la forte constante d'affinité observée entre le fragment Z9-I1 et le calcium montre que dans cette zone la titine est en permanence saturée et organisée en hexamère. Ainsi au sortir de la strie Z, la titine serait organisée en six filaments et serait à cet endroit une structure rigide par opposition à sa portion élastique. Cette affirmation est renforcée par l'observation de la région N1 définie comme une zone qui n'est pas affectée par l'étirement du sarcomère (Furst *et al.*, 1988 ; Trombitas and Pollack, 1993). En aval de cette zone, la région I2-I6 contenant l'épitope N1 serait aussi rigide à l'image de la zone Z9-I1

mais serait capable de moduler cette rigidité selon la quantité de calcium intracellulaire. Ainsi lors des concentrations calciques rencontrées au repos, elle serait sous une forme dépliée puis évoluerait dans sa forme rigide pour des concentrations calciques rencontrées lors du phénomène de contraction musculaire. Cette modulation structurale calcium dépendante pourrait permettre aux filaments de titine de s'adapter à l'alternance tension-relaxation mais aussi de moduler la fixation de nombreux ligands dans cette région proche de la strie Z.

### **III. Interaction des calpaïnes 1 et 3 avec la titine à proximité de la strie Z**

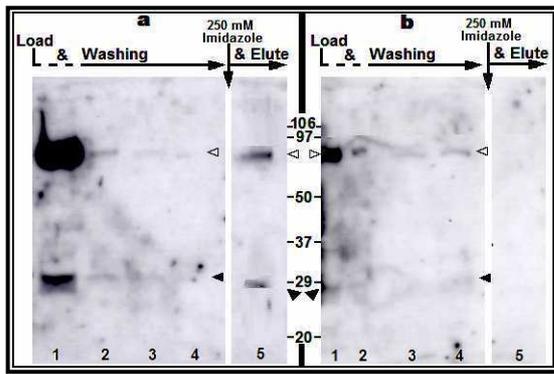
#### **III.1 Fixation de la calpaïne 1**

##### III.1.1 Introduction

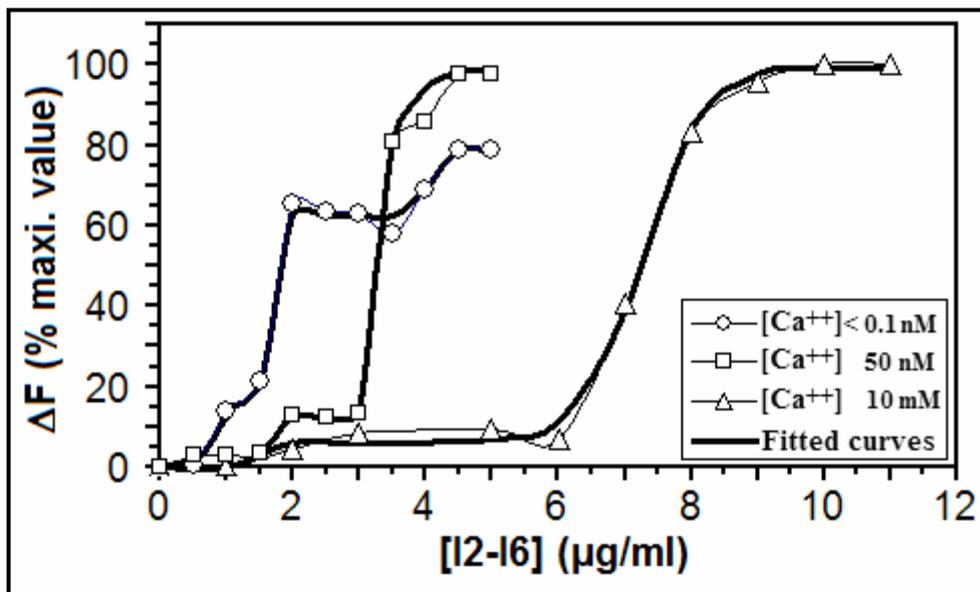
Depuis plusieurs années, notre groupe s'intéresse à la fonction, la régulation ou encore les substrats des calpaïnes dans le muscle. Dans ce cadre, on s'attache à rechercher des partenaires cytosquelettiques des calpaïnes.

La calpaïne 1 a une localisation controversée dans le muscle. Elle serait associée à la strie Z (Ishiura *et al.*, 1980 ; Dayton and Schollmeyer, 1981) ou encore majoritairement liée à la bande I (Yoshimura *et al.*, 1986). Dans une récente étude, nous avons montré que la calpaïne 1 s'associait à la titine dans les régions N1 et N2 du sarcomère. Dans ces mêmes régions, il y a une forte fixation de calcium (Raynaud *et al.*, 2005). Dans la région N1, la calpaïne se fixe sur la région I2-I5 de la titine selon un processus calcium dépendant (Raynaud *et al.*, 2005). Ce cation semble important car nous avons montré que la titine avait un site de haute affinité pour le calcium dans la région Z9-I1 (Coulis *et al.*, 2004). Le calcium permettrait de mieux structurer la titine afin de répondre au mieux à l'alternance contraction/relaxation. Ces résultats montrent l'étroite relation existant entre le calcium, la calpaïne 1 et la titine.

L'objectif de ce travail est donc dans un premier temps de préciser la région I2-I5 le domaine Ig-like qui supporte l'interaction avec la calpaïne 1. Dans un second temps, on va essayer de préciser le rôle du calcium dans l'interaction calpaïne 1/titine. En testant des fragments recombinants par une approche biochimique *in vitro*, on montre que la structuration induite par la fixation de calcium sur la titine module la fixation de la calpaïne 1.



**Figure N°8 : Histidine pull-down assay** a: la calpaïne 1 est mise en présence du fragment I2-I6 sur la résine NiNTA. L'excès de protéase est détecté en Western blot dans le non retenu L et pendant les lavages (washing). L'interaction a lieu entre les deux protéines puisqu'on détecte les deux sous unités dans l'éluat provoqué par l'ajout de 250mM imidazole.  
 b Nous avons réalisé un témoin en absence de titine. Si on retrouve bien la calpaïne 1 éliminée dans le non retenu et les lavages, elle ne se fixe pas sur la résine confirmant l'interaction observée.



**Figure N°9 : Variation de la fluorescence de la calpaïne 1 couplée au FITC en présence de concentrations croissantes du fragment I2-I6.** L'expérience a été menée à différentes concentrations calciques.

### III.1.2 Résultats

#### ***III.1.2.1 La calpaïne 1 se fixe au fragment I2-I6***

C'est une question que l'on voulait vérifier pour confirmer les résultats obtenus par le groupe qui situait le site de fixation de la protéase entre I2-I5 (Raynaud *et al.*, 2005). Nous avons pu le démontrer en réalisant une chromatographie d'affinité. L'étiquette histidine du fragment I2-I6 dans sa partie C-terminale lui permet d'être retenu sur la colonne. Si le fragment I2-I6 est capable de fixer la calpaïne 1, le complexe sera retenu sur la colonne et sera élué avec une forte concentration d'imidazole (250mM). Comme on peut le voir sur la figure n°8, quand la calpaïne 1 est chargée sur la résine NiNTA sépharose, la totalité est récupérée et détectée en Western Blot dans le non retenu et les lavages successifs. En revanche, on ne retrouve pas de calpaïne 1 dans les fractions éluées à 250mM imidazole. En parallèle, nous avons chargé le complexe I2-I6/calpaïne 1 sur la résine NiNTA. L'excès de protéase a été éliminé dans le non retenu et les lavages. En revanche, nous avons pu détecter en Western Blot, la présence des deux sous unités dans les fractions éluées à 250mM imidazole. Ce résultat implique que la protéase est dans une forme native quand elle s'associe à la titine.

#### ***III.1.2.2 Le calcium module l'interaction de la $\mu$ -c alpaïne sur le fragment I2-I6***

La fixation de la  $\mu$ -calpaïne a été suivie en phase liquide en mesurant les variations de fluorescence de la protéase couplée au FITC (25 $\mu$ g/ml) induits par l'addition de concentrations croissantes de titine. Nous avons mené l'expérience en présence de trois concentrations calcium définies selon la courbe de titration du fragment I2-I6. En effet, à ces concentrations surviennent des changements structuraux importants et nous avons voulu voir si ces changements pouvaient affecter la fixation de la calpaïne 1 (Figure n°9).

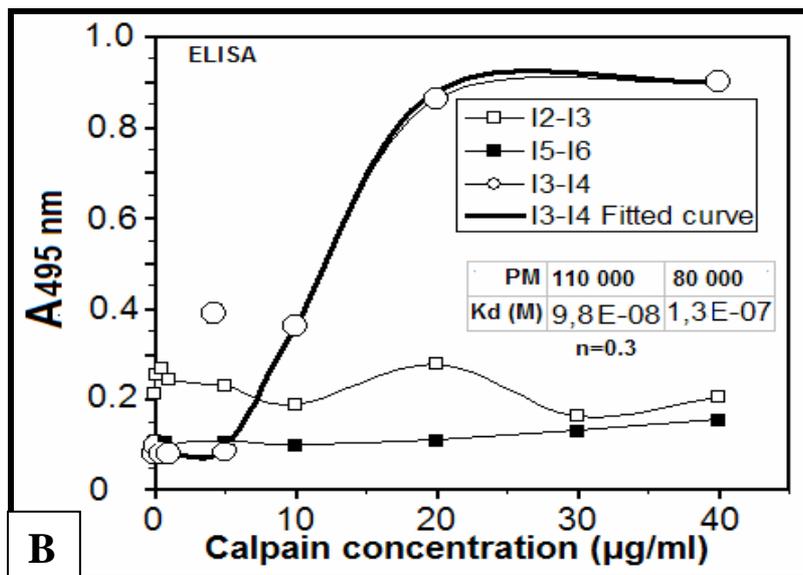
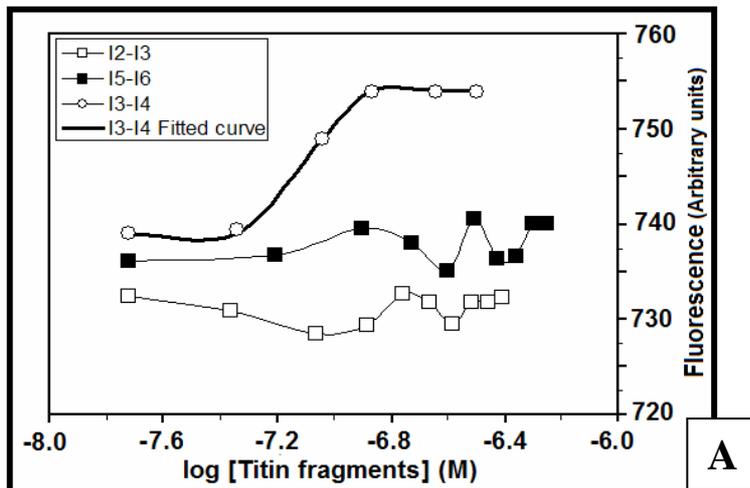
Au niveau le plus bas de calcium ( $2.4 \cdot 10^{-11}$ M), on observe une variation de la fluorescence en trois phases quand on ajoute des quantités croissantes de titine. La fluorescence de la calpaïne couplée au FITC augmente jusqu'à 15% pour une concentration de titine de 0.5 $\mu$ g/ml. Il s'ensuit une augmentation jusqu'à 65% de fluorescence. On observe par ailleurs une chute de la fluorescence pour des concentrations comprises entre 2 et

	Kd values for each transition* (nM)		
Ca <sup>++</sup> (M)	2.4 10 <sup>-11</sup>	5 10 <sup>-8</sup>	1 10 <sup>-3</sup>
Transition 1	18 ± 2	ND <sup>2</sup>	ND
Transition 2	33 ± 4	29 ± 4	30 ± 5
Transition 3	77 ± 9	65 ± 7	ND
Transition 4	ND	ND	140 ± 7

**Tableau N°1 : Constantes de dissociation entre la calpaïne 1 et le fragment I2-I6 déterminées en fluorescence**

Ca (M)	2.4 10 <sup>-11</sup>	5 10 <sup>-8</sup>	12 10 <sup>-6</sup>	10 10 <sup>-3</sup>
Kd (µg/ml)	23	30	37	32
Kd (M)	2.1 10 <sup>-7</sup>	2.7 10 <sup>-7</sup>	3.2 10 <sup>-7</sup>	2.9 10 <sup>-7</sup>
A492nm. Maxi	2.45	2.83	3.21	2.95

**Tableau N°2 : Maximums d'absorbance et constantes de dissociation obtenues en ELISA et issues de l'interaction entre la µ-calpaïne et le fragment I2-I6**



**Figure N°10: Screening du site de fixation de la calpaïne 1.** A) Interaction en phase solide entre la µ-calpaïne et les tandems recombinants I2-I3, I3-I4, I5-I6. B) Interaction en phase soluble entre la calpaïne 1 couplée au FITC et les tandems recombinants I2-I3, I3-I4, I5-I6

3.5µg/ml de titine. Elle pourrait être la conséquence d'un relargage de la calpaïne 1 suite à un réarrangement de la titine. Nous avons lissé cette courbe et déterminé les Kds à partir de l'équation de Hill pour trois sites de fixation. Nous avons obtenu des Kds de 18±2 nM pour la première transition, 33±4 nM pour la deuxième et enfin 77±9 nM pour la dernière transition (Tableau n°1).

Quand l'interaction est conduite en présence de 50nM calcium, on constate que le profil est biphasique et que l'augmentation de fluorescence a lieu pour des concentrations plus importantes de titine. Elle survient entre 1.5 et 2µg/ml et précède un plateau qui a lieu entre 2 et 3µg/ml. Ensuite on observe une augmentation de la fluorescence jusqu'à atteindre la valeur maximale (100%) pour des concentrations de titine comprises entre 3 et 4.5µg/ml. Les Kds ont été également déterminés pour deux sites de fixation. Nous avons obtenu des Kds de 29±4 nM et 65±7 nM respectivement (Tableau n°1). Il est intéressant de remarquer qu'on retrouve le même plateau observé précédemment entre 2 et 3µg/ml de titine. Ceci suggère que des évènements de même nature affectent le complexe entre ces deux concentrations. Plus encore, le complexe semble se réorganiser à des concentrations bien définies de titine.

Pour des concentrations calciques de l'ordre du milimolaire, on obtient une courbe biphasique avec une augmentation de la fluorescence (3 à 4%) pour une concentration en titine de 1 à 2µg/ml suivie d'un long plateau entre 2 et 6µg/ml avant d'atteindre la valeur maximale au-delà de 6µg/ml. Les constantes de dissociation ont été établies à partir de l'équation de Hill pour deux sites et sont de 30±5 nM et 140±7 nM respectivement (Tableau n°1). Ces résultats montrent que la fixation de la µ-calpaïne (225 nM) est optimale pour 75nM de fragment I2-I6 et pour une concentration calcium voisine de  $1.9 \cdot 10^{-7}M$ . A cette concentration, le fragment I2-I6 est organisé en trimère ce qui conforte bien nos résultats puisqu'il faut trois fois plus de calpaïne 1 que de fragment I2-I6 pour une fixation optimale. Le tableau ci-dessous montre qu'en dépit de l'augmentation de la concentration du calcium, les transitions surviennent toujours pour les mêmes concentrations en titine. On peut donc penser qu'outre l'organisation du fragment, sa concentration est importante dans l'interaction avec la calpaïne 1.

La fixation de la µ-calpaïne sur le fragment I2-I6 a aussi été étudiée en phase solide par la technique ELISA. Nous avons immobilisé le fragment I2-I6 (1µg/ml) et rajouté des concentrations croissantes de calpaïne 1 en présence de différentes concentrations calcium. Nous décrivons les constantes de dissociation et les maximums d'absorbance dans le tableau ci-dessous. Les données accumulées pour cette expérience montrent que le calcium cause très peu de changement au niveau des constantes ou des maximums d'absorbance. Les Kds varient

entre  $2.1 \cdot 10^{-7}$  et  $3.2 \cdot 10^{-7}$  M alors que les absorbances maximales oscillent entre 2.4 et 3.2 unités (Tableau n°2). Ces résultats contrastent avec les résultats obtenus en phase soluble. Ces différences proviendraient du fait que le fragment une fois immobilisé ne pourrait pas se structurer correctement du fait des fortes contraintes imposées par le plastique.

### ***III.1.2.3 La $\mu$ -calpaïne se fixe sur le domaine I4 de la titine***

Nous avons pu le démontrer en utilisant différents tandems recombinants de la région I2-I6 à savoir I2-I3, I3-I4, I5-I6 dans des interactions en phase solide ou en phase liquide. Cette étude a été menée pour une concentration calcium libre très faible ( $2.4 \cdot 10^{-11}$ M).

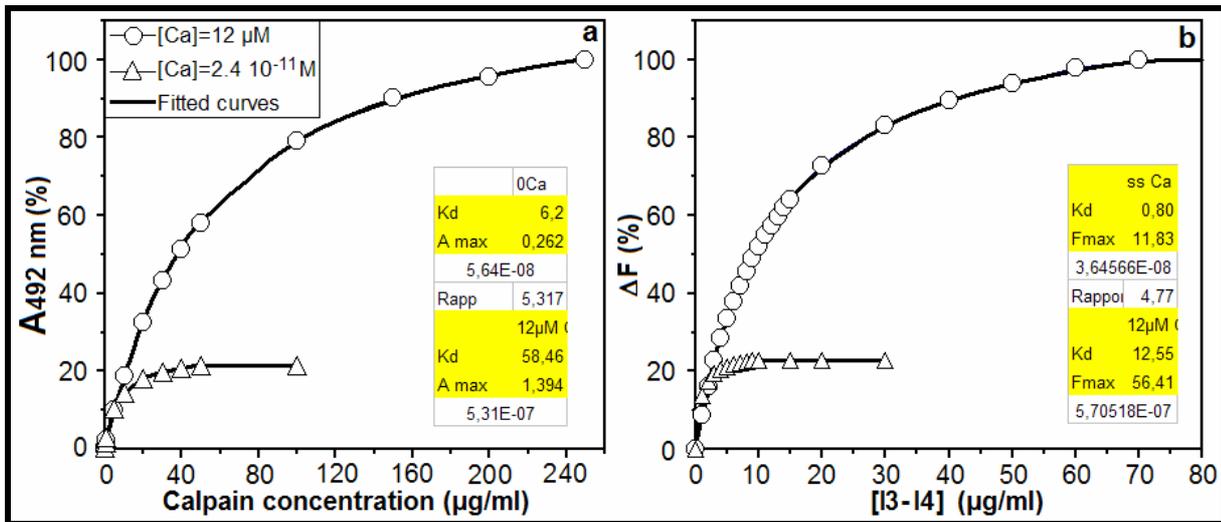
- **Phase liquide**

Nous avons rajouté des concentrations croissantes de chaque tandem d'Igs dans le milieu réactionnel contenant la calpaïne 1 couplée au FITC. Nous avons mesuré les variations de fluorescence induites. Il n'y a pas de variation de fluorescence observée quand on rajoute des quantités croissantes des domaines I2-I3 et I5-I6 alors que l'on observe une augmentation de la fluorescence quand on rajoute les domaines I3-I4 en concentration croissante (Figure n°10A). Comme les domaines I2-I3 n'affectent pas la fluorescence de la calpaïne 1 couplée au FITC, on peut affirmer que la fixation de la protéase a lieu sur le domaine I4 de la titine avec une constante de dissociation de  $89\text{nM} \pm 1\text{nM}$ . Elle est conforme à la constante de dissociation obtenue pour le fragment I2-I6 en phase soluble pour la transition T3 ( $K_d=77\text{nM}$ ).

- **Phase solide**

Nous avons obtenu des résultats similaires en phase solide. Nous avons immobilisé les tandems recombinants et ajouté des concentrations croissantes de calpaïne 1. On assiste à une augmentation de l'absorbance uniquement pour le tandem I3-I4 à l'inverse des tandems I2-I3 et I5-I6 ce qui suggère que ces derniers ne s'associent pas à la  $\mu$ -calpaïne (Figure n°10B). La constante de dissociation déterminée ( $K_d=98 \pm 2\text{nM}$ ) est sensiblement la même que l'on a obtenu en phase liquide.

La calpaïne 1 se fixe sur le domaine I4 et cette fixation est aussi forte qu'avec le fragment I2-I6.



**Figure N°11 : Le calcium module l'interaction entre la calpaïne 1 et le fragment I3-I4.**

- Interaction en phase solide de la calpaïne 1 avec le fragment I3-I4 à différentes concentrations de calcium libre.
- Interaction en phase soluble entre le fragment I3-I4 et la  $\mu$ -calpaïne à deux concentrations en calcium données.

### ***III.1.2.4 Le calcium induit les mêmes effets sur le complexe calpaïne 1/I3-I4***

L'association entre la  $\mu$ -calpaïne et le tandem I3-I4 a été testée en absence et en présence de 12 $\mu$ M calcium libre. Cette concentration correspond au milieu du plateau survenant entre les deux sites de fixation du fragment I3-I4.

En milieu solide et en absence de calcium, nous observons une augmentation de l'absorbance avec une constante de dissociation de  $5.8 \pm 0.2 \cdot 10^{-8}$  M. La présence de 12 $\mu$ M calcium libre diminue certes la constante de dissociation ( $5.1 \pm 0.2 \cdot 10^{-7}$  M) mais dans cette condition le fragment de titine fixe 5 fois plus de calpaïne 1 (1.39 contre 0.26 en absence de calcium)(Figure n°11a). Comme pour le fragment I2-I6, la présence de concentrations physiologiques de calcium augmente considérablement la capacité de fixation de la titine et ce même pour des régions plus petites.

Les expériences en phase soluble corroborent les résultats précédents. On obtient une fixation de la protéase beaucoup plus importante quand on est en présence de calcium dans le milieu réactionnel en comparaison avec les résultats obtenus quand il n'y a pas de calcium dans le milieu. Le rapport est sensiblement le même c'est-à-dire que le fragment I3-I4 fixe 4 à 5 fois plus de calpaïne 1 en présence de 12 $\mu$ M calcium libre (Figure n°11b). Par ailleurs, les constantes de dissociation sont quasi identiques à ceux obtenus en ELISA.

### **III.1.3 Discussion**

L'interaction de la calpaïne 1 avec le fragment de titine I2-I6 a été explorée en phase liquide en présence de différentes concentrations calcium déterminées par les Kds obtenus au cours de la titration calcium du fragment.

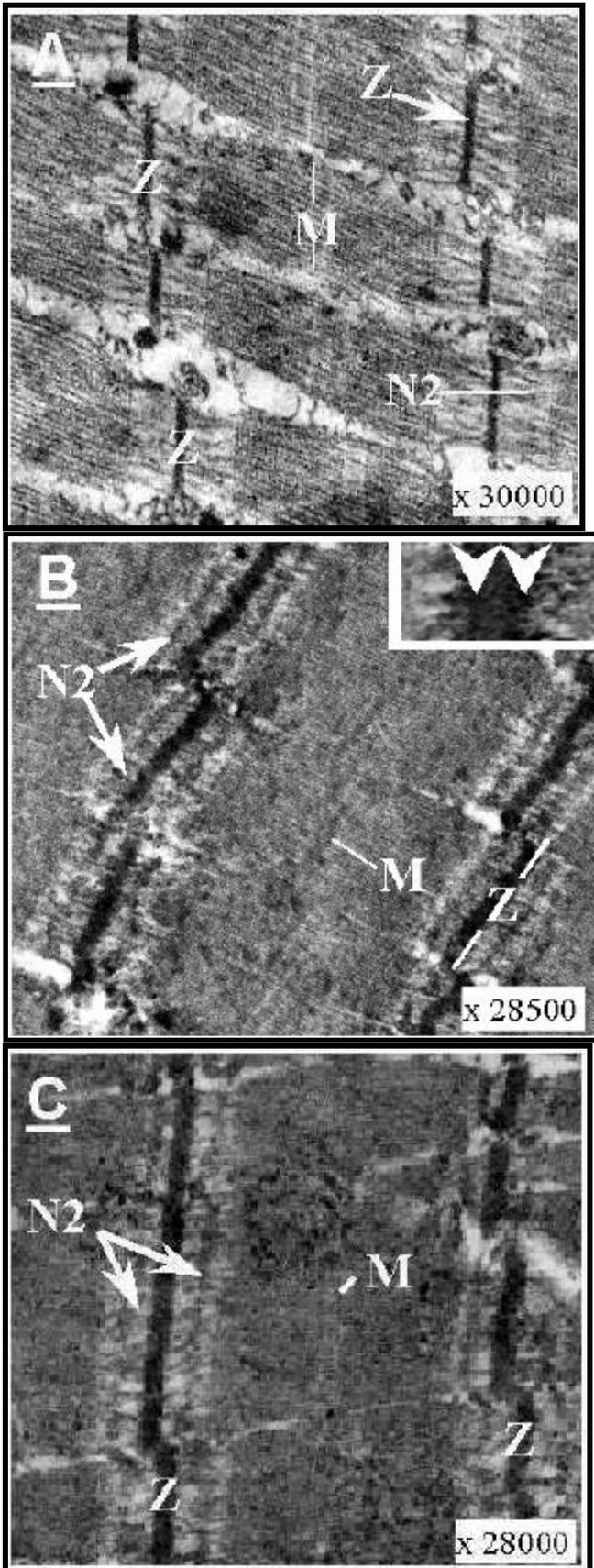
La fixation optimale de calpaïne 1 a lieu pour une concentration calcique de  $1.9 \cdot 10^{-7}$  M, une concentration qui correspond à la première transition observée lors de la titration du fragment. A cette concentration calcium, la titine est à une concentration de  $7.5 \cdot 10^{-8}$  M et a une fixation maximale de calpaïne soit  $22.5 \cdot 10^{-8}$  M. Il faut donc 3 fois plus de  $\mu$ -calpaïne que de titine pour obtenir une association optimale. Ce rapport est en adéquation avec l'organisation trimérique de la titine à cette concentration.

A de faibles concentrations calcium ( $2.4 \cdot 10^{-11}$  M), la quantité de calpaïne 1 fixée sur le fragment I2-I6 n'excède pas 80%. Cette quantité relativement importante suggère qu'en

absence de calcium, il y a une importante proportion de calpaïne 1 associée dans le sarcomère. Une forme associée qui pourrait représenter 30% de la quantité de  $\mu$ -calpaïne présente dans une fibre (Murphy *et al.*, 2006). La titine serait en quelque sorte un réservoir de  $\mu$ -calpaïnes inactives qui seraient libérées en fonction des besoins du muscle. Toutefois le mécanisme de relargage reste encore à élucider même si le calcium semble avoir un rôle à jouer dans le processus.

Nous avons aussi restreint le site de fixation de la  $\mu$ -calpaïne. Le domaine Ig qui supporte l'interaction avec la protéase est le domaine I4. Ce résultat a été confirmé en ELISA et en fluorescence en utilisant les tandems recombinants I2-I3, I3-I4, I5-I6. La calpaïne 1 s'associe au domaine I4 en absence de calcium avec des constantes de dissociation de  $9.8 \pm 0.2 \cdot 10^{-8}$  M en phase solide et  $8.9 \pm 0.1 \cdot 10^{-8}$  M en phase liquide. Ces valeurs sont similaires à la constante de dissociation obtenue pour l'interaction calpaïne 1/I2-I6. Dans la continuité, nous avons cherché à voir si le calcium modulait l'interaction calpaïne 1 avec le tandem I3-I4 comme c'est le cas avec le fragment I2-I6. Le fragment I3-I4 a les mêmes aptitudes à fixer du calcium que le fragment I2-I6. La même structuration intervient quand la concentration en calcium augmente. L'augmentation de la concentration calcium entraîne une augmentation de la fixation de la  $\mu$ -calpaïne sur la titine. Une observation de ce phénomène a été rapportée *in vivo* (Murphy *et al.*, 2006).

En conclusion, la structuration induite par le calcium influence la quantité de protéase fixée. En outre, la  $\mu$ -calpaïne se fixe de manière calcium dépendante sur le domaine I4 de la titine à proximité de l'insertion N1. Le fait majeur réside dans les concentrations calcium nécessaires à optimiser l'interaction. En effet, elles sont inférieures aux concentrations calcium requises pour activer la protéase. De plus, ces concentrations sont physiologiques (Harkins *et al.*, 1993). Le calcium régule l'interaction entre la calpaïne 1 et la titine mais le cation pourrait également contribuer au relargage de la protéase. Cet aspect sera à explorer afin d'étudier la régulation de la libération de l'enzyme.



**Figure N° 12: Colocalisation cellulaire des calpaines 1 et 3.** (A) Muscle témoin où les anticorps primaires anti calp 1 et 3 ont été omis. (B) Localisation de la  $\mu$ -calpaïne à proximité de la strie Z et au niveau des lignes N2. (C) La calpaïne 3 se localise dans les mêmes zones que la calpaïne 1. Abréviations: A, A-Band; M, M-line; Z, Z-disk; N2, N2-line. (Fernandez *et al.*, 2000)

## ***III.2 Fixation de la calpaïne 3***

### **III.2.1 Introduction**

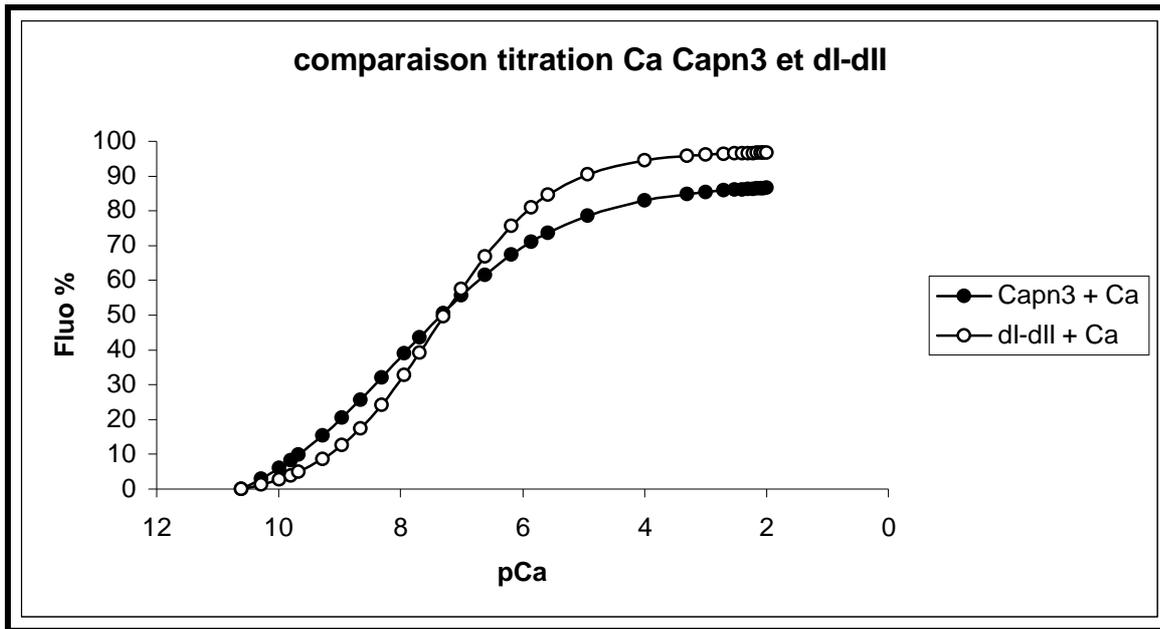
La calpaïne 3 est la calpaïne spécifique du muscle. Pourtant la localisation précise de la protéine dans le muscle demeure incertaine. En effet des études de double hybride ont révélé que la p94 se localisait au niveau des lignes N2 et M associée à la titine (Sorimachi *et al.*, 1995 ; Kinbara *et al.*, 1997). Au niveau de l'interaction, la fixation de la p94 au niveau de la bande I requiert la région IS2. En ce qui concerne la région C-terminale de la titine, l'interaction nécessite la calpaïne 3 entière. Ces différences de fixation soulignent une fonction physiologique différente selon la localisation de l'enzyme. Outre ces deux sites de fixation, la calpaïne 3 se fixerait au niveau de la strie Z (Sorimachi *et al.*, 1995 ; Keira *et al.*, 2003 ; Taveau *et al.*, 2003). Toutefois, ce ne sont que des observations immunohistochimiques et aucune localisation moléculaire dans cette région n'a été publiée.

Au laboratoire, nous avons réalisé ces expériences et montré que la p94 se colocalise avec la calpaïne 1 au niveau des lignes N1 et N2 (Fernandez, 2000) (Figure n°12).

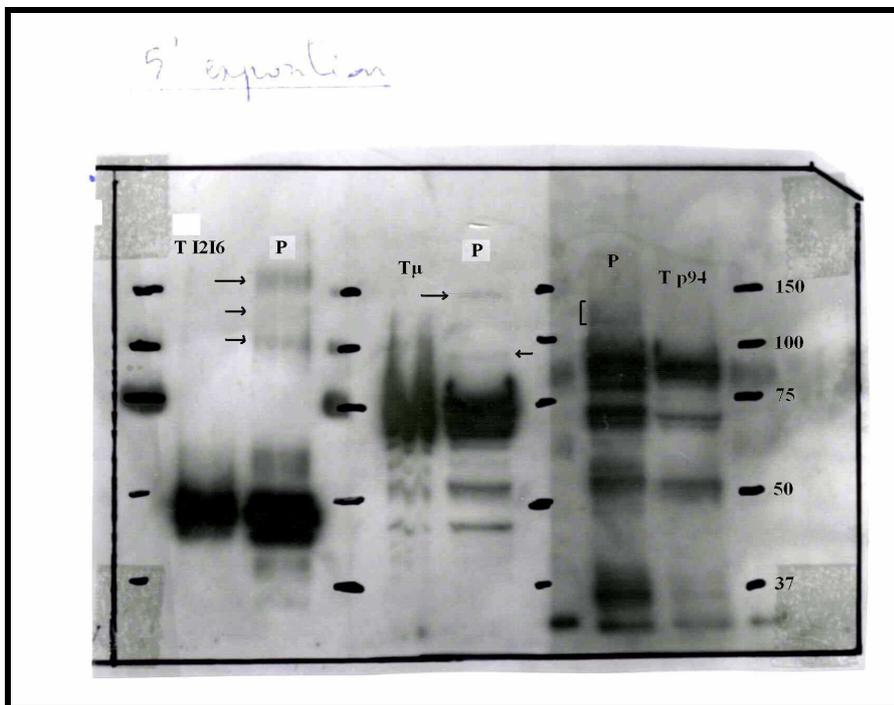
Or récemment, la calpaïne a été identifiée sous forme de complexe au niveau de la région I2-I5 de la titine (Raynaud *et al.*, 2005). L'analyse de ces résultats nous a amené à utiliser comme modèle *in vitro* le fragment I2-I5 et non le fragment I2-I6. Ce choix s'explique par la colocalisation observée en microscopie et par la fixation de la calpaïne 1 sur le domaine Ig-like I4 de la titine.

L'objectif de cette étude est de montrer une association de la calpaïne 3 sur la titine dans la région N1 au niveau des Igs-like I2-I5. Par ailleurs, à l'image des autres sites de fixation, on a tenté de déterminer quel domaine de la calpaïne 3 était engagé dans l'interaction avec la titine au niveau de la strie Z. Etant donné que les deux partenaires de l'interaction sont capables de fixer du calcium, nous avons aussi éprouvé l'influence du calcium dans l'interaction. Dans cette optique, nous avons dosé la fixation du cation sur la p94 afin de confronter nos résultats à ceux de la littérature. Nous avons pu confirmer notre hypothèse par une approche biochimique en mêlant des techniques en phase solide ou en solution telles que l'ELISA, la spectrofluorescence ou encore le pontage chimique.

Nous avons montré que la calpaïne 3 pourrait être qualifiée de nanocalpaïne car elle a une constante d'affinité vis-à-vis du calcium de l'ordre de 10nM. Nous avons également déterminé le site de fixation de la calpaïne 3 qui se situe sur le domaine I5 de la titine. L'interaction entre la protéase et la titine est modulée par la concentration en calcium libre.



**Figure N°13 : Titration calcium de la calpaïne 3.** La calpaïne 3 couplée au FITC est mise en présence de concentrations croissantes de calcium. La variation de fluorescence est enregistrée. En parallèle, la même expérience a été conduite avec le domaine I-II inactif.



**Figure N°14 : Pontage du fragment de titine I2-I6 avec les calpaines 1 et 3.** P correspond au pontage induit puis révélé en WB avec les anticorps anti-His (2000<sup>ème</sup>), anti-calpaïne 1(500<sup>ème</sup>) et anti-IS2 (500<sup>ème</sup>). A côté de chaque protéine concernée, on retrouve son témoin qui correspond au pontage de la protéine seule. De gauche à droite, on distingue le fragment I2-I6, la calpaïne 1 et enfin la calpaïne 3.

### III.2.2 Résultats

Nous avons voulu titrer la saturation de la calpaïne 3 vis-à-vis du calcium. En effet dans la littérature, peu d'informations sont données quant à l'affinité de la calpaïne 3 vis-à-vis du calcium. Si la calpaïne 1 est qualifiée de micro-molaire ou encore la calpaïne 2 qualifiée de mili-molaire, la calpaïne 3 serait qualifiée de nanomolaire. L'étude de la séquence amino acide montre qu'il est très difficile d'envisager de suivre la fluorescence intrinsèque. En effet les changements seraient difficiles à quantifier en raison de la répartition des acides aminés fluorophores. Nous avons donc décidé de coupler la protéine au FITC ce qui reflètera mieux les changements induits par la fixation du calcium.

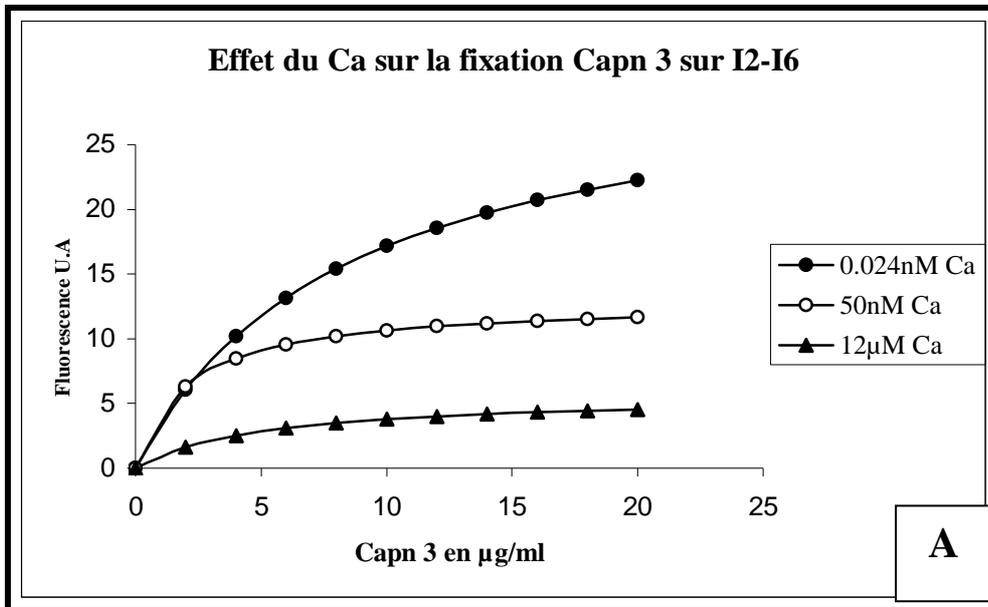
Nous avons obtenu une courbe monophasique où la valeur plateau est atteinte pour des concentrations calciques de l'ordre du milimolaire (Figure n°13). La constante d'affinité obtenue par itération d'après l'équation de Hill est de 10nM avec un nombre de Hill  $n=0.3$  ce qui signifie qu'il n'y a pas de coopérativité entre les domaines.

Nous avons par ailleurs titré les sous domaines I-II inactifs dans les mêmes conditions (Figure n°13). Nous avons obtenu une courbe de même profil que celle obtenue pour la calpaïne 3 avec une valeur plateau observée pour  $10^{-4}$  M Ca. Toutefois la constante d'affinité obtenue est de 40 nM ce qui est quatre fois moins important mais qui reste dans des les mêmes ordres de grandeur. Les sous domaines I et II sont les sites où se déroulent les principales modifications sous l'effet de la fixation du calcium.

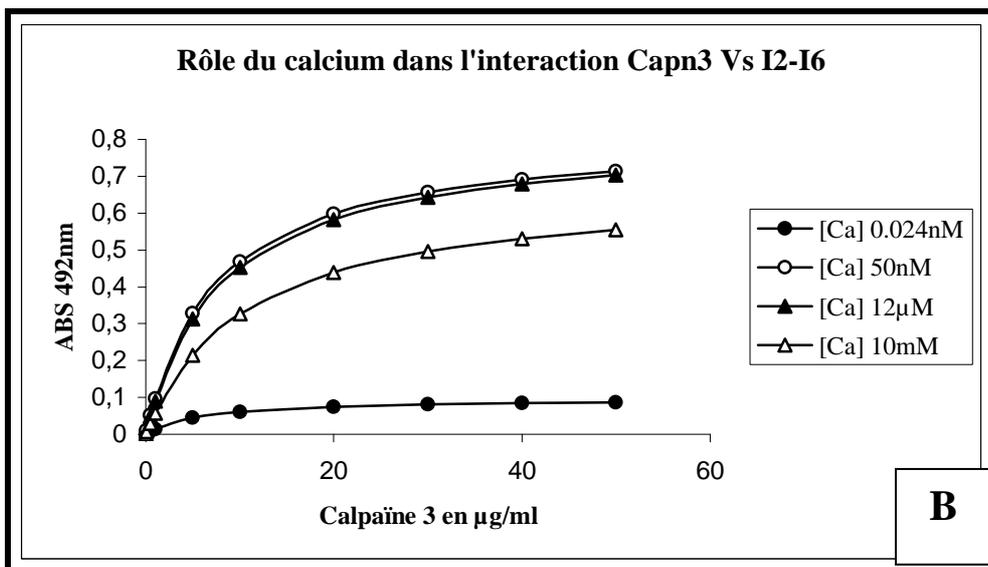
Un peu à l'image de ce que nous avons pu faire pour la calpaïne 1, nous avons posé deux questions. Savoir si la calpaïne 3 se fixe sur le fragment I2-I6 et déterminer si le calcium est capable de réguler l'interaction. Dans un premier temps nous avons vérifié que la calpaïne 3 se fixait bien au fragment I2-I6 par un pontage chimique. Par la suite, nous nous sommes intéressés à l'interaction calpaïne 3-I2I6 à différentes concentrations calciques tout en sachant qu'à l'inverse de la calpaïne 1, la calpaïne 3 sera saturée au même titre que la titine dans des conditions physiologiques.

### *III.2.2.1 La calpaïne 3 se fixe sur le fragment I2-I6*

Nous avons pu le démontrer en utilisant un pontage chimique. Nous avons testé l'interaction en solution en utilisant l'EDC, un ponteur couplé à un activateur le NHS (N-hydrosuccimide). Sommairement, le ponteur peut lier les groupements amines primaires type lysine à des groupements carboxyles (Acide glutamique ou aspartique) si ces résidus sont très proches dans l'espace. En intégrant dans le milieu réactionnel les deux calpaïnes 1 et 3, l'intérêt de l'expérience était double : Montrer que la calpaïne 3 se fixe sur le même fragment que la calpaïne 1 mais aussi prouver que le site de fixation de la p94 diffère de celui de la calpaïne 1. Le fragment I2-I6 (200 $\mu$ g/ml) est préincubé avec les calpaïnes (250 $\mu$ g/ml chacune) pendant 30 minutes à température ambiante avant d'initier le pontage. Après ajout de l'EDC et du NHS, nous avons laissé incuber une heure durant à température ambiante. Après électrophorèse et transfert sur membrane PVDF des complexes pontés, ces derniers sont révélés en Western Blot avec les anticorps adéquats. La figure n°14 nous permet de tirer plusieurs enseignements. On note la présence de trois complexes de masse moléculaire supérieure au fragment I2-I6 ce qui sous entendrait que le fragment à s'associe à trois partenaires différents. Ensuite, ce pontage confirme l'interaction de la calpaïne 1 avec le fragment. On note la présence de deux complexes de 90 kDa environ et de 150 kDa respectivement. Si le fragment de 150 kDa correspond à l'association des deux sous unités de la  $\mu$ -calpaïne avec la titine, le fragment de 90kDa est plus énigmatique et proviendrait vraisemblablement de l'association du fragment I2-I6 et de la petite sous unité. Enfin, le dernier enseignement que l'on peut apporter est que la calpaïne 3 se fixe également sur le fragment I2-I6. Cette association se fait sur un site différent de celui de la calpaïne 1 puisqu'on retrouve la présence d'un complexe vers 130-140 kDa. En clair, la calpaïne 3 s'associe au fragment I2-I6 sur autre site que le domaine I4, siège de l'interaction entre la  $\mu$ -calpaïne et le fragment de titine. Dès lors, cette s'association peut elle être modulée par le calcium à l'instar de la calpaïne 1, c'est tout l'enjeu des expériences que nous avons réalisées en phase solide et en phase soluble.



Ca (M)	$2.4 \cdot 10^{-11}$	$5 \cdot 10^{-8}$	$12 \cdot 10^{-6}$
Kd (µg/ml)	8.4	2	5
Kd (M)	$8.95 \cdot 10^{-8}$	$2.2 \cdot 10^{-8}$	$5.4 \cdot 10^{-8}$
Fluo Maxi	22.25	11.64	4.54



**Figure N°15 : Effet du calcium sur l'association de la calpaïne 3 sur le fragment I2-I6 en phase soluble (A) et en phase solide (B).**

Ca (M)	$2.4 \cdot 10^{-11}$	$5 \cdot 10^{-8}$	$12 \cdot 10^{-6}$	$10 \cdot 10^{-3}$
Kd (µg/ml)	5.8	7.5	8	10.6
Kd (M)	$6.2 \cdot 10^{-8}$	$8 \cdot 10^{-8}$	$8.5 \cdot 10^{-8}$	$1.1 \cdot 10^{-7}$
A492nm. Maxi	0.09	0.71	0.7	0.55

### ***III.2.2.2 L'interaction n'est pas affectée par la structuration de la titine mais par la saturation de la calpaïne 3 en calcium***

- **Phase liquide**

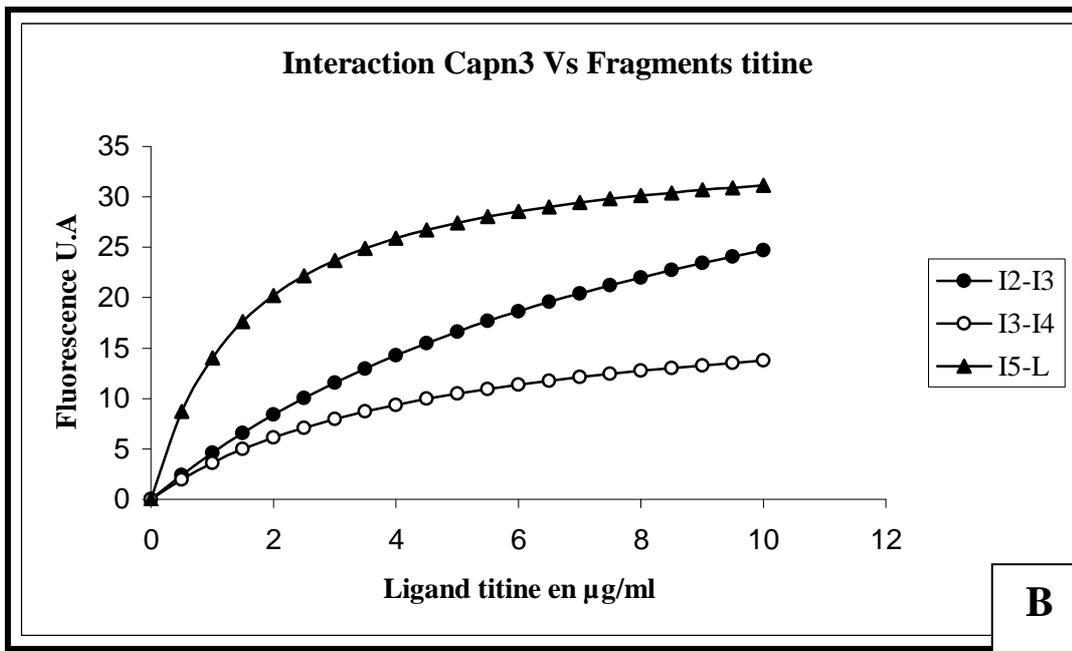
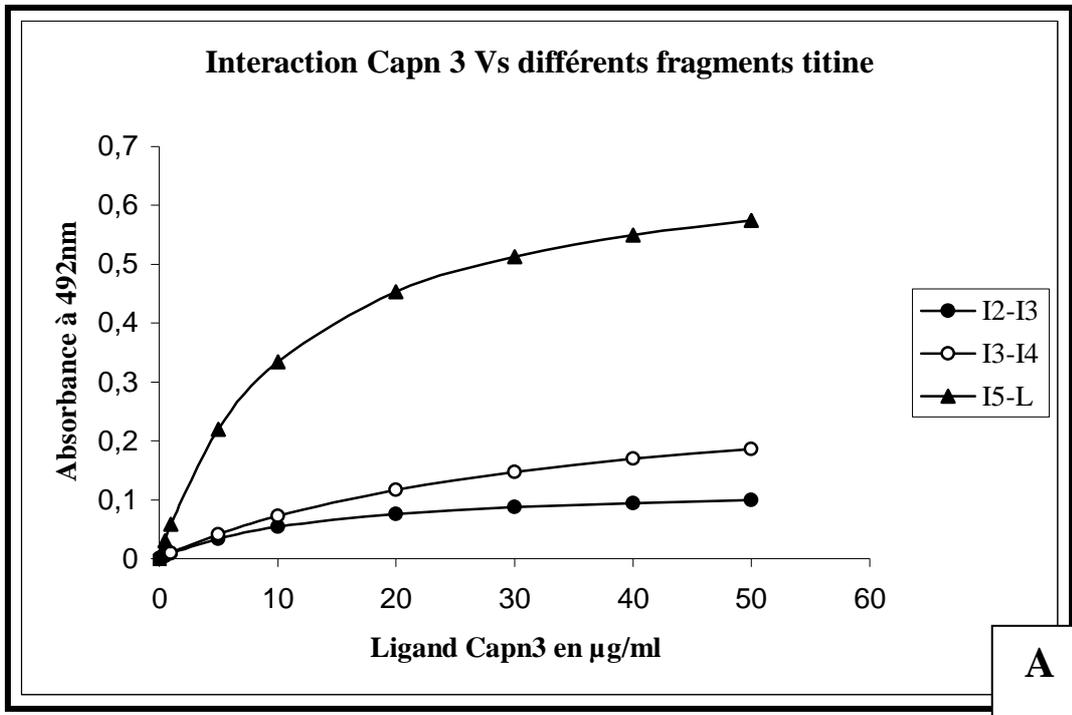
La fixation en phase liquide de la calpaïne 3 est suivie en mesurant les changements de fluorescence du fragment de titine couplée au FITC (25µg/ml) induits par l'ajout en quantité croissante de calpaïne 3 (Figure n°15A). L'expérience a été réalisée pour trois concentrations calciques différentes. Elles correspondent aux différentes transitions moléculaires survenant au cours de la titration calcium du fragment I2-I6. Ici la particularité provient du fait que la calpaïne 3 a une constante d'affinité vis-à-vis du calcium de 10nM. Ainsi pour la concentration la plus faible en calcium c'est-à-dire 0.02nM environ, la fixation de la calpaïne 3 est optimale sur le fragment I2-I6. La fixation de la p94 est optimale sur le fragment quand l'enzyme est dans un état inactif. En revanche pour une concentration en calcium libre de 50nM, on observe une diminution de moitié de la fixation de la calpaïne 3 sur le fragment I2-I6. Enfin pour des concentrations en calcium libre de l'ordre de 12µM, il y a très peu de variation de la fluorescence indiquant que la fixation de la p94 est minimale sur le fragment à ce stade.

Ces résultats montrent que la calpaïne 3 inactive se fixe de manière optimale sur la titine pour des concentrations basales en calcium et tend à diminuer dès que la concentration calcique augmente.

- **Phase solide**

La fixation de la calpaïne 3 sur le fragment I2-I6 a aussi été étudiée sur un support solide en réalisant un test ELISA. Nous avons opéré une fixation de la protéase sur le fragment I2-I6 immobilisé au fond des puits. Pour cette expérience, seule la titine I2-I6 est saturée à différentes concentrations calciques et on rajoute des quantités croissantes de calpaïne 3 insaturée puisque dans le tampon de titration contenant 0.02nM calcium libre. Dans ces conditions, nous avons pu observer l'effet de la structuration de la titine I2-I6 sur la fixation de la calpaïne 3 (Figure n°15B).

Pour des concentrations basales de calcium qui correspondent à un équilibre entre monomère et hexamère, on assiste à une concentration minimale en calpaïne 3. Pour des concentrations comprises entre 50 et 12µM calcium libre correspondant à l'émergence du trimère, on assiste à une fixation beaucoup plus importante de la calpaïne 3. Enfin, pour de fortes concentrations en calcium libre conduisant à une disparition du trimère au profit du



**Figure N°16 : Interaction de la calpaïne 3 avec différents fragments de titine en phase solide (A) et en milieu liquide (B).**

monomère et où de l'hexamère, on observe une diminution de la fixation de la calpaïne 3. Ainsi la calpaïne 3, quand elle n'est pas saturée par le calcium, semble avoir un mode d'association proche de celui de la calpaïne 1.

### ***III.2.2.3 Restriction du site de fixation : La calpaïne 3 s'associe à la titine dans la région N1 via le domaine I5***

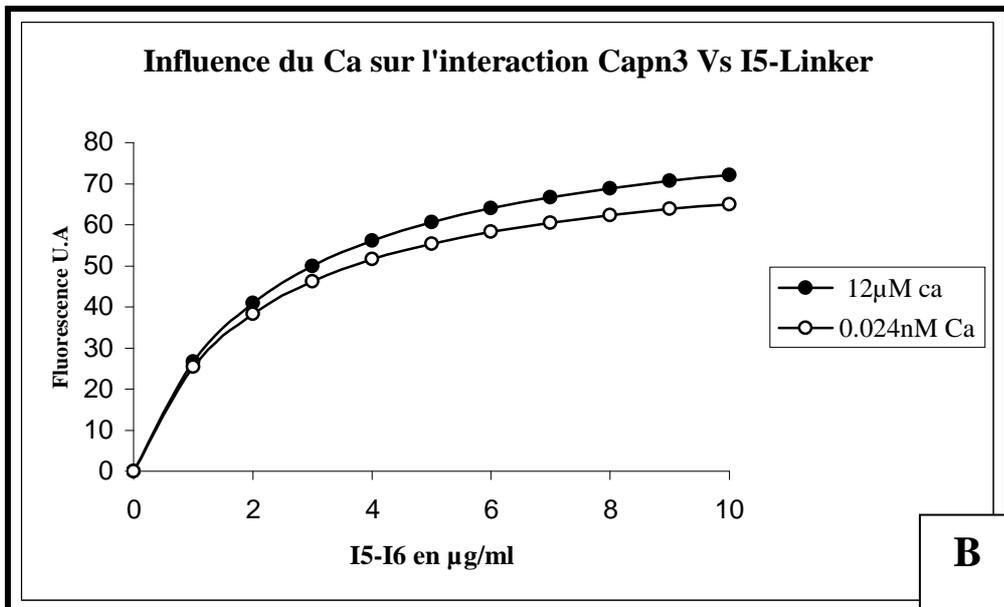
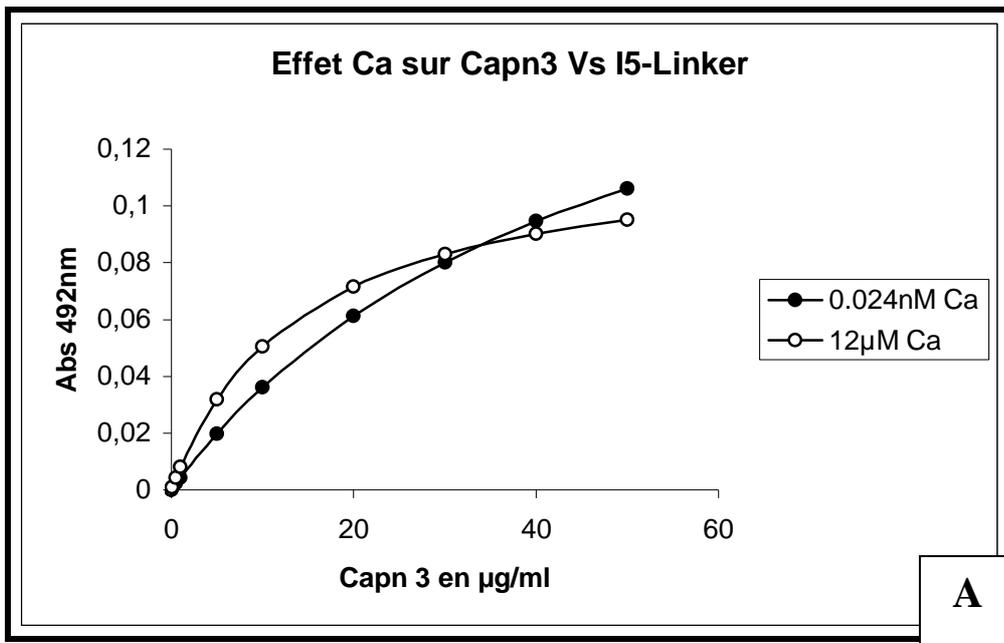
- **Phase solide**

Nos premiers résultats montrent que la calpaïne 3 se fixe sur I2-I6 mais également que cette fixation ne se fait pas sur I4 (cf pontage). A l'image de ce que nous avons fait pour la  $\mu$ -calpaïne, nous avons voulu affiner le site de fixation de la p94 dans des conditions où le calcium est en faible concentration. Nous avons d'abord exploré ce site de fixation en ELISA en immobilisant sur la plaque différents tandems de titine. On observe une fixation très importante de la calpaïne sur le fragment I5 et son linker alors que très peu de changements surviennent pour les sous fragments I2-I3 et I3-I4 (Figure n°16A)

- **Phase liquide**

Des résultats similaires sont obtenus avec l'expérience menée en phase soluble en observant les variations de fluorescence de la calpaïne 3 couplée au FITC en présence de quantité croissante des différents fragments de titine. On remarque que les ajouts croissants de I5-linker entraînent une augmentation significative de la fluorescence alors que pour les deux autres sous fragments même si on note une légère augmentation de la fluorescence, elle est moindre que pour le fragment I5-linker (Figure n°16B). En outre, la fixation de la calpaïne 3 sur le fragment I5-linker est du même niveau que celle enregistrée avec le fragment I2-I6.

Nous avons montré que précédemment que le calcium modulait l'interaction entre la calpaïne 3 et le fragment I2-I6 si la calpaïne 3 demeurait insaturée en calcium. Nous avons tenté de vérifier si l'effet du calcium est reproductible à l'échelle d'un domaine Ig en l'occurrence le domaine I5 flanqué de son linker. Nous n'avons pas réussi à l'inverse de I2-I6 ou encore I3-I4 à obtenir une titration calcium du fragment I5-linker. Néanmoins, des essais en ELISA et en fluorescence ont été menés afin de montrer une éventuelle influence du calcium dans l'interaction. Nous avons testé deux concentrations en calcium. La première équivaut à une concentration minimale de calcium (0.02nM) et la seconde est 12 $\mu$ M calcium libre.



**Figure N°17 : Influence du calcium sur l'interaction entre la calpaïne 3 et le fragment I5-Linker soit en phase solide (A) soit en milieu liquide (B).**

Ca (M)	$2.4 \cdot 10^{-11}$	$12 \cdot 10^{-6}$
Kd (µg/ml)	47	14
Kd (M)	$5 \cdot 10^{-7}$	$1.5 \cdot 10^{-7}$
A492nm. Maxi	0.1	0.09

Ca (M)	$2.4 \cdot 10^{-11}$	$12 \cdot 10^{-6}$
Kd (µg/ml)	2.1	2.3
Kd (M)	$1.3 \cdot 10^{-7}$	$1.5 \cdot 10^{-7}$
Fluo Maxi	65	72

En ELISA, nous n'avons pas observé de différence notable entre les deux conditions. La fixation de la calpaïne 3 semble être indépendante de la concentration de calcium (Figure n°17A). Ces observations sont confirmées en phase soluble où l'on constate que l'augmentation de la concentration calcique n'a aucun effet sur la fixation de la p94 (Figure n°17B).

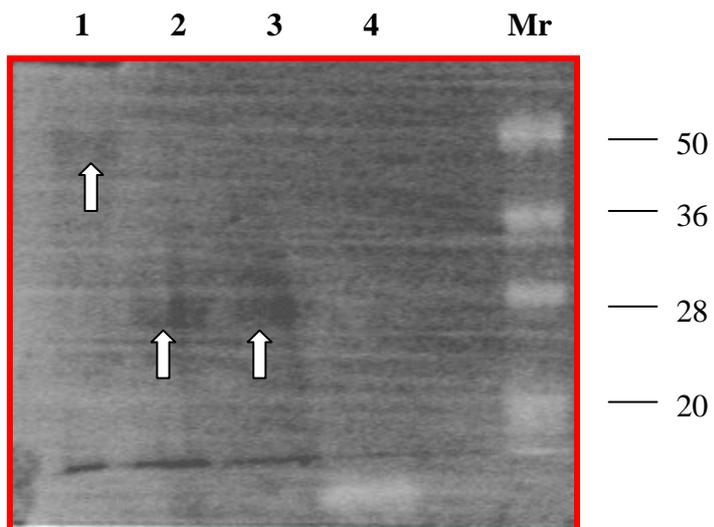
Ce résultat vient étayer nos affirmations antérieures à savoir que le calcium modulerait la fixation de la calpaïne 3 sur la titine non pas par la structuration de la titine mais en saturant la calpaïne 3 qui a une affinité de l'ordre du nanomolaire pour le cation. Enfin nous avons réalisé une expérience pour mettre en évidence les protéines susceptibles de fixer le calcium (Tatsumi *et al.*, 2001) (Figure n°18). Il apparaît que le domaine I5-linker ne fixe pas le calcium à l'opposé de I2-I6 ou encore I2-I3 et I3-I4 ce qui conforte l'hypothèse d'une fixation de la calpaïne 3 indépendante de la structuration de la titine induite par le calcium.

#### ***III.2.2.4 Domaine(s) de la calpaïne 3 impliqué(s) dans la fixation***

Nous avons vu dans la revue bibliographique que la calpaïne 3 se localisait au niveau de la région N2 mais aussi au niveau de la ligne M. En N2, l'association se fait par l'intermédiaire de la séquence IS2 alors que pour la ligne M, il faut la fixation de la protéine entière. Ces particularités suggèrent des desseins différents pour la protéase selon si elle se trouve en N2 ou à la ligne M. Nous avons montré lors de notre démarche expérimentale que la calpaïne 3 s'associerait avec la titine dans la région N1 à proximité de la strie Z. En produisant les différents domaines de la protéase, nous avons tenté d'identifier le ou les domaines impliqués dans la fixation de la calpaïne 3 sur la titine. Nous nous sommes appuyés sur les mêmes expériences ELISA et de fluorescence afin de caractériser les éventuelles interactions.

En phase solide, nous avons immobilisé le fragment I2-I6 et rajouter des concentrations croissantes de différents fragments de calpaïne 3. Nous parvenons à une augmentation significative de l'absorbance quand on rajoute des quantités croissantes des domaines I-II (Figure n°19A).

Nous obtenons les mêmes conclusions en phase soluble avec une nette variation de la fluorescence quand on rajoute des concentrations croissantes du fragment I-II (Figure n°19B). La calpaïne 3 s'associerait à la titine au niveau de la ligne N1 par l'intermédiaire des



**Figure N°18 : Caractérisation des fragments de titine capables de fixer le calcium.**

1. Le fragment I2-I6
2. Le tandem I2-I3
3. Le tandem I3-I4
4. Le domaine I5 et son linker et **Mr** est le marqueur de masse moléculaire employé.

Les fragments qui fixent le calcium sont révélés sous lumière UV (GEL-DOC, Biorad). Ils sont indiqués par une flèche. Des fragments testés, seul le domaine I5 et son linker ne fixe pas le calcium.

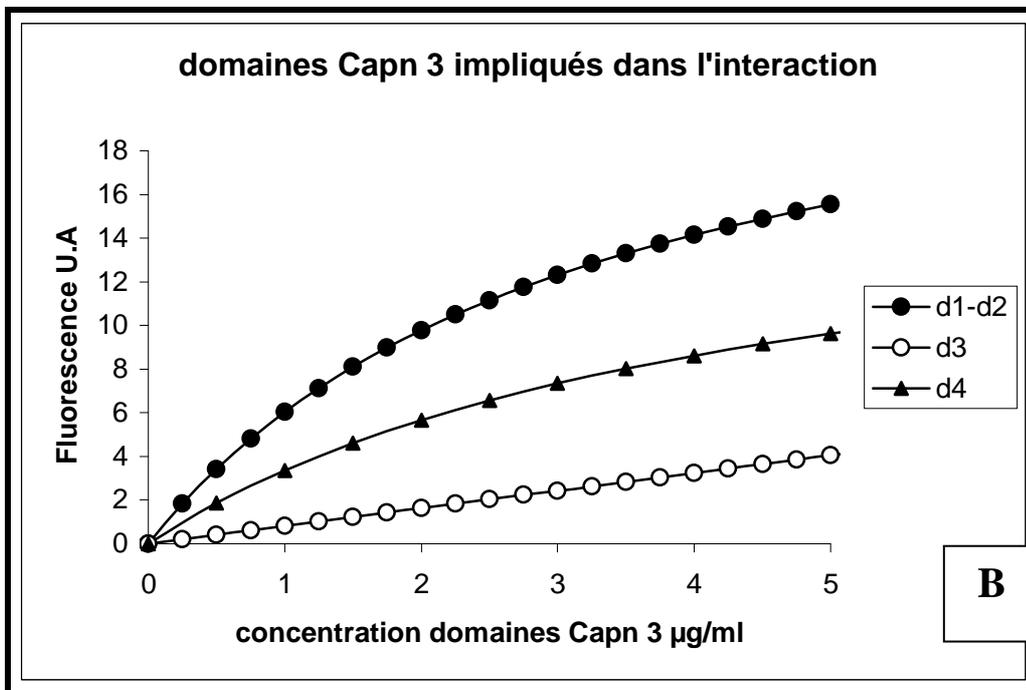
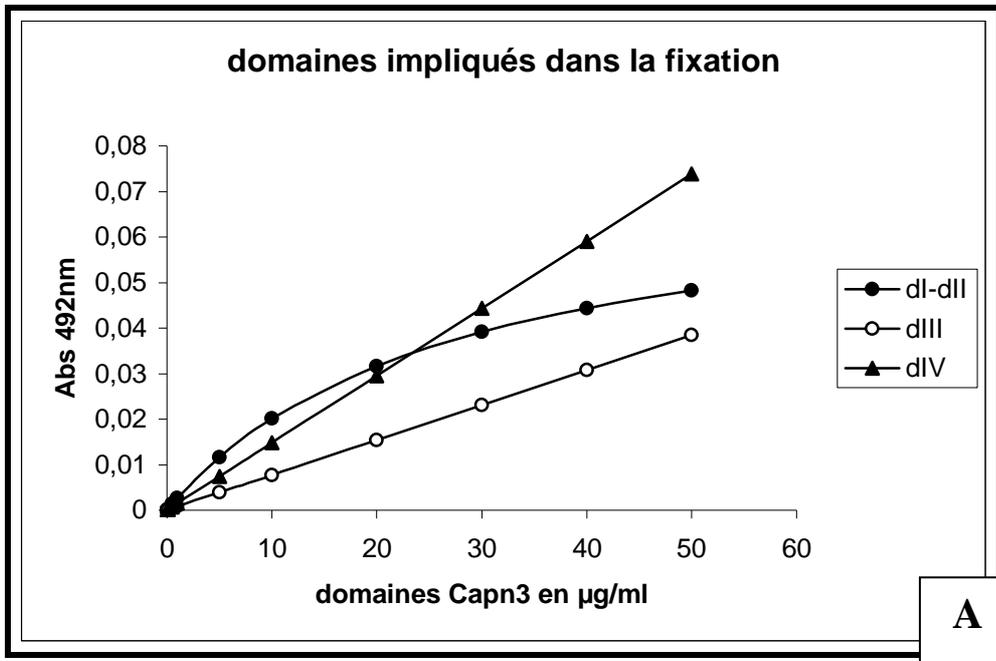
domaines catalytiques. L'activation dans cette zone est clairement à des fins protéolytiques envers ses substrats ou le pool de calpaïnes 3 inactives.

### III.2.3 Discussion

La calpaïne 3, calpaïne spécifique du muscle est à l'origine de la LGMD2A ou myopathie des ceintures (Richard *et al.*, 1995). C'est la seule dystrophie qui implique une enzyme protéolytique. En effet, cette pathologie est due à une diminution ou à la perte de l'activité protéolytique (Ono *et al.*, 1998 ; Richard *et al.*, 1999). Cette caractéristique souligne le rôle fondamental de la calpaïne 3 dans le bon fonctionnement musculaire. Les chercheurs ont multiplié les investigations sur la calpaïne 3 depuis la découverte de son implication dans la LGMD2A. Mais les tentatives ont souvent été infructueuses en raison de l'autolyse rapide de la p94 *in vitro*. L'activité de la calpaïne 3 n'est pas régulée par la calpastatine (Sorimachi *et al.*, 1993) mais par son association avec la titine (Sorimachi *et al.*, 1995 ; Kinbara *et al.*, 1997). En outre de ces localisations, la calpaïne semble se fixer au niveau de la strie Z comme en témoigne les différentes observations immunohistochimiques (Sorimachi *et al.*, 1995 ; Keira *et al.*, 2003 ; Taveau *et al.*, 2003 ; Fernandez, 2000). La titine apparaît donc comme un réservoir de calpaïnes 3 inactives où leur dissociation conduirait à l'activation de l'enzyme (Duguez *et al.*, 2006). Cette étude tente d'apporter quelques éléments de réponse sur la localisation moléculaire précise de la calpaïne 3 au niveau de la strie Z et de voir quel domaine est impliqué dans cette interaction. Par ailleurs, nous avons exploré l'importance du calcium dans l'interaction calpaïne 3-titine sachant que les deux protéines fixent du calcium.

#### ➤ *La calpaïne 3 a une forte affinité pour le calcium*

La fixation du calcium sur la calpaïne 3 est très controversée. Bien qu'à l'heure actuelle, il est bien établi que la protéase fixe du calcium, les constantes décrites dans la littérature sont très variables et vont du micro-molaire (Branca *et al.*, 1999 ; Murphy *et al.*, 2005) en passant par des valeurs intermédiaires (De Tullio *et al.*, 2003 ; Diaz *et al.*, 2006) jusqu'à avoisiner le milimolaire (Ono *et al.*, 2004). Dans bien des cas, ces valeurs reflètent les concentrations calciques nécessaires à activer les sous domaines protéolytiques *in vitro*. Par ailleurs, dans bien des cas, le calcium résiduel ou encore la fixation du calcium résiduel sur la calpaïne 3 ou ses fragments ne sont pas limités. Dans notre cas, nous avons essayé de réduire



**Figure N°19 : Domaine calpaïne 3 impliqué dans l'interaction.**

- A. Screening en ELISA
- B. Screening en Fluorescence en milieu liquide

le plus possible cette contamination, en traitant tous nos échantillons y compris la calpaïne 3 sur une résine ayant une forte avidité pour les cations comme le calcium.

Nous avons titré la calpaïne 3 couplée au FITC et observer la variation de fluorescence quand on rajoutait des concentrations croissantes de calcium. Nous avons ainsi obtenu une constante d'affinité d'environ 10nM avec un coefficient de Hill  $n=0.3$  ce qui signifie que dès que le calcium se fixe à la p94 son affinité pour les autres ligands diminue. Cette valeur conforte les observations d'une autolyse de la calpaïne 3 à de faibles concentrations calciques (Sorimachi *et al.*, 1993) probablement au niveau du nanomolaire calcium (Ono *et al.*, 1998). En outre, nous avons testé dans les mêmes conditions l'affinité des sous domaines I-II inactifs vis-à-vis du calcium. Nous avons déterminé une constante d'affinité de 40nM environ qui montre que cette valeur est du même ordre que la constante d'affinité déterminée pour la protéine entière. Dès lors on peut penser que les principaux changements survenant lors de la fixation du calcium s'opèrent au niveau du site catalytique. Il est clair qu'avec de telles concentrations en calcium, la calpaïne 3 serait en permanence active ce qui provoquerait de sérieux dommages dans le muscle ce qui renforce encore plus l'importance de son association avec la titine. Le calcium ne peut donc être considéré comme le signal d'activation pour les raisons énoncées précédemment. En revanche, la fixation du calcium à la lumière de ces résultats pourrait diminuer l'affinité de la protéase pour les autres ligands et par la même pourrait fragiliser l'association titine/p94.

➤ *La calpaïne 3 s'associe à la titine dans la région N1*

Nous nous sommes intéressés à la question après les résultats de colocalisation avec la calpaïne 1 obtenus en immunomicroscopie (Fernandez, 2000). Or nous avons montré que la calpaïne 1 se fixait sur le domaine I4 de la titine. Nous avons alors cherché à montrer que la calpaïne 3 se localisait dans une région proche du site de fixation de la calpaïne 1. Pour ce faire nous avons effectué un pontage chimique en présence du fragment I2-I6 et des deux calpaïnes. Une fixation de la calpaïne 3 sur le fragment I2-I6 a été caractérisée par la présence d'une bande à 140kDa environ. La taille correspondrait bien à l'association de la calpaïne 3 et du fragment I2-I5. Ce site diffère du site de fixation de la  $\mu$ -calpaïne puisqu'on retrouve également une bande de 150kDa environ qui équivaut à l'association des deux sous unités avec la titine. Ces observations se confirment par la présence de deux bandes de même masse moléculaire reconnues par l'anticorps anti-histidine. La calpaïne 3 est colocalisée avec la  $\mu$ -calpaïne au niveau de la région I2-I5.

➤ *Le calcium fragilise l'interaction de la calpaïne 3 sur I2-I5*

Le nombre de Hill inférieur à 1 (0.3) déterminé lors de la titration calcium de la calpaïne 3 suggère que la fixation de calcium entraîne une diminution de l'affinité de la calpaïne 3 vis-à-vis d'autres ligands. Cette interprétation est confirmée par le suivi de la fluorescence de la titine couplée au FITC en présence de concentrations croissantes de p94. Nous avons travaillé à des concentrations calciques correspondant aux transitions moléculaires de la titine. Mais la constante d'affinité déterminée auparavant montre que dans ces conditions la calpaïne 3 est saturée bien avant la titine. On assiste alors à une diminution de l'association de la calpaïne 3 avec la titine quand la concentration calcique augmente. Les modifications structurales induites sur la calpaïne 3 par le calcium fragilisent l'interaction. Or les premiers changements perceptibles dus à la fixation du calcium sur la p94 sont les clivages en N-terminal des régions NS et IS1 (Garcia Diaz *et al.*, 2006). Cette particularité souligne une contribution des régions NS et IS1 dans l'interaction avec la titine au niveau I2-I5. Les résultats que nous avons obtenu en phase solide montre que la structuration de la titine induite par le calcium n'a d'influence sur l'interaction avec la calpaïne 3 que lorsque cette dernière n'est pas saturée par le calcium.

➤ *La fixation de la calpaïne 3 sur le domaine I5-linker est indépendante de la concentration en calcium*

Le pontage nous a livré plusieurs informations à savoir que la calpaïne 3 était colocalisée avec la calpaïne 1 et que cette fixation était différente de la calpaïne ubiquitaire. A partir de cette observation et en utilisant des tandems recombinants, nous avons montré que la calpaïne 3 semble se fixer sur le domaine I5 flanqué de son linker avec des constantes d'affinité de 116nM en phase solide et de 98nM en phase liquide. Ces valeurs sont comparables à celles obtenues pour le fragment I2-I5 (62nM phase solide, 90nM phase soluble). Cette fixation est indépendante du calcium à la vue des résultats obtenus quand on a augmenté la concentration en calcium. Il n'y a pas de variation significative que ça soit pour l'affinité ou encore pour la quantité d'enzyme fixée.

➤ *Le site catalytique de l'enzyme est engagé dans l'interaction*

La calpaïne 3 s'associe à la titine en N2A par la région IS2 alors qu'au niveau de la ligne M, l'association requiert la protéine entière. Ces modes d'association différents suggèrent des fonctions différentes au sein du muscle (Duguez *et al.*, 2006). Nous avons donc cherché à identifier le domaine de la protéase impliqué dans l'association. L'utilisation de

sous domaines recombinants de la calpaïne 3 nous a permis de mettre en évidence une association préférentielle des sous domaines I-II avec une constante d'affinité de 538nM en ELISA et de 65nM en phase liquide. L'association des sous domaines I-II se ferait sans doute par les séquences IS1 et NS qui expliquerait la diminution observée *in vitro* quand la protéase est saturée en calcium. On peut donc penser que la titine par cette interaction empêche l'autolyse du site actif et par conséquent son activation. Enfin la calpaïne 3 cliverait la titine dans la région Z7 à I1 de la titine (Taveau *et al.*, 2003). Ces observations montrent que la p94 est localisée à proximité d'un potentiel substrat et que la dissociation au regard des sous domaines impliqués la rend rapidement opérationnelle.

### Conclusion

La calpaïne 3 est fortement régulée par la titine au travers de leur association. En outre d'une association au niveau de la ligne M et de la région N2A, notre étude montre une interaction de la calpaïne 3 au niveau du domaine I5 de la titine à proximité de la strie Z. Nos résultats viennent donc confirmer les expériences d'immunolocalisation (Fernandez, 2000 ; Keira *et al.*, 2003 ; Taveau *et al.*, 2003). Malgré les discordances dans la littérature, il est acquis que la calpaïne 3 a une autolyse calcium dépendante. Nous avons déterminé une constante d'affinité de la protéase vis-à-vis du calcium de l'ordre du nanomolaire alors que la valeur plateau est atteinte pour des concentrations de l'ordre du milimolaire. Ces deux concentrations reflètent bien l'activation calcium dépendante en deux étapes avec une autolyse rapide puis un clivage plus progressif (Diaz *et al.*, 2006) permettant d'activer la protéase. Cette titration a mis en évidence via le nombre de Hill que la fixation du calcium entraînait une diminution de l'affinité de la protéase pour les autres ligands. Nous avons alors tenté de voir qu'elle était l'importance de ce cofacteur dans l'interaction. Au vu des constantes d'affinité pour le cation, la p94 est saturée bien avant la titine dans la région I2-I6. Dans ce cas l'augmentation *in vitro* du calcium libre entraîne une diminution de la quantité de la calpaïne 3 fixée par la titine. Au niveau physiologique, l'augmentation du calcium intracellulaire n'induirait pas l'activation de la calpaïne 3 car associée à la titine. Toutefois cette augmentation du calcium intracellulaire pourrait fragiliser l'interaction entre les deux protéines. Le second clivage calcium dépendant n'a pas été clairement défini comme un phénomène intermoléculaire et pourrait apparaître comme un autre clivage intramoléculaire plus long agissant comme un relargage progressif de la protéase en fonction de la concentration calcique au niveau de la région N1. Le domaine impliqué dans l'interaction est

le site catalytique de telle sorte que la dissociation induise une enzyme totalement active à proximité de son substrat Z7-I1. Il apparaît, au regard de l'absence de fixation du calcium sur le domaine I5, que la structuration de la titine induite par le calcium n'influence pas l'association avec la p94. En revanche, la protéine au niveau de la strie Z maintient la calpaïne 3 dans une forme inactive en engageant directement les séquences NS et IS1.

Les résultats de notre étude montrent une répartition de la calpaïne 3 sur la titine de la strie Z à la ligne M selon des modes d'association différents. Si la protéase se localise à proximité de ses substrats (strie Z ou ligne M), elle ne possède pas de substrats dans la région N2A. Cette particularité fait que dans cette région N2A, la calpaïne 3 présente une fonction physiologique différente qui pourrait conditionner l'activation des pools de calpaines 3 inactives au voisinage de la strie Z et de la ligne M.

*Conclusions et  
Perspectives*

## **Conclusion générale**

### ***Le calcium induit la structuration de la titine dans la bande I***

La titine est une protéine filamenteuse qui s'étend de la strie Z à la ligne M. Nous avons montré que dans la région Z9-I6 que la titine était capable de se polymériser jusqu'à atteindre une forme hexamérique. Cette polymérisation est régulée par le calcium. Les dernières études ont montré que l'on comptait six filaments de titine par filaments épais (Liversage *et al.*, 2001). Ces résultats sont en adéquation avec l'observation d'une possible agrégation de la titine (Funatsu *et al.*, 1993). Cette structuration de la titine doit être finement régulée afin de contrôler les contraintes mécaniques imposées au filament de titine dans sa portion élastique. Elle survient dans une région allant de la bande A à la strie Z avant d'interagir avec les filaments fins. Outre notre région d'étude, la titine est capable de fixer du calcium dans la bande I au niveau PEVK, N2A (Tastumi *et al.*, 2001), des régions connues pour leur contribution à l'élasticité de la protéine (Labeit *et al.*, 2003). Cette régulation est induite par le calcium mais aussi de Z9 à I4. Il semble donc que le calcium se fixe tout le long de la bande I sur les domaines Ig-like qui ont une structure proche de celle des domaines C2. La titine établit de nombreuses connexions dans cette zone avec des partenaires variés que ça soit la LDH, le protéasome (Bassaglia *et al.*, 2005) ou encore les calpaïnes. Au travers de cette structuration, la titine apparaît comme un régulateur de la fixation des calpaïnes.

### ***Le calcium est à la base d'une régulation fine des calpaïnes dans la bande I***

Les calpaïnes occupent une place prépondérante dans la vie cellulaire. Ces protéases calcium dépendantes participent à une multitude d'évènements cellulaires comme le remaniement du cytosquelette, le cycle cellulaire ou encore la mort cellulaire. Néanmoins l'activation de ces protéases demeure un processus à explorer. Le calcium, un signal ubiquitaire, est le principal déclencheur de l'activation des calpaïnes mais peut également intervenir dans la transduction du signal. Nous avons confirmé les résultats précédents (Raynaud *et al.*, 2005) en montrant que la calpaïne 1 se fixe sur la titine au niveau du domaine

I4 à proximité de l'insertion N1. Dans des conditions physiologiques où les concentrations calciques sont basales, on note qu'il y a une fixation de la calpaïne 1 sur la titine. La  $\mu$ -calpaïne dans la cellule musculaire est répartie entre une forme libre dans le cytosol et une forme liée (Murphy *et al.*, 2006). La fixation de la  $\mu$ -calpaïne augmenterait jusqu'à être optimale quand la concentration en calcium libre augmente. Ce processus fait suite à un réarrangement de la titine. Ce résultat pourrait expliquer la diminution de la calpaïne 1 diffusable au profit d'une forme liée vraisemblablement à la titine (Murphy *et al.*, 2006) mais la protéase se placerait à proximité de ces substrats démontrant par la même son implication. Ainsi des complexes stables entre les calpaïnes et leurs substrats existent dans la cellule. Dans des conditions physiologiques, les calpaïnes sont extrêmement régulées pour éviter des dommages dans la cellule musculaire. L'optimisation de la fixation de la calpaïne sous une forme inactive quand la concentration calcique augmente pourrait être un processus de régulation.

La calpaïne 3 a un rôle crucial dans l'homéostasie cellulaire en atteste son implication dans la LGMD2A. Notre étude vient renseigner la localisation de la calpaïne 3 au sein du sarcomère. En outre d'une localisation en N2 et à la ligne M par la technique du double hybride, nous avons montré qu'au niveau moléculaire que la calpaïne 3 se fixe au niveau de du domaine I5 ce qui corrobore l'observation d'une colocalisation des deux protéases. Nous avons aussi mis en évidence la forte affinité de la calpaïne 3 pour le calcium. Nous avons déterminé une constante d'affinité de l'ordre du nanomolaire qui explique les autolyses plus ou moins rapides de la calpaïne 3 en absence de calcium (Sorimachi *et al.*, 1993 ; Ono *et al.*, 2004). Au niveau de la régulation cela implique une association forte avec la titine afin d'éviter des dommages incontrôlés. A ce jour, l'activation de la calpaïne 3 n'a pas encore été élucidée et ne semble pas due au calcium. En effet en présence de 20nM de calcium libre, la p94 demeure liée à la titine (Murphy *et al.*, 2006) alors que des concentrations basales en calcium suffisent à son autolyse (Sorimachi *et al.*, 1993). Néanmoins, la constante d'affinité déterminée et les expériences d'interaction menées en présence de calcium montrent que le cation a une place prépondérante dans la régulation. En effet la fixation *in vitro* de la p94 semble diminuer quand on augmente la concentration en calcium. *In vivo* ce phénomène pourrait se caractériser plus par une fragilisation de l'association entre la p94 et la titine. Les domaines de la calpaïne 3 qui semblent impliqués dans l'association avec la titine sont les domaines I et II impliquant par la même les séquences NS et IS1. Le domaine I semble être un stabilisateur important comme pour les calpaïnes ubiquitaires car il est impossible de produire *in vitro* le domaine II sans lui adjoindre le

domaine I (observations faites au laboratoire). En se fixant sur la p94, le calcium induit le clivage des séquences NS et IS1 pour des concentrations en calcium relativement faibles (Diaz *et al.*, 2006). La titine pourrait protéger du clivage les séquences NS et IS1 en les engageant dans l'interaction. L'activation de la calpaïne 3 est une succession de clivages des séquences NS et IS1 (Diaz *et al.*, 2006). Le second clivage conduisant à l'activation de la protéase serait d'origine intermoléculaire (Diaz *et al.*, 2006) mais nous n'avons pas d'informations réelle sur la nature de ce clivage. Il n'est pas impossible que le maintien du calcium à une concentration élevée ne soit à l'origine de l'activation de l'enzyme. Ainsi la calpaïne 3 est retrouvée active 24 heures après un exercice qui a pour conséquence de maintenir la concentration en calcium relativement élevée (100 à 250nM) pendant 24h ou plus (Murphy *et al.*, 2007). L'implication des domaines I et II montrent que la calpaïne se fixe à la titine selon 3 modes différents suggérant des fonctions physiologiques différentes selon la région concernée ou encore en fonction des stimuli.

A la lumière des résultats, on peut penser que la calpaïne 3 interviendrait dans des processus de turnover plus localisés alors que les calpaïnes classiques seraient employées dans des processus plus larges, plus génériques moins précis en amont du protéasome. La concentration du calcium intracellulaire est fondamentale car elle permet de moduler l'activité des protéases calcium dépendantes. La titine pour sa part pourrait être avant d'être une cible de choix pour ces protéases, un régulateur de leur activité dans le muscle en établissant des complexes stables avec elles.

### ***La titine serait le centre névralgique du signalosome musculaire***

Nous avons donc montré que les calpaïnes formaient un complexe stable avec la titine dans la région N1. Dans cette même région, nous avons identifié un site de forte affinité pour le calcium. Au niveau de la strie Z, outre ces cystéines protéases, on assiste à l'émergence d'un réseau de protéines dont la titine est le centre névralgique. La notion même de signalosome est introduite car ce réseau inclut des protéines impliquées dans la signalisation moléculaire du muscle (Lange *et al.*, 2006). Avec la précision moléculaire de la fixation de la p94, on peut penser que la motilité cellulaire de la protéase est nécessaire pour le bon fonctionnement du réseau myofibrillaire. Ainsi on peut envisager des échanges entre la strie Z et la ligne M (Lange *et al.*, 2006). De même dans la région N2A où la calpaïne 3 est

associée via la séquence IS2, la protéase pourrait avoir une fonction à destinée nucléaire puisqu'on se trouve dans cette séquence on retrouve un signal de localisation nucléaire. Dans ce compartiment, la protéase pourrait réguler certains facteurs de transcription.

### ***La calpaïne 3 pourrait réguler l'activité des calpaïnes classiques***

La confirmation au niveau moléculaire de la colocalisation des calpaïnes entrevue en microscopie électronique nous amène à penser que les deux protéases pourraient interagir. La calpaïne 3 est capable de cliver la calpastatine, l'inhibiteur spécifique des calpaïnes ubiquitaires. En outre, la p94 dégrade la titine entre les domaines Ig-like Z7-I1 (Taveau *et al.*, 2003) ou la filamine (Raynaud *et al.*, 2006), deux régions proches des sites de fixation de la  $\mu$ -calpaïne. Toutes ces particularités pourraient donner lieu à une implication de la p94 dans l'activation ou encore la régulation des calpaïnes ubiquitaires.

Les résultats qui découlent de cette thèse concernant la fixation des calpaïnes sur la titine et la régulation calcique associée laisse entrevoir quelques champs d'investigation intéressants.

## **Perspectives**

### ***Structuration de la titine***

La titine fixe du calcium au niveau des lignes N1, N2 mais aussi PEVK. Toutefois il semblerait que le calcium s'associerait à l'échelle du domaine Ig surtout dans la bande I afin de mieux répondre aux contraintes imposées par l'appareil contractile. Il serait intéressant de voir si cette fixation de calcium peut s'appliquer à toute la bande I reconnue pour son élasticité (Minajeva *et al.*, 2001). D'autre part nous avons testé la fixation de calcium sur des tandems Ig. Nous avons montré que le domaine I5 est incapable de fixer du calcium ce qui amène à considérer la fixation du calcium sur un tandem Ig isolé. Pour répondre à ces interrogations on peut essayer *in vitro* de visualiser par le Quin-2 la fixation du calcium sur des tandems Ig dans la région I6-I15 voire au-delà. L'alternative serait de voir par ailleurs sur un tandem d'Ig capables de fixer du calcium si un domaine Ig du tandem est à même de fixer

le cation. Autre aspect à considérer, la fixation du calcium sur la protéine entraîne une polymérisation bien définie oscillant entre le monomère et l'hexamère. Une telle structuration peut elle survenir à différentes régions de la molécule de titine ?

### ***Association de la $\mu$ -calpaïne avec la titine***

Nous avons vu que la  $\mu$ -calpaïne s'associait à la titine. Cette association s'intensifie quand la concentration calcique augmente. Si la régulation par le calcium est clairement démontrée, cela semble insuffisant pour initier l'activation des calpaïnes classiques *in vivo*. Comment la calpaïne 1 est libérée de la titine ? Outre le calcium, quels sont les activateurs *in vivo* de la calpaïne 1 ?

*In vitro*, nous disposons d'un bon modèle d'interaction avec différents fragments recombinants de titine. Dans un milieu en concentration physiologique de calcium, nous allons faire varier la concentration et la nature de différents compétiteurs en présence du complexe calpaïne 1-titine. L'activité de la  $\mu$ -calpaïne sera suivie en fluorescence en utilisant un substrat adéquat.

*In vivo*, on pourrait co-transfecter des cellules avec les deux sous-unités de la calpaïne 1 chacune portant un tag fluorescent. Sachant que l'activation de la protéase correspond à la dissociation des deux sous-unités on pourrait soumettre les cellules transfectées à différentes conditions physiologiques (action de phospholipases, augmentation du calcium intracellulaire, phosphorylation).

### ***Association de la calpaïne 3 avec la titine***

La calpaïne 3 s'associe avec la titine mais la fixation semble être altérée quand la concentration en calcium augmente. Le modèle d'activation calcium dépendant de la calpaïne 3 se constitue de deux clivages : le premier rapide est intramoléculaire et le second pourrait être intermoléculaire (Diaz *et al.*, 2006). Cependant on peut penser que le processus pourrait être intramoléculaire mais beaucoup plus progressif à l'image de l'activation de la protéase quand la concentration calcique s'est maintenue à 200nM environ pendant plus de 24 heures (Murphy *et al.*, 2007). Donc il serait intéressant de voir à partir du complexe Calpaïne 3-titine si on observe un relargage de la p94. Une expérience qui pourrait être mise en œuvre serait de

coater notre complexe sur une plaque ELISA et de lui adjoindre une concentration donnée de calcium pendant 24H voire plus. Après les différents lavages, on tenterait de détecter l'éventuelle calpaïne 3 résiduelle à l'aide d'un anticorps spécifique. Une autre alternative constituerait à passer le milieu réactionnel sur une gel filtration et vérifier si des protéines ou des fragments sont élués en addition du complexe calpaïne 3-Titine.

### ***Signalosome centré autour de la titine***

Il est clair qu'avec de nombreuses interactions établies par la titine qu'on est en présence de réseaux de protéines impliquées soit dans la structure soit dans la signalisation moléculaire.

Le principal challenge serait d'obtenir des informations de la fibre musculaire en lui appliquant des traitements mécaniques ou autres stimuli. Dans cet ordre d'idée, récemment une activation calpaïne 3 a été identifiée *in vivo* suite à un exercice où la concentration en calcium est maintenue pendant plusieurs heures à 200nM (Murphy *et al.*, 2007). Il serait intéressant à partir de ce modèle de caractériser en protéomique les différents acteurs du signalosome quand la calpaïne 3 est activée. En parallèle, une étude nucléaire serait intéressante dans le but de détecter une éventuelle activité calpaïne 3 dans le noyau.

### ***Possible régulation des calpaïnes par la calpaïne 3***

Nous avons montré que la calpaïne 3 était colocalisée avec la  $\mu$ -calpaïne. De plus la p94 est capable de cliver la calpastatine, l'inhibiteur spécifique des calpaïnes ubiquitaires, mais aussi les calpaïnes elles mêmes (Ono *et al.*, 2004). Enfin la p94 clive la titine dans la région Z7-II (Taveau *et al.*, 2003) à proximité du site de fixation de la calpaïne 1. tous ces aspects réunis soulignent une possible implication de la calpaïne 3 dans la régulation ou l'activation des calpaïnes ubiquitaires. Afin de vérifier une telle hypothèse, il faudra tester le comportement de la calpaïne 3 active vis-à-vis de nombreux complexes. En utilisant notre complexe titine-calpaïne1 en présence de la calpaïne 3 tronquée plus stable (Rey *et al.*, 2002), on peut rechercher en Western Blot les fragments autolytiques caractéristiques de la  $\mu$ -calpaïne. Cette expérience pourra être menée en parallèle avec le complexe calpastatine-calpaïne 1. Dans cette optique, en se basant sur les travaux réalisés sur les fibres isolées

(Murphy *et al.*, 2006), on pourrait travailler sur des fibres isolées de souris KO calpaine 3. L'objectif serait d'éliminer la  $\mu$ -calpaïne diffusable par lavage afin de garder uniquement la portion liée. Dans un second temps, on ferait agir la calpaïne 3 tronquée afin de voir si un relargage de la  $\mu$ -calpaïne s'opérait et qui devrait être présente dans la partie diffusable.

Nous disposons *in vitro* d'un bon modèle d'étude avec le fragment Z8-I5 supportant le site d'affinité du calcium mais aussi les sites de fixation des calpaïnes 1 et 3. La principale difficulté sera d'isoler le complexe formé entre la titine et les calpaïnes. La gel filtration semble être une bonne alternative. Enfin, dans la continuité du travail, les investigations doivent être étendues aux autres points stratégiques du sarcomère que sont la ligne N2 et la ligne M.

*Références  
bibliographiques*

# Références bibliographiques

## A

\***Adachi Y, Ishida-Takahashi A, Takahashi C, Takano E, Murachi T, Hatanaka M.** (1991). Phosphorylation and subcellular distribution of calpastatin in human hematopoietic system cells. *J Biol Chem.*, 266(6):3968-72.

\***Alarcon-Rojo AD, Dransfield E.** (1995). Alteration of post-mortem ageing in beef by the addition of enzyme inhibitors and activators. *Meat Science* 41(2), 163-178

\***Anderson LV, Davison K, Moss JA, Richard I, Fardeau M, Tome FM, Hubner C, Lasa A, Colomer J, Beckmann JS.** (1998). Characterization of monoclonal antibodies to calpain 3 and protein expression in muscle from patients with limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Am J Pathol.*, 153(4):1169-79.

\***Andresen K, Tom TD, Strand M.** (1991). Characterization of cDNA clones encoding a novel calcium-activated neutral proteinase from *Schistosoma mansoni*. *J Biol Chem.*, 266(23):15085-90.

\***Appel W.** (1986). Chymotrypsin: molecular and catalytic properties. *Clin. Biochem.*, 19: 317-322.

\***Asada K, Ishino Y, Shimada M, Shimojo T, Endo M, Kimizuka F, Kato I, Maki M, Hatanaka M, Murachi T.** (1989). cDNA cloning of human calpastatin: sequence homology among human, pig, and rabbit calpastatins. *J Enzyme Inhib.*, 3(1):49-56.

\***Asghar A, Bhatti AR.** (1987). Endogenous proteolytic enzymes in skeletal muscle: their significance in muscle physiology and during postmortem aging events in carcasses. *Adv Food Res.*, 31:343-451.

\***Astier C, Lebart MC, Labbe JP, Roustan C, Benyamin Y.** (1992). Interaction of titin fragments with  $\alpha$ -actinin. *Mol.Biol.Cell*, 3,362a.

\***Astier C, Raynaud F, Lebart MC, Roustan C, Benyamin Y.** (1998). Binding of a native titin fragment to actin is regulated by PIP2. *FEBS Lett.*, 429(1):95-8.

\***Averna M, de Tullio R, Passalacqua M, Salamino F, Pontremoli S, Melloni E.** (2001). Changes in intracellular calpastatin localization are mediated by reversible phosphorylation. *Biochem J.*, 354(Pt 1):25-30.

\***Azuma M, Shearer TR.** (1992). Involvement of calpain in diamide-induced cataract in cultured lenses. *FEBS Lett.* 307(3):313-7.

## B

\***Baghdiguan S, Martin M, Richard I, Pons F, Astier C, Bourg N, Hay RT, Chemaly R, Halaby G, Loiselet J, Anderson LV, Lopez de Munain A, Fardeau M, Mangeat P, Beckmann JS, Lefranc G.** (1999). Calpain 3 deficiency is associated with myonuclear apoptosis and profound perturbation of the IkappaB alpha/NF-kappaB pathway in limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Nat Med.*, 5(5):503-11.

\***Baier LJ, Permana PA, Yang X, Pratley RE, Hanson RL, Shen GQ, Mott D, Knowler WC, Cox NJ, Horikawa Y, Oda N, Bell GI, Bogardus C.** (2000). A calpain-10 gene polymorphism is associated with reduced muscle mRNA levels and insulin resistance. *J Clin Invest.*, 106(7):R69-73.

\***Balcerzak D, Poussard S, Brustis JJ, Elamrani N, Soriano M, Cottin P, Ducastaing A.** (1995). An antisense oligodeoxyribonucleotide to m-calpain mRNA inhibits myoblast fusion. *J Cell Sci.*, 108 ( Pt 5):2077-82.

\***Balcerzak D, Cottin P, Poussard S, Cucuron A, Brustis JJ, Ducastaing A.** (1998). Calpastatin-modulation of m-calpain activity is required for myoblast fusion. *Eur J Cell Biol.*, 75(3):247-53.

\***Balcerzak D, Querengesser L, Dixon WT, Baracos VE.** (2001). Coordinate expression of matrix-degrading proteinases and their activators and inhibitors in bovine skeletal muscle. *J Anim Sci.*, 79(1):94-107

\***Bang ML, Centner T, Fornoff F, Geach AJ, Gotthardt M, McNabb M, Witt CC, Labeit D, Gregorio CC, Granzier H, Labeit S.** (2001). 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(11):1065-72.

\***Barnoy S, Glasner T, Kosower NS.** (1996). The role of calpastatin (the specific calpain inhibitor) in myoblast differentiation and fusion. *Biochem Biophys Res Commun.*, 220(3):933-8.

\***Barnoy S, Glaser T, Kosower NS.** (1997). Calpain and calpastatin in myoblast differentiation and fusion: effects of inhibitors. *Biochim Biophys Acta.*, 1358(2):181-8.

\***Barnoy S, Glaser T, Kosower NS.** (1998). The calpain-calpastatin system and protein degradation in fusing myoblasts. *Biochim Biophys Acta.*, 1402(1):52-60.

\***Barnoy S, Zipser Y, Glaser T, Grimberg Y, Kosower NS.** (1999). Association of calpain (Ca(2+)-dependent thiol protease) with its endogenous inhibitor calpastatin in myoblasts. *J Cell Biochem.*, 74(4):522-31.

\***Barrett AJ.** (1986). The cystatins: a diverse superfamily of cysteine peptidase inhibitors. *Biomed Biochim Acta.*, 45(11-12):1363-74

\***Bartoli M, Richard I.** (2005). Calpains in muscle wasting. *Int J Biochem Cell Biol.*, 37(10):2115-33. Epub 2005 Feb 9

\***Bassaglia Y, Cebrian J, Covan S, Garcia M, Foucrier J.** (2005). Proteasomes are tightly associated to myofibrils in mature skeletal muscle. *Exp Cell Res.*, 302(2):221-32

\***Baumeister W, Dahlmann B, Hegerl R, Kopp F, Kuehn L, Pfeifer G.** (1988). Electron microscopy and image analysis of the multicatalytic proteinase. *FEBS Lett.*, 241(1-2):239-45.

\***Beckmann JS, Richard I, Broux O, Fougerousse F, Allamand V, Chiannikulchai N, Lim LE, Duclos F, Bourg N, Brenguier L, Pasturaud P, Quetier F, Roudaut C, Sunada Y, Meyer J, Dincer P, Lefranc G, Merlini L, Topaloglu H, Tome FM, Cohen D, Jackson CE, Campbell KP, Fardeau M.** (1996). Identification of muscle-specific calpain and beta-sarcoglycan genes in progressive autosomal recessive muscular dystrophies. *Neuromuscul Disord.*, 6(6):455-62.

\***Benian GM, Kiff JE, Neckelmann N, Moerman DG, Waterston RH.** (1989). Sequence of an unusually large protein implicated in regulation of myosin activity in *C. elegans*. *Nature.*, 342(6245):45-50.

\***Bird JWC, Carter J.** (1980). Proteolytic enzymes in striated and non striated muscle in degradation processes in heart and skeletal muscles. K. Wildenthal, eds. p.51

\***Birkedal-Hansen H.** (1993). Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol.*, 64(5 Suppl):474-84

\***Bishop MD, Koohmaraie M, Killefer J, Kappes S.** (1993). Rapid communication: restriction fragment length polymorphisms in the bovine calpastatin gene. *J Anim Sci.*, 71(8):2277.

\***Blanchard H, Grochulski P, Li Y, Arthur JS, Davies PL, Elce JS, Cygler M.** (1997). Structure of a calpain Ca(2+)-binding domain reveals a novel EF-hand and Ca(2+)-induced conformational changes. *Nat Struct Biol.*, 4(7):532-8.

\***Boehm ML, Kendall TL, Thompson VF, Goll DE.** (1998). Changes in the calpains and calpastatin during postmortem storage of bovine muscle. *J Anim Sci.*, 76(9):2415-34

\***Bottomley SP, Chang WS.** (1997). The effects of reactive centre loop length upon serpin polymerisation. *Biochem Biophys Res Commun.*, 241(2):264-9

\***Bourgeois L, Brillard-Bourdet M, Deperthes D, Juliano MA, Juliano L, Tremblay RR, Dube JY, Gauthier F.** (1997). Serpin-derived peptide substrates for investigating the substrate specificity of human tissue kallikreins hK1 and hK2. *J Biol Chem.*, 272(47):29590-5.

\***Bradford MM.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*, 72:248-54.

\***Branca D, Gugliucci A, Bano D, Brini M, Carafoli E.** (1999). Expression, partial purification and functional properties of the muscle-specific calpain isoform p94. *Eur J Biochem.* 1999 Oct;265(2):839-46

\***Brandenburg K, Harris F, Dennison S, Seydel U, Phoenix D.** (2002). Domain V of m-calpain shows the potential to form an oblique-orientated alpha-helix, which may modulate the enzyme's activity via interactions with anionic lipid. *Eur J Biochem.*, 269(22):5414-22.

\***Brannigan JA, Dodson G, Duggleby HJ, Moody PC, Smith JL, Tomchick DR, Murzin AG.** (1995). A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self-activation. *Nature.*, 378(6555):416-9.

\***Brocklehurst K.** (1994). A sound basis for pH-dependent kinetic studies on enzymes. *Protein Eng.*, 7(3):291-9

\***Busch WA, Stromer MH, Goll DE, Suzuki A.** (1972). Ca<sup>2+</sup>-specific removal of Z lines from rabbit skeletal muscle. *J Cell Biol.*, 52(2):367-81.

## C

\***Carillo S, Pariat M, Steff A, Jariel-Encontre I, Poulat F, Berta P, Piechaczyk M.** (1996). PEST motifs are not required for rapid calpain-mediated proteolysis of c-fos protein. *Biochem J.*, 313 ( Pt 1):245-51.

\***Chapman HA, Riese RJ, Shi GP.** (1997). Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu Rev Physiol.*, 59:63-88.

\***Chowdary DR, Dermody JJ, Jha KK, Ozer HL.** (1994). Accumulation of p53 in a mutant cell line defective in the ubiquitin pathway. *Mol Cell Biol.*, 14(3):1997-2003.

\***Chua BT, Guo K, Li P.** (2000). Direct cleavage by the calcium-activated protease calpain can lead to inactivation of caspases. *J Biol Chem.*, 275(7):5131-5

\***Citron BA, Smirnova IV, Zoubine MN, Festoff BW.** (1997). Quantitative PCR analysis reveals novel expression of prothrombin mRNA and regulation of its levels in developing mouse muscle. *Thromb Res.*, 87(3):303-13.

\***Cohen N, Kudryashova E, Kramerova I, Anderson LV, Beckmann JS, Bushby K, Spencer MJ.** (2006). Identification of putative in vivo substrates of calpain 3 by comparative proteomics of overexpressing transgenic and nontransgenic mice. *Proteomics.*, 6(22):6075-84

\***Colley NJ, Tokuyasu KT, Singer SJ.** (1990). The early expression of myofibrillar proteins in round postmitotic myoblasts of embryonic skeletal muscle. *J Cell Sci.*, 95 ( Pt 1):11-22.

\***Cong J, Goll DE, Peterson AM, Kapprell HP.** (1989). The role of autolysis in activity of the Ca<sup>2+</sup>-dependent proteinases (mu-calpain and m-calpain). *J Biol Chem.* 264(17):10096-103.

\***Cong M, Thompson VF, Goll DE, Antin PB.** (1998). The bovine calpastatin gene promoter and a new N-terminal region of the protein are targets for cAMP-dependent protein kinase activity. *J Biol Chem.*, 273(1):660-6.

\***Coolican SA, Haiech J, Hathaway DR.** (1986). The role of subunit autolysis in activation of smooth muscle Ca<sup>2+</sup>-dependent proteases. *J Biol Chem.*, 261(9):4170-6.

\***Cottin P, Vidalenc PL, Ducastaing A.** (1981). Ca<sup>2+</sup>-dependent association between a Ca<sup>2+</sup>-activated neutral proteinase (CaANP) and its specific inhibitor. *FEBS Lett.*, 136(2):221-4.

\***Cottin P, Thompson VF, Sathe SK, Szpacenko A, Goll DE.** (2001). Autolysis of mu- and m-calpain from bovine skeletal muscle. *Biol Chem.*, 382(5):767-76.

\***Coulis G, Sentandreu MA, Bleimling N, Gautel M, Benyamin Y, Ouali A.** (2004). Myofibrillar tightly bound calcium in skeletal muscle fibers: a possible role of this cation in titin strands aggregation. *FEBS Lett.*, 556(1-3):271-5

\***Crawford C, Brown NR, Willis AC.** (1990). Investigation of the structural basis of the interaction of calpain II with phospholipid and with carbohydrate. *Biochem J.*, 265(2):575-9.

\***Croall DE, Morrow JS, DeMartino GN.** (1986). Limited proteolysis of the erythrocyte membrane skeleton by calcium-dependent proteinases. *Biochim Biophys Acta.*, 882(3):287-96.

## D

\***Dahlmann B, Kopp F, Kuehn L, Hegerl R, Pfeifer G, Baumeister W.** (1991). The multicatalytic proteinase (prosome, proteasome): comparison of the eukaryotic and archaeobacterial enzyme. *Biomed Biochim Acta.*, 50(4-6):465-9.

\***David LL, Shearer TR.** (1989). Role of proteolysis in lenses: a review. *Lens Eye Toxic Res.*, 6(4):725-47.

\***David LL, Shearer TR, Shih M.** (1993). Sequence analysis of lens beta-crystallins suggests involvement of calpain in cataract formation. *J Biol Chem.*, 268(3):1937-40.

\***Dayton WR, Schollmeyer JV.** (1981). Immunocytochemical localization of a calcium-activated protease in skeletal muscle cells. *Exp Cell Res.*, 136(2):423-33.

\***Dear N, Matena K, Vingron M, Boehm T.** (1997). A new subfamily of vertebrate calpains lacking a calmodulin-like domain: implications for calpain regulation and evolution. *Genomics.*, 45(1):175-84.

\***Delaney SJ, Hayward DC, Barleben F, Fischbach KF, Miklos GL.** (1991). Molecular cloning and analysis of small optic lobes, a structural brain gene of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 88(16):7214-8

\***Delgado EF, Geesink GH, Marchello JA, Goll DE, Koohmaraie M.** (2001). The calpain system in three muscles of normal and callipyge sheep. *J Anim Sci.*, 79(2):398-412.

\***Delgado EF, Geesink GH, Marchello JA, Goll DE, Koohmaraie M.** (2001). Properties of myofibril-bound calpain activity in longissimus muscle of callipyge and normal sheep. *J Anim Sci.*, 79(8):2097-107.

\***De Tullio R, Sparatore B, Salamino F, Melloni E, Pontremoli S.** (1998). Rat brain contains multiple mRNAs for calpastatin. *FEBS Lett.*, 422(1):113-7.

\***De Tullio R, Stifanese R, Salamino F, Pontremoli S, Melloni E.** (2003). Characterization of a new p94-like calpain form in human lymphocytes. *Biochem J.*, 375(Pt 3):689-96

**\*Diaz BG, Moldoveanu T, Kuiper MJ, Campbell RL, Davies PL.** (2004). Insertion sequence 1 of muscle-specific calpain, p94, acts as an internal propeptide. *J Biol Chem.*, 279(26):27656-66. Epub 2004 Apr 8

**\*Doyle MF, Haley PE.** (1993). Meizothrombin: active intermediate formed during prothrombinase-catalyzed activation of prothrombin. *Methods Enzymol.*, 222:299-312

**\*Drummond GI, Duncan L.** (1966). Activation of cardiac phosphorylase b kinase. *J Biol Chem.*, 241(24):5893-8.

**\*Du X, Saido TC, Tsubuki S, Indig FE, Williams MJ, Ginsberg MH.** (1995). Calpain cleavage of the cytoplasmic domain of the integrin beta 3 subunit. *J Biol Chem.*, 270(44):26146-51.

**\*Dubiel W, Ferrell K, Rechsteiner M.** (1995). Subunits of the regulatory complex of the 26S protease. *Mol Biol Rep.*, 21(1):27-34

**\*Duguez S, Bartoli M, Richard I.** (2006). Calpain 3: a key regulator of the sarcomere? *FEBS J.*, 273(15):3427-36

**\*Dutaud D.** (1998). Quantification et caractérisation du protéasome 20S de muscle de bovin en relation avec l'attendrissage de la viande bovine. Thèse science des aliments. Université Blaise Pascal. Clermont-Ferrand.

## E

**\*Edmunds T, Nagainis PA, Sathe SK, Thompson VF, Goll DE.** (1991). Comparison of the autolyzed and unautolyzed forms of mu- and m-calpain from bovine skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta.*, 1077(2):197-208.

**\*Ehler E, Rothen BM, Hammerle SP, Komiyama M, Perriard JC.** (1999). Myofibrillogenesis in the developing chicken heart: assembly of Z-disk, M-line and the thick filaments. *J Cell Sci.*, 112 ( Pt 10):1529-39.

**\*Elamrani N, Brustis JJ, Dourdin N, Balcerzak D, Poussard S, Cottin P, Ducastaing A.** (1995). Desmin degradation and Ca(2+)-dependent proteolysis during myoblast fusion. *Biol Cell.*, 85(2-3):177-83.

**\*Elce JS, Davies PL, Hegadorn C, Maurice DH, Arthur JS.** (1997). The effects of truncations of the small subunit on m-calpain activity and heterodimer formation. *Biochem J.*

**\*Elvira M, Diez JA, Wang KK, Villalobo A.** (1993). Phosphorylation of connexin-32 by protein kinase C prevents its proteolysis by mu-calpain and m-calpain. *J Biol Chem.*, 268(19):14294-300.

**\*Emori Y, Kawasaki H, Sugihara H, Imajoh S, Kawashima S, Suzuki K.** (1986a). Isolation and sequence analyses of cDNA clones for the large subunits of two isozymes of rabbit calcium-dependent protease. *J Biol Chem.*, 261(20):9465-71.

**\*Emori Y, Kawasaki H, Imajoh S, Kawashima S, Suzuki K.** (1986b). Isolation and sequence analysis of cDNA clones for the small subunit of rabbit calcium-dependent protease. *J Biol Chem.*, 261(20):9472-6.

**\*Emori Y, Kawasaki H, Imajoh S, Imahori K, Suzuki K.** (1987). Endogenous inhibitor for calcium-dependent cysteine protease contains four internal repeats that could be responsible for its multiple reactive sites. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 84(11):3590-4.

**\*Emori Y, Kawasaki H, Imajoh S, Minami Y, Suzuki K.** (1988). All four repeating domains of the endogenous inhibitor for calcium-dependent protease independently retain inhibitory activity. Expression of the cDNA fragments in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.*, 263(5):2364-70.

**\*Emori Y, Saigo K.** (1994). Calpain localization changes in coordination with actin-related cytoskeletal changes during early embryonic development of *Drosophila*. *J Biol Chem.*, 269(40):25137-42.

**\*Etherington DJ, Taylor MAJ, Dransfield E.** (1987). Conditioning of meat from different species, relationship between tenderising and the levels of cathepsin B, cathepsin L, calpain I, Calpain II and  $\beta$ -glucuronidase. *Meat Sci.* 20, 1-18.

## F

**\*Fanin M, Nascimbeni AC, Fulizio L, Trevisan CP, Meznaric-Petrusa M, Angelini C.** (2003). Loss of calpain-3 autocatalytic activity in LGMD2A patients with normal protein expression. *Am J Pathol.*, 163(5):1929-36

**\*Fardeau M, Eymard B, Mignard C, Tome FM, Richard I, Beckmann JS.** (1996). Chromosome 15-linked limb-girdle muscular dystrophy: clinical phenotypes in Reunion Island and French metropolitan communities. *Neuromuscul Disord.*, 6(6):447-53.

\***Fernandez E.** (2000). Les calpaines musculaires : localisation cellulaire et interactions avec les protéines contractiles. Diplôme EPHE. EPHE la Sorbonne Paris.

\***Festoff BW, Patterson MR, Romstedt K.** (1982). Plasminogen activator: the major secreted neutral protease of cultured skeletal muscle cells. *J Cell Physiol.*, 110(2):190-5.

\***Fitton HL, Pike RN, Carrell RW, Chang WS.** (1997). Mechanisms of antithrombin polymerisation and heparin activation probed by the insertion of synthetic reactive loop peptides. *Biol Chem.*, 378(9):1059-63

\***Forsberg NE, Ilian MA, Ali-Bar A, Cheeke PR, Wehr NB.** (1989). Effects of cimaterol on rabbit growth and myofibrillar protein degradation and on calcium-dependent proteinase and calpastatin activities in skeletal muscle. *J Anim Sci.*, 67(12):3313-21.

\***Fougerousse F, Durand M, Suel L, Pourquie O, Delezoide AL, Romero NB, Abitbol M, Beckmann JS.** (1998). Expression of genes (CAPN3, SGCA, SGCB, and TTN) involved in progressive muscular dystrophies during early human development. *Genomics.*, 48(2):145-56.

\***Fraser A, Evan G.** (1996). A license to kill. *Cell.*, 14;85(6):781-4

\***Freiburg A, Gautel M.** (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(1-2):317-23.

\***Fulton AB, Alftine C.** (1997). Organization of protein and mRNA for titin and other myofibril components during myofibrillogenesis in cultured chicken skeletal muscle. *Cell Struct Funct.*, 22(1):51-8.

\***Funatsu T, Kono E, Higuchi H, Kimura S, Ishiwata S, Yoshioka T, Maruyama K, Tsukita S.** (1993). Elastic filaments in situ in cardiac muscle: deep-etch replica analysis in combination with selective removal of actin and myosin filaments. *J Cell Biol.*, 120(3):711-24.

\***Fürst, D. O., Osborn, M., Nave, R. and Weber, K.** (1988). The organization of titin filaments in the half-sarcomere revealed by monoclonal antibodies in immunoelectron microscopy: a map of ten non repetitive epitopes starting at Z line extends close to the M line. *J. Cell Biol.* 106, 1563-1572.

\***Furst DO, Gautel M.** (1995). The anatomy of a molecular giant: how the sarcomere cytoskeleton is assembled from immunoglobulin superfamily molecules. *J Mol Cell Cardiol.*, 27(4):951-9.

## G

\***García Díaz BE, Gauthier S, Davies PL.** (2006). Ca<sup>2+</sup> dependency of calpain 3 (p94) activation. *Biochemistry.*, 45(11):3714-22

\***Garvey SM, Rajan C, Lerner AP, Frankel WN, Cox GA.** (2002). The muscular dystrophy with myositis (mdm) mouse mutation disrupts a skeletal muscle-specific domain of titin. *Genomics.*, 79(2):146-9.

\***Gautel M, Goulding D, Bullard B, Weber K, Furst DO.** (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.

\***Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA.** (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol.*, 119(3):493-501

\***Geesink GH, Nonneman D, Koohmaraie M.** (1998). An improved purification protocol for heart and skeletal muscle calpastatin reveals two isoforms resulting from alternative splicing. *Arch Biochem Biophys.*, 356(1):19-24.

\***Geesink GH, Taylor RG, Koohmaraie M.** (2005). Calpain 3/p94 is not involved in postmortem proteolysis. *J Anim Sci.*, 83(7):1646-52

\***Giulivi C, Pacifici RE, Davies KJ.** (1994). Exposure of hydrophobic moieties promotes the selective degradation of hydrogen peroxide-modified hemoglobin by the multicatalytic proteinase complex, proteasome. *Arch Biochem Biophys.*, 311(2):329-41.

\***Goldberg AL, Akopian TN, Kisselev AF, Lee DH.** (1997a). Protein degradation by the proteasome and dissection of its in vivo importance with synthetic inhibitors. *Mol Biol Rep.*, 24(1-2):69-75.

\***Goldberg AL, Akopian TN, Kisselev AF, Lee DH, Rohrwild M.** (1997b). New insights into the mechanisms and importance of the proteasome in intracellular protein degradation. *Biol Chem.*, 378(3-4):131-40.

\***Goll DE, Kleese WC, Szpacenko A.** (1989). Skeletal muscle proteases and protein turn over. *Animal growth regulation.* Campion Dr, Hausman GR, Martin RJ(eds), Plenum publishing, New York, USA,141-181

\***Goll DE, Kleese WC, Okitani A, Kumamoto T, Cong J, Kapprell HP.** (1990). Structural and regulatory properties of the calpains and calpastatins. In :Mellgren RL and Murachi T.(eds), *Intracellular calcium-dependent proteolysis.* Boca Raton, FL : CRC press p 3-24

**\*Goll DE, Thompson VF, Taylor RG, Zalewska T.** (1992). Is calpain activity regulated by membranes and autolysis or by calcium and calpastatin? *Bioessays.*, 14(8):549-56.

**\*Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J.** (2003). The calpain system. *Physiol Rev.*, 83(3):731-801.

**\*Goltsev YV, Kovalenko AV, Arnold E, Varfolomeev EE, Brodianskii VM, Wallach D.** (1997). CASH, a novel caspase homologue with death effector domains. *J Biol Chem.*, 272(32):19641-4

**\*Gonen H, Shkedy D, Barnoy S, Kosower NS, Ciechanover A.** (1997). On the involvement of calpains in the degradation of the tumor suppressor protein p53. *FEBS Lett.*, 406(1-2):17-22.

**\*Got F.** (1997). Accélération de la maturation de la viande bovine par traitements technologiques: injections de calcium, applications d'ultrasons de puissance. Thèse . Université Blaise Pascal. Clermont ferrand, France.

**\*Granzier HL, Irving TC.** (1995). Passive tension in cardiac muscle: contribution of collagen, titin, microtubules, and intermediate filaments. *Biophys J.*, 68(3):1027-44.

**\*Gregorio CC, Trombitas K, Centner T, Kolmerer B, Stier G, Kunke K, Suzuki K, Obermayr F, Herrmann B, Granzier H, Sorimachi H, Labeit S.** (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(4):1013-27.

**\*Grziwa A, Baumeister W, Dahlmann B, Kopp F.** (1991). Localization of subunits in proteasomes from *Thermoplasma acidophilum* by immunoelectron microscopy. *FEBS Lett.* 290(1-2):186-90.

**\*Guignot F.** (1992). Acidification dans le muscle de veau. Conséquences sur la structure et les qualités organoleptiques de la viande. Thèse université Blaise Pascal, Clermont Ferrand, France.

## H

**\*Hackman P, Vihola A, Haravuori H, Marchand S, Sarparanta J, De Seze J, Labeit S, Witt C, Peltonen L, Richard I, Udd B.** (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(3):492-500. Epub 2002 Jul 26

**\*Haravuori H, Vihola A, Straub V, Auranen M, Richard I, Marchand S, Voit T, Labeit S, Somer H, Peltonen L, Beckmann JS, Udd B.** (2001). Secondary calpain3 deficiency in 2q-linked muscular dystrophy: titin is the candidate gene. *Neurology.*, 56(7):869-77.

**\*Harkins AB, Kurebayashi N, Baylor SM.** (1993). Resting myoplasmic free calcium in frog skeletal muscle fibers estimated with fluo-3. *Biophys J.*, 65(2):865-81

**\*Harris JB, Vater R, Wilson M, Cullen MJ.** (2003). Muscle fibre breakdown in venom-induced muscle degeneration. *J Anat.*, 202(4):363-72.

**\*Hathaway DR, Werth DK, Haerberle JR.** (1982). Limited autolysis reduces the Ca<sup>2+</sup> requirement of a smooth muscle Ca<sup>2+</sup>-activated protease. *J Biol Chem.*, 257(15):9072-7.

**\*Hayashi M, Inomata M, Kawashima S.** (1996). Function of calpains: possible involvement in myoblast fusion. *Adv Exp Med Biol.*, 389:149-54.

**\*Herrera Mendez C.** (2006). Marqueurs biologiques de la qualité de la viande bovine: purification, caractérisation et quantification de trois serpinines musculaires. Thèse d'état.

**\*Higgins JA, Lasslett YV, Bardsley RG, Buttery PJ.** (1988). The relation between dietary restriction or clenbuterol (a selective beta 2 agonist) treatment on muscle growth and calpain proteinase (EC 3.4.22.17) and calpastatin activities in lambs. *Br J Nutr.*, 60(3):645-52.

**\*Hirai S, Kawasaki H, Yaniv M, Suzuki K.** (1991). Degradation of transcription factors, c-Jun and c-Fos, by calpain. *FEBS Lett.*, 287(1-2):57-61.

**\*Hofmann K, Bucher P, Tschopp J.** (1997). The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. *Trends Biochem Sci.*, 22(5):155-6.

**\*Hopkins DL.** (2000). The relationship between actomyosin, proteolysis and tenderisation examined using protease inhibitors. PhD thesis, University of New England, Australia.

**\*Horikawa Y, Oda N, Cox NJ, Li X, Orho-Melander M, Hara M, Hinokio Y, Lindner TH, Mashima H, Schwarz PE, del Bosque-Plata L, Horikawa Y, Oda Y, Yoshiuchi I, Colilla S, Polonsky KS, Wei S, Concannon P, Iwasaki N, Schulze J, Baier LJ, Bogardus C, Groop L, Boerwinkle E, Hanis CL, Bell GI.** (2000). Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet.*, 26(2):163-75.

\***Horvitz HR.** (1999). Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res.* 1999 Apr 1;59(7 Suppl):1701s-1706s

\***Houchmandzadeh B, Dimitrov S.** (1999). Elasticity measurements show the existence of thin rigid cores inside mitotic chromosomes. *J Cell Biol.*, 145(2):215-23.

\***Huang J, Forsberg NE.** (1998). Role of calpain in skeletal-muscle protein degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 95(21):12100-5.

\***Huebsch KA, Kudryashova E, Wooley CM, Sher RB, Seburn KL, Spencer MJ, Cox GA.** (2005). Mdm muscular dystrophy: interactions with calpain 3 and a novel functional role for titin's N2A domain. *Hum Mol Genet.*, 14(19):2801-11. Epub 2005 Aug 22

## I

\***Ilian MA, Morton JD, Kent MP, Le Couteur CE, Hickford J, Cowley R, Bickerstaffe R.** (2001). Intermuscular variation in tenderness: association with the ubiquitous and muscle-specific calpains. *J Anim Sci.*, 79(1):122-32

\***Ilian MA, Morton JD, Bekhit AE, Roberts N, Palmer B, Sorimachi H, Bickerstaffe R.** (2001). Effect of preslaughter feed withdrawal period on longissimus tenderness and the expression of calpains in the ovine. *J Agric Food Chem.*, 49(4):1990-8

\* **Ilian M A., Bickerstaffe R, Greaser M L.** (2004). Postmortem changes in myofibrillar-bound calpain 3 revealed by immunofluorescence microscopy. *Meat Science*, 66(1) :231-240

\* **Ilian M A., Bekhit A. and Bickerstaffe R.** (2004). The relationship between meat tenderization, myofibril fragmentation and autolysis of calpain 3 during post-mortem aging. *Meat Science*, 66(2) :387-397

\***Imajoh S, Suzuki K.** (1985). Reversible interaction between Ca<sup>2+</sup>-activated neutral protease (CANP) and its endogenous inhibitor. *FEBS Lett.*, 187(1):47-50.

\***Imajoh S, Kawasaki H, Suzuki K.** (1986). The amino-terminal hydrophobic region of the small subunit of calcium-activated neutral protease (CANP) is essential for its activation by phosphatidylinositol. *J Biochem (Tokyo).*, 99(4):1281-4.

\***Imajoh S, Kawasaki H, Emori Y, Suzuki K.** (1987). Calcium-activated neutral protease inhibitor from rabbit erythrocytes lacks the N-terminal region of the liver inhibitor but retains three inhibitory units. *Biochem Biophys Res Commun.*, 146(2):630-7.

**\*Inomata M, Hayashi M, Nakamura M, Imahori K, Kawashima S.** (1985). Hydrolytic and autolytic behavior of two forms of calcium-activated neutral protease (CANP). *J Biochem (Tokyo)*, 98(2):407-16.

**\*Inomata M, Hayashi M, Nakamura M, Saito Y, Kawashima S.** (1989). Properties of erythrocyte membrane binding and autolytic activation of calcium-activated neutral protease. *J Biol Chem.*, 264(31):18838-43.

**\*Inomata M, Hayashi M, Ohno-Iwashita Y, Tsubuki S, Saido TC, Kawashima S.** (1996). Involvement of calpain in integrin-mediated signal transduction. *Arch Biochem Biophys.*, 328(1):129-34.

**\*Ishiguro H, Higashiyama S, Namikawa C, Kunimatsu M, Takano E, Tanaka K, Ohkubo I, Murachi T, Sasaki M.** (1987). Interaction of human calpains I and II with high molecular weight and low molecular weight kininogens and their heavy chain: mechanism of interaction and the role of divalent cations. *Biochemistry.*, 26(10):2863-70

**\*Ishisaka R, Utsumi T, Yabuki M, Kanno T, Furuno T, Inoue M, Utsumi K.** (1998). Activation of caspase-3-like protease by digitonin-treated lysosomes. *FEBS Lett.*, 435(2-3):233-6.

**\*Ishiura S, Sugita H, Nonaka I, Imahori K.** (1980). Calcium-activated neutral protease. Its localization in the myofibril, especially at the Z-band. *J Biochem (Tokyo)*, 87(1):343-6.

## J

**\*Jékely G, Friedrich P.** (1999). Characterization of two recombinant *Drosophila* calpains. CALPA and a novel homolog, CALPB. *J Biol Chem.*, 274(34):23893-900

**\*Jia Z, Petrounevitch V, Wong A, Moldoveanu T, Davies PL, Elce JS, Beckmann JS.** (2001). Mutations in calpain 3 associated with limb girdle muscular dystrophy: analysis by molecular modeling and by mutation in m-calpain. *Biophys J.*, 80(6):2590-6

**\*Johnson JD, Tikunova SB.** (2002). Fluorescence methods for measuring calcium affinity and calcium exchange with proteins. *Methods Mol Biol.*, 173:89-102.

## K

**\*Kapprell HP, Goll DE.** (1989). Effect of Ca<sup>2+</sup> on binding of the calpains to calpastatin. *J Biol Chem.*, 264(30):17888-96.

**\*Kawasaki H, Imajoh S, Kawashima S, Hayashi H, Suzuki K.** (1986). The small subunits of calcium dependent proteases with different calcium sensitivities are identical. *J Biochem (Tokyo)*, 99(5):1525-32.

**\*Kawasaki H, Emori Y, Imajoh-Ohmi S, Minami Y, Suzuki K.** (1989). Identification and characterization of inhibitory sequences in four repeating domains of the endogenous inhibitor for calcium-dependent protease. *J Biochem (Tokyo)*, 106(2):274-81.

**\*Kawasaki H, Kawashima S.** (1996). Regulation of the calpain-calpastatin system by membranes (review). *Mol Membr Biol.*, 13(4):217-24.

**\*Kay J, Jupp RA, Norey CG, Richards AD, Reid WA, Taggart RT, Samloff IM, Dunn BM.** (1988). Aspartic proteinases and inhibitors for their control in health and disease. *Adv Exp Med Biol.*, 240:1-11.

**\*Keira Y, Noguchi S, Minami N, Hayashi YK, Nishino I.** (2003). Localization of calpain 3 in human skeletal muscle and its alteration in limb-girdle muscular dystrophy 2A muscle. *J Biochem (Tokyo)*, 133(5):659-64

**\*Kenny PA, Liston EM, Higgins DG.** (1999). Molecular evolution of immunoglobulin and fibronectin domains in titin and related muscle proteins. *Gene.* 232(1):11-23.

**\*Kimura S, Maruyama K.** (1983). Preparation of native connectin from chicken breast muscle. *J Biochem (Tokyo)*, 94(6):2083-5.

**\*Kinbara K, Sorimachi H, Ishiura S, Suzuki K.** (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(1):99-107.

**\*Knupp C, Luther PK, Squire JM.** (2002). Titin organisation and the 3D architecture of the vertebrate-striated muscle I-band. *J Mol Biol.*, 322(4):731-9.

**\*Kobayashi Y, Yamamoto K, Saido T, Kawasaki H, Oppenheim JJ, Matsushima K.** (1990). Identification of calcium-activated neutral protease as a processing enzyme of human interleukin 1 alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 87(14):5548-52

**\*Koochmaraie M, Seideman SC, Schollmeyer JE, Dutson TR, Crouse JD.** (1987). Effect of postmortem storage on calcium dependant proteases, their inhibitor and myofibril fragmentation. *Meat. Sci.*, 19,187-196.

**\*Koochmaraie M, Babiker AS, Merkel RA, Dutson TR.** (1988). Role of Ca<sup>2+</sup> dependent proteases and lysosomal enzymes in post mortem changes in bovine skeletal muscle. *J. Food Sci.*, 53,1253.

**\*Koochmaraie M, Whipple G, Kretchmar DH, Crouse JD, Mersmann HJ.** (1991). Postmortem proteolysis in longissimus muscle from beef, lamb and pork carcasses. *J Anim Sci.*, 69(2):617-24

**\*Koochmaraie M.** (1996). Biochemical factors regulating the toughening and tenderisation process of meat. *Meat. Sci.*, 43S, S193-S201.

**\*Konig N, Raynaud F, Feane H, Durand M, Mestre-Frances N, Rossel M, Ouali A, Benjamin Y.** (2003). Calpain 3 is expressed in astrocytes of rat and *Microcebus* brain. *J Chem Neuroanat.* Feb;25(2):129-36.

**\*Korpula-Mastalerz R, Dubin A.** (1996). The intracellular serpin family. *Acta Biochim Pol.*, 43(3):419-29

**\*Kos J, Lah TT.** (1998). Cysteine proteinases and their endogenous inhibitors: target proteins for prognosis, diagnosis and therapy in cancer (review). *Oncol Rep.*, 5(6):1349-61.

**\*Kosower NS, Glaser T, Kosower EM.** (1983). Membrane-mobility agent-promoted fusion of erythrocytes: fusibility is correlated with attack by calcium-activated cytoplasmic proteases on membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 80(24):7542-6.

**\*Kramerova I, Kudryashova E, Tidball JG, Spencer MJ.** (2004). Null mutation of calpain 3 (p94) in mice causes abnormal sarcomere formation in vivo and in vitro. *Hum Mol Genet.*, 13(13):1373-88. Epub 2004 May 11

**\*Kretchmar DH, Hathaway MR, Epley RJ, Dayton WR.** (1990). Alterations in postmortem degradation of myofibrillar proteins in muscle of lambs fed a beta-adrenergic agonist. *J Anim Sci.*, 68(6):1760-72.

**\*Kretsinger RH.** (1997). EF-hands embrace. *Nat Struct Biol.*, 4(7):514-6.

**\*Kubbutat MH, Vousden KH.** (1997). Proteolytic cleavage of human p53 by calpain: a potential regulator of protein stability. *Mol Cell Biol.* 17(1):460-8.

**\*Kuboki M, Ishii H, Kazama M.** (1990). Characterization of calpain I-binding proteins in human erythrocyte plasma membrane. *J Biochem (Tokyo).*, 107(5):776-80.

**\*Kudryashov LS, Gorakhova LV, Potipayeva NN.** (1988). Changes in pork muscles under electrical and mechanical effects. *Proc. 34<sup>th</sup> ICoMST, Brisbane, Australia,* p 282-283

**\*Kumamoto T, Kleese WC, Cong JY, Goll DE, Pierce PR, Allen RE.** (1992). Localization of the Ca(2+)-dependent proteinases and their inhibitor in normal, fasted, and denervated rat skeletal muscle. *Anat Rec.*, 232(1):60-77.

**\*Kumamoto T, Ueyama H, Watanabe S, Yoshioka K, Miike T, Goll DE, Ando M, Tsuda T.** (1995). Immunohistochemical study of calpain and its endogenous inhibitor in the skeletal muscle of muscular dystrophy. *Acta Neuropathol (Berl.)*, 89(5):399-403.

**\*Kumamoto T, Ueyama H, Sugihara R, Kominami E, Goll DE, Tsuda T.** (1997). Calpain and cathepsins in the skeletal muscle of inflammatory myopathies. *Eur Neurol.*, 37(3):176-81.

**\*Kumar A, Shafiq S, Wadgaonkar R, Stracher A.** (1992). The effect of protease inhibitors, leupeptin and E64d, on differentiation of C2C12 myoblasts in tissue culture. *Cell Mol Biol.*, 38(5):477-83.

**\*Kwak KB, Kambayashi J, Kang MS, Ha DB, Chung CH.** (1993). Cell-penetrating inhibitors of calpain block both membrane fusion and filamin cleavage in chick embryonic myoblasts. *FEBS Lett.*, 323(1-2):151-4.

## L

**\*Labeit D, Watanabe K, Witt C, Fujita H, Wu Y, Lahmers S, Funck T, Labeit S, Granzier H.** (2003). Calcium-dependent molecular spring elements in the giant protein titin. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 100(23):13716-21. Epub 2003 Oct 30.

**\*Labeit S, Gautel M, Lakey A, Trinick J.** (1992). Towards a molecular understanding of titin. *EMBO J.*, 11(5):1711-6.

**\*Labeit S, Kolmerer B.** (1995). Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science.*, 270(5234):293-6.

**\*Labouesse MC.** (1994). *C. Elegans*, les promesses d'un petit animal intelligent: "small is beautiful". *Med. Sci.*, 10, 337-341

**\*Lange S, Agarkova I, Perriard JC, Ehler E.** (2005). The sarcomeric M-band during development and in disease. *J Muscle Res Cell Motil.*, 26(6-8):375-9

**\*Lange S, Ehler E, Gautel M.** (2006). From A to Z and back? Multicompartment proteins in the sarcomere. *Trends Cell Biol.*, 16(1):11-8. Epub 2005 Dec 6

\***Lee HJ, Sorimachi H, Jeong SY, Ishiura S, Suzuki K.** (1998). Molecular cloning and characterization of a novel tissue-specific calpain predominantly expressed in the digestive tract. *Biol Chem.*, 379(2):175-83.

\***Lin GD, Chattopadhyay D, Maki M, Wang KK, Carson M, Jin L, Yuen PW, Takano E, Hatanaka M, DeLucas LJ, Narayana SV.** (1997). Crystal structure of calcium bound domain VI of calpain at 1.9 Å resolution and its role in enzyme assembly, regulation, and inhibitor binding. *Nat Struct Biol.*, 4(7):539-47.

\***Linke WA, Rudy DE, Centner T, Gautel M, Witt C, Labeit S, Gregorio CC.** (1999). I-band titin in cardiac muscle is a three-element molecular spring and is critical for maintaining thin filament structure. *J Cell Biol.*, 146(3):631-44.

\***Litersky JM, Johnson GV.** (1992). Phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase inhibits the degradation of tau by calpain. *J Biol Chem.*, 267(3):1563-8.

\***Liversage AD, Holmes D, Knight PJ, Tskhovrebova L, Trinick J.** (2001). Titin and the sarcomere symmetry paradox. *J Mol Biol.*, 305(3):401-9.

\***Lomas DA, Finch JT, Seyama K, Nukiwa T, Carrell RW.** (1993). Alpha 1-antitrypsin Siiyama (Ser53-->Phe). Further evidence for intracellular loop-sheet polymerization. *J Biol Chem.*, 268(21):15333-5

\***Lomas DA, Elliott PR, Sidhar SK, Foreman RC, Finch JT, Cox DW, Whisstock JC, Carrell RW.** (1995). alpha 1-Antitrypsin Mmalton (Phe52-deleted) forms loop-sheet polymers in vivo. Evidence for the C sheet mechanism of polymerization. *J Biol Chem.*, 270(28):16864-70

\***Lowe J, Stock D, Jap B, Zwickl P, Baumeister W, Huber R.** (1995). Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science.*, 268(5210):533-9.

\***Lupas A, Koster AJ, Baumeister W.** (1993). Structural features of 26S and 20S proteasomes. *Enzyme Protein.*, 47(4-6):252-73.

## M

\***Ma H, Yang HQ, Takano E, Lee WJ, Hatanaka M, Maki M.** (1993). Requirement of different subdomains of calpastatin for calpain inhibition and for binding to calmodulin-like domains. *J Biochem (Tokyo).*, 113(5):591-9.

**\*Ma H, Yang HQ, Takano E, Hatanaka M, Maki M.** (1994). Amino-terminal conserved region in proteinase inhibitor domain of calpastatin potentiates its calpain inhibitory activity by interacting with calmodulin-like domain of the proteinase. *J Biol Chem.*, 269(39):24430-6.

**\*Ma H, Fukiage C, Azuma M, Shearer TR.** (1998). Cloning and expression of mRNA for calpain Lp82 from rat lens: splice variant of p94. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 39(2):454-61.

**\*Ma H, Fukiage C, Kim YH, Duncan MK, Reed NA, Shih M, Azuma M, Shearer TR.** (2001). Characterization and expression of calpain 10. A novel ubiquitous calpain with nuclear localization. *J Biol Chem.*, 276(30):28525-31.

**\*Machado C, Sunkel CE, Andrew DJ.** (1998). Human autoantibodies reveal titin as a chromosomal protein. *J Cell Biol.*, 141(2):321-33.

**\*Maki M, Takano E, Mori H, Sato A, Murachi T, Hatanaka M.** (1987). All four internally repetitive domains of pig calpastatin possess inhibitory activities against calpains I and II. *FEBS Lett.*, 223(1):174-80.

**\*Maki M, Takano E, Osawa T, Ooi T, Murachi T, Hatanaka M.** (1988). Analysis of structure-function relationship of pig calpastatin by expression of mutated cDNAs in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.*, 263(21):10254-61.

**\*Maki M, Bagci H, Hamaguchi K, Ueda M, Murachi T, Hatanaka M.** (1989). Inhibition of calpain by a synthetic oligopeptide corresponding to an exon of the human calpastatin gene. *J Biol Chem.*, 264(32):18866-9.

**\*Maki CG, Huibregtse JM, Howley PM.** (1996). In vivo ubiquitination and proteasome-mediated degradation of p53(1). *Cancer Res.*, 56(11):2649-54.

**\*Mansfield JM. and Olivier M.** (2002) Immune Evasion by Parasites. In Kaufmann, S.H.E., Sher, A. and Ahmed, R. (eds.), *Immunology of Infectious Diseases*. ASM Press, Washington, D.C., pp. 379-392.

**\*March KL, Wilensky RL, Roeske RW, Hathaway DR.** (1993). Effects of thiol protease inhibitors on cell cycle and proliferation of vascular smooth muscle cells in culture. *Circ Res. Feb.*, 72(2):413-23.

**\*Margolius HS.** (1996). Kallikreins and kinins. Molecular characteristics and cellular and tissue responses. *Diabetes.*, 45 Suppl 1:S14-9.

**\*McGrath ME.** (1999). The lysosomal cysteine proteases. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.*, 28:181-204

**\*Mellgren RL.** (1987). Calcium-dependent proteases: an enzyme system active at cellular membranes? *FASEB J.*, 1(2):110-5.

**\*Mellgren RL.** (1988). On the mechanism of binding of calpastatin, the protein inhibitor of calpains, to biologic membranes. *Biochem Biophys Res Commun.*, 150(1):170-6.

**\*Mellgren RL, Lane RD, Mericle MT.** (1989). The binding of large calpastatin to biologic membranes is mediated in part by interaction of an amino terminal region with acidic phospholipids. *Biochim Biophys Acta.*, 999(1):71-7.

**\*Mellgren RL.** (1991). Proteolysis of nuclear proteins by mu-calpain and m-calpain. *J Biol Chem.*, 266(21):13920-4.

**\*Mellgren RL, Lu Q.** (1994). Selective nuclear transport of mu-calpain. *Biochem Biophys Res Commun.*, 204(2):544-50.

**\*Mellgren RL, Lu Q, Zhang W, Lakkis M, Shaw E, Mericle MT.** (1996). Isolation of a Chinese hamster ovary cell clone possessing decreased mu-calpain content and a reduced proliferative growth rate. *J Biol Chem.*, 271(26):15568-74.

**\*Melloni E, Salamino F, Sparatore B.** (1992). The calpain-calpastatin system in mammalian cells: properties and possible functions. *Biochimie.*, 74(3):217-23.

**\*Mikus P, Ny T.** (1996). Intracellular polymerization of the serpin plasminogen activator inhibitor type 2. *J Biol Chem.*, 271(17):10048-53

**\*Miller MK, Bang ML, Witt CC, Labeit D, Trombitas C, Watanabe K, Granzier H, McElhinny AS, Gregorio CC, Labeit S.** (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(5):951-64.

**\*Minajeva A, Kulke M, Fernandez JM, Linke WA.** (2001). Unfolding of titin domains explains the viscoelastic behavior of skeletal myofibrils. *Biophys J.*, 80(3):1442-51.

**\*Moldoveanu T, Hosfield CM, Lim D, Elce JS, Jia Z, Davies PL.** (2002). A Ca(2+) switch aligns the active site of calpain. *Cell.*, 108(5):649-60

**\*Molinari M, Anagli J, Carafoli E.** (1994). Ca(2+)-activated neutral protease is active in the erythrocyte membrane in its nonautolyzed 80-kDa form. *J Biol Chem.*, 269(45):27992-5.

**\*Molinari M, Anagli J, Carafoli E.** (1995). PEST sequences do not influence substrate susceptibility to calpain proteolysis. *J Biol Chem.*, 270(5):2032-5.

**\*Moeller P.W., Fields P. A., Dutson T. R., Landmannand W. A. Carpenter Z. L.** (1977). High temperature effects on lysosomal enzyme distribution and fragmentation of bovine muscle. *J. Food Sci.* 42:510.

**\*Mugita N, Kimura Y, Ogawa M, Saya H, Nakao M.** (1997). Identification of a novel, tissue-specific calpain htra-3; a human homologue of the *Caenorhabditis elegans* sex determination gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997 Oct 29;239(3):845-50

**\*Muhle-Goll CM, Pastore A, Nilges M.** (1998). The three dimensional structure of a type I module from titin : a prototype of intracellular fibronectin type III domains. *Structure.*, 6(10) :1291-302

**\*Murphy G, Docherty AJ.** (1992). The matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 7(2):120-5

**\*Murphy G, Allan JA, Willenbrock F, Cockett MI, O'Connell JP, Docherty AJ.** (1992). The role of the C-terminal domain in collagenase and stromelysin specificity. *J Biol Chem.*, 267(14):9612-8

**\*Murphy RM, Snow RJ, Lamb GD.** (2006).  $\mu$ -Calpain and calpain-3 are not autolyzed with exhaustive exercise in humans. *Am J Physiol Cell Physiol.*, 290(1):C116-22. Epub 2005 Aug 17

**\*Murphy RM, Verburg E, Lamb GD.** (2006).  $\text{Ca}^{2+}$  activation of diffusible and bound pools of  $\mu$ -calpain in rat skeletal muscle. *J Physiol.*, 576(Pt 2):595-612. Epub 2006 Jul 20

**\*Murphy RM, Goodman CA, McKenna MJ, Bennie J, Leikis M, Lamb GD.** (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(3):926-31. Epub 2007 Jun 21

## N

**\*Nakagawa K, Masumoto H, Sorimachi H, Suzuki K.** (2001). Dissociation of  $\mu$ -calpain subunits occurs after autolysis of the N-terminus of the catalytic subunit, and is not required for activation. *J Biochem (Tokyo).*, 130(5):605-11.

**\*Nalefski EA, Falke JJ.** (1996). The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity. *Protein Sci.*, 5(12):2375-90

**\*Nishiura I, Tanaka K, Yamato S, Murachi T.** (1978). The occurrence of an inhibitor of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent neutral protease in rat liver. *J Biochem (Tokyo).*, 84(6):1657-9.

**\*Nixon PJ, Komenda J, Barber J, Deak Z, Vass I, Diner BA.** (1995). Deletion of the PEST-like region of photosystem two modifies the QB-binding pocket but does not prevent rapid turnover of D1. *J Biol Chem.*, 270(25):14919-27.

**\*Nori SL, Pompili E, De Santis E, De Renzis G, Bondi A, Collier WL, Ippoliti F, Fumagalli L.** (1993). Immunogold ultrastructural localization of calpastatin, the calpain inhibitor, in rabbit skeletal muscle. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 39(7):729-37.

## O

**\*Obermann WM, Gautel M, Weber K, Furst DO.** (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(2):211-20.

**\*Offer G, Knight P.** (1988). The structural basis of water holding in meat. I-II. *Dev. Meat Sci.*, 4,63-243

**\*O'Halloran et al., G.R. O'Halloran, D.J. Troy, D.J Buckley and W.J. Reville.** (1997). The role of endogenous proteases in tenderisation of fast glycolysing muscle. *Meat Science* 47, pp. 187–210.

**\*Ohkubo K, Ogata S, Misumi Y, Takami N, Ikehara Y.** (1991). Molecular cloning and characterization of rat contrapsin-like protease inhibitor and related proteins. *J Biochem (Tokyo)*, 109(2):243-50

**\*Olson DG, Parrish FC Jr, Dayton WR, Goll DE.** (1977). Effect of postmortem storage and calcium activated factor on the myofibrillar proteins of bovine skeletal muscle. *J. Food Sci.*, 42,117-124.

**\*Onho S, Minoshima S, Kudoh J, Fukuyama R, Shimizu Y, Ohmi-Imajoh S, Shimizu N, Suzuki K.** (1990). Four genes for the calpain family locate on four distinct human chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet.*, 53(4) :225-9.

**\*Ono Y, Shimada H, Sorimachi H, Richard I, Saido TC, Beckmann JS, Ishiura S, Suzuki K.** (1998). Functional defects of a muscle-specific calpain, p94, caused by mutations associated with limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *J Biol Chem.*, 273(27):17073-8.

**\*Ono Y, Sorimachi H, Suzuki K.** (1999). The calpain superfamily. In : *Calpain :Pharmacology and toxicology of calcium-dependent protease.* Wang KK and Yuen PW(eds). Philadelphia, USA.

**\*Ono Y, Kakinuma K, Torii F, Irie A, Nakagawa K, Labeit S, Abe K, Suzuki K, Sorimachi H.** (2004). Possible regulation of the conventional calpain system by skeletal muscle-specific calpain, p94/calpain 3. *J Biol Chem.*, 279(4):2761-71. Epub 2003 Nov 1

\***Orlowski M, Wilk S.** (1981). A multicatalytic protease complex from pituitary that forms enkephalin and enkephalin containing peptides. *Biochem Biophys Res Commun.*, 101(3):814-22.

\***Orlowski M, Cardozo C, Michaud C.** (1993). Evidence for the presence of five distinct proteolytic components in the pituitary multicatalytic proteinase complex. Properties of two components cleaving bonds on the carboxyl side of branched chain and small neutral amino acids. *Biochemistry.*, 32(6):1563-72.

\* **Ouali A., Garrel N, Obled A., Deval C., Valin C. and Penny I. F..** (1987). Comparative action of cathepsins D, B, H, L and of a new lysosomal cysteine proteinase on rabbit myofibrils. *Meat Science*, 19(2) : 83-100

\***Ouali, A., Dufour, E., Obled, A., Deval, C. & Valin, C.** (1988). Action des protéinases musculaires sur les myosines rapide et lente. Relation avec la protéolyse post mortem dans les muscles de type contractile variable. *Rep. Nut. Développ.*, 28, 839-844.

\***Ouali A.** (1990). La maturation des viandes: facteurs biologiques et technologiques de variation. *Viandes Prod. Carnés*, 11, 281-290

\***Ouali A.** (1990). Meat tenderisation: possible causes and mechanisms. A review. *J. Muscle Foods*, 1,129-165

\***Ouali A.** (1992). Proteolytic and physicochemical mechanisms involved in meat texture development. *Biochimie.*, 74(3):251-65.

## P

\***Pacifici RE, Kono Y, Davies KJ.** (1993). Hydrophobicity as the signal for selective degradation of hydroxyl radical-modified hemoglobin by the multicatalytic proteinase complex, proteasome. *J Biol Chem.*, 268(21):15405-11.

\***Padro T, van den Hoogen CM, Emeis JJ.** (1990). Distribution of tissue-type plasminogen activator (activity and antigen) in rat tissues. *Blood Coagul Fibrinolysis.*, 1(6):601-8.

**\*Pariat M, Carillo S, Molinari M, Salvat C, Debussche L, Bracco L, Milner J, Piechaczyk M.** (1997). Proteolysis by calpains: a possible contribution to degradation of p53. *Mol Cell Biol.*, 17(5):2806-15.

**\*Park DC, Parsons ME, Pennington FJT.** (1973). Evidence for mast-cell origin of proteinase in skeletal muscle homogenates. *Biochem. Soc. Trans.*, (1):730-734.

**\*Parks WC, Shapiro SD.** (2001). Matrix metalloproteinases in lung biology. *Respir Res.*, 2(1):10-9. Epub 2000 Dec 29

**\*Parr T, Sensky PL, Scothern GP, Bardsley RG, Buttery PJ, Wood JD, Warkup C.** (1999). Relationship between skeletal muscle-specific calpain and tenderness of conditioned porcine longissimus muscle. *J Anim Sci.*, 77(3):661-8

**\*Patel T, Gores GJ, Kaufmann SH.** (1996). The role of proteases during apoptosis. *FASEB J.*, 10(5):587-97.

**\*Paterson BC, Parrish FC Jr.** (1987). SDS-page conditions for detection of titin and nebulin in tender and tough bovine muscles. *J. Food Sci.*, 52,509-510

**\*Pennacchio LA, Bouley DM, Higgins KM, Scott MP, Noebels JL, Myers RM.** (1998). Progressive ataxia, myoclonic epilepsy and cerebellar apoptosis in cystatin B-deficient mice. *Nat Genet.*, 20(3):251-8.

**\*Pontremoli S, Melloni E, Sparatore B, Salamino F, Michetti M, Sacco O, Horecker BL.** (1985b). Binding to erythrocyte membrane is the physiological mechanism for activation of Ca<sup>2+</sup>-dependent neutral proteinase. *Biochem Biophys Res Commun.*, 128(1):331-8.

**\*Porn-Ares MI, Samali A, Orrenius S.** (1998). Cleavage of the calpain inhibitor, calpastatin, during apoptosis. *Cell Death Differ.*, 5(12):1028-33.

**\*Poussard S, Duvert M, Balcerzak D, Ramassamy S, Brustis JJ, Cottin P, Ducastaing A.** (1996). Evidence for implication of muscle-specific calpain (p94) in myofibrillar integrity. *Cell Growth Differ.*, 7(11):1461-9.

**\*Pratt CW, Pizzo SV.** (1987). Mechanism of action of inter-alpha-trypsin inhibitor. *Biochemistry.*, 26(10):2855-63

**\*Pringle TD, Calkins CR, Koohmaraie M, Jones SJ.** (1993). Effects over time of feeding a beta-adrenergic agonist to wether lambs on animal performance, muscle growth, endogenous muscle proteinase activities, and meat tenderness. *J Anim Sci.*, 71(3):636-44.

## Q R

\***Ravulapalli R, Diaz BG, Campbell RL, Davies PL.** (2005). Homodimerization of calpain 3 penta-EF-hand domain. *Biochem J.*, 388(Pt 2):585-91

\***Rawlings ND, Barrett AJ.** (1990). Evolution of proteins of the cystatin superfamily. *J Mol Evol.*, 30(1):60-71

\***Rawlings ND, Barrett AJ.** (1994). Families of serine peptidases. *Methods Enzymol.* 1994; 244:19-61

\***Raynaud F.** (1999). Caractérisation et régulation des interactions de la titine avec les protéines de la strie Z et de la bande I. Diplôme EPHE, EPHE la Sorbonne, Paris

\***Raynaud F, Fernandez E, Coulis G, Aubry L, Vignon X, Bleimling N, Gautel M, Benyamin Y, Ouali A.** (2005). Calpain 1-titin interactions concentrate calpain 1 in the Z-band edges and in the N2-line region within the skeletal myofibril. *FEBS J.*, (10):2578-90

\***Raynaud F, Jond-Necand C, Marcilhac A, Fürst D, Benyamin Y.** (2006). Calpain 1-gamma filamin interaction in muscle cells: a possible in situ regulation by PKC-alpha. *Int J Biochem Cell Biol.*, 38(7):1230

\***Remold-O'Donnell E.** (1993). The ovalbumin family of serpin proteins. *FEBS Lett.*, 315(2):105-8

\***Reverter D, Sorimachi H, Bode W.** (2001). The structure of calcium-free human m-calpain: implications for calcium activation and function. *Trends Cardiovasc Med.*, 11(6):222-9.

\***Rey MA, Davies PL.** (2002). The protease core of the muscle-specific calpain, p94, undergoes Ca<sup>2+</sup>-dependent intramolecular autolysis. *FEBS Lett.*, 532(3):401-6.

\***Richard I, Broux O, Allamand V, Fougereuse F, Chiannikulchai N, Bourg N, Brenguier L, Devaud C, Pasturaud P, Roudaut C, et al.** (1995). Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Cell.*, 81(1):27-40

\***Richard I, Roudaut C, Saenz A, Pogue R, Grimbergen JE, Anderson LV, Beley C, Cobo AM, de Diego C, Eymard B, Gallano P, Ginjaar HB, Lasa A, Pollitt C, Topaloglu H, Urtizberea JA, de Visser M, van der Kooi A, Bushby K, Bakker E, Lopez de Munain A, Fardeau M, Beckmann JS.** (1999). Calpainopathy-a survey of mutations and polymorphisms. *Am J Hum Genet.*, 64(6):1524-40

\***Rivett AJ.** (1993a). Proteasomes: multicatalytic proteinase complexes. *Biochem J.*, 291 ( Pt 1):1-10.

\***Rivett AJ.** (1993b). Characterization of proteasomes isolated from rat liver. *Enzyme Protein.*, 47(4-6):210-9.

\***Rizo J, Sudhof TC.** (1998). C2-domains, structure and function of a universal Ca<sup>2+</sup>-binding domain. *J Biol Chem.*, 273(26):15879-82.

\***Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, Hwang D, Goldberg AL.** (1994). Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell.*, 78(5):761-71.

\***Rogers S, Wells R, Rechsteiner M.** (1986). Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science.*, 234(4774):364-8.

\***Rudolph R, Lilie H.** (1996). In vitro folding of inclusion body proteins. *FASEB J.* 1996 Jan;10(1):49-56

## S

\***Saido TC, Sorimachi H, Suzuki K.** (1994). Calpain: new perspectives in molecular diversity and physiological-pathological involvement. *FASEB J.*, 8(11):814-22.

\***Saito K, Elce JS, Hamos JE, Nixon RA.** (1993). Widespread activation of calcium-activated neutral proteinase (calpain) in the brain in Alzheimer disease: a potential molecular basis for neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 90(7):2628-32.

\***Saito Y, Peterson PA, Matsumura M.** (1993). Quantitation of peptide anchor residue contributions to class I major histocompatibility complex molecule binding. *J Biol Chem.*, 268(28):21309-17.

\***Salamino F, De Tullio R, Michetti M, Mengotti P, Melloni E, Pontremoli S.** (1994). Modulation of calpastatin specificity in rat tissues by reversible phosphorylation and dephosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun.*, 199(3):1326-32.

\***Salamino F, Aversa M, Tedesco I, De Tullio R, Melloni E, Pontremoli S.** (1997). Modulation of rat brain calpastatin efficiency by post-translational modifications. *FEBS Lett.*, 412(3):433-8.

**\*Samis JA, Zboril G, Elce JS.** (1987). Calpain I remains intact and intracellular during platelet activation. Immunochemical measurements with monoclonal and polyclonal antibodies. *Biochem J.*, 246(2):481-8.

**\*Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 74(12):5463-7

**\*Sarin A, Clerici M, Blatt SP, Hendrix CW, Shearer GM, Henkart PA.** (1994). Inhibition of activation-induced programmed cell death and restoration of defective immune responses of HIV+ donors by cysteine protease inhibitors. *J Immunol.*, 153(2):862-72.

**\*Sarin A, Nakajima H, Henkart PA.** (1995). A protease-dependent TCR-induced death pathway in mature lymphocytes. *J Immunol.*, 154(11):5806-12.

**\*Schick C, Pemberton PA, Shi GP, Kamachi Y, Cataltepe S, Bartuski AJ, Gornstein ER, Bromme D, Chapman HA, Silverman GA.** (1998). Cross-class inhibition of the cysteine proteinases cathepsins K, L, and S by the serpin squamous cell carcinoma antigen 1: a kinetic analysis. *Biochemistry.*, 37(15):5258-66.

**\*Schollmeyer JE.** (1986). Role of Ca<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup>-activated protease in myoblast fusion. *Exp Cell Res.*, 162(2):411-22.

**\*Schollmeyer JE.** (1988). Calpain II involvement in mitosis. *Science.* 240(4854):911-3.

**\*Sebestyén MG, Wolff JA, Greaser ML.** (1995). Characterization of a 5.4 kb cDNA fragment from the Z-line region of rabbit cardiac titin reveals phosphorylation sites for proline-directed kinases. *J Cell Sci.*, 108 ( Pt 9):3029-37

**\*Seemuller E, Lupas A, Stock D, Lowe J, Huber R, Baumeister W.** (1995). Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease. *Science.*, 268(5210):579-82.

**\*Sentendreu M, Coulis G, Ouali A.** (2002). Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. *Trends in Food Science and Technology*, Volume 13, Number 12, December 2002 , pp. 400-421(22)

**\*Shoji-Kasai Y, Senshu M, Iwashita S, Imahori K.** (1988). Thiol protease-specific inhibitor E-64 arrests human epidermoid carcinoma A431 cells at mitotic metaphase. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 85(1):146-50.

**\*Siddiqi AR, Zaidi ZH, Jörnvall H.** (1991). Purification and characterization of a Kunitz-type trypsin inhibitor from Leaf-nosed viper venom. *FEBS Lett.*, 294(1-2):141-3

**\*Sloane BF.** (1990). Cathepsin B and cystatins: evidence for a role in cancer progression. *Semin Cancer Biol.*, 1(2):137-52.

**\*Solary E, Eymin B, Droin N, Haugg M.** (1998). Proteases, proteolysis, and apoptosis. *Cell Biol Toxicol.*, 14(2):121-32.

**\*Sorimachi H, Imajoh-Ohmi S, Emori Y, Kawasaki H, Ohno S, Minami Y, Suzuki K.** (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(33):20106-11.

**\*Sorimachi H, Ishiura S, Suzuki K.** (1993a). A novel tissue-specific calpain species expressed predominantly in the stomach comprises two alternative splicing products with and without Ca(2+)-binding domain. *J Biol Chem.*, 268(26):19476-82.

**\*Sorimachi H, Toyama-Sorimachi N, Saido TC, Kawasaki H, Sugita H, Miyasaka M, Arahata K, Ishiura S, Suzuki K.** (1993b). Muscle-specific calpain, p94, is degraded by autolysis immediately after translation, resulting in disappearance from muscle. *J Biol Chem.*, 268(14):10593-605.

**\*Sorimachi H, Kinbara K, Kimura S, Takahashi M, Ishiura S, Sasagawa N, Sorimachi N, Shimada H, Tagawa K, Maruyama K, 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(52):31158-62.

**\*Sorimachi H, Ishiura S, Suzuki K.** (1997). Structure and physiological function of calpains. *Biochem J.*, 328 ( Pt 3):721-32

**\*Sorimachi H, Suzuki K.** (2001). The structure of calpain. *J Biochem (Tokyo).*, 129(5):653-64.

**\*Spencer MJ, Croall DE, Tidball JG.** (1995). Calpains are activated in necrotic fibers from mdx dystrophic mice. *J Biol Chem.*, 270(18):10909-14.

**\*Spencer MJ, Tidball JG.** (1996). Calpain translocation during muscle fiber necrosis and regeneration in dystrophin-deficient mice. *Exp Cell Res.*, 226(2):264-72.

**\*Spencer MJ, Guyon JR, Sorimachi H, Potts A, Richard I, Herasse M, Chamberlain J, Dalkilic I, Kunkel LM, Beckmann JS.** (2002). Stable expression of calpain 3 from a muscle transgene in vivo: immature muscle in transgenic mice suggests a role for calpain 3 in muscle maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 99(13):8874-9. Epub 2002 Jun 19

**\*Squier MK, Miller AC, Malkinson AM, Cohen JJ.** (1994). Calpain activation in apoptosis. *J Cell Physiol.*, 159(2):229-37.

**\*Stauber WT, Bird JW, Schottelius BA.** (1977). Catalase: an enzymatic indicator of the degree of muscle wasting. *Exp Neurol.*, 55(2):381-9.

**\*Strobl S, Fernandez-Catalan C, Braun M, Huber R, Masumoto H, Nakagawa K, Irie A, Sorimachi H, Bourenkow G, Bartunik H, Suzuki K, Bode W.** (2000). The crystal structure of calcium-free human m-calpain suggests an electrostatic switch mechanism for activation by calcium. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 97(2):588-92.

**\*Suzuki K, Tsuji S, Ishiura S, Kimura Y, Kubota S, Imahori K.** (1981). Autolysis of calcium-activated neutral protease of chicken skeletal muscle. *J Biochem (Tokyo)*., 90(6):1787-93.

**\*Suzuki K, Imajoh S, Emori Y, Kawasaki H, Minami Y, Ohno S.** (1987). Calcium-activated neutral protease and its endogenous inhibitor. Activation at the cell membrane and biological function. *FEBS Lett.*, 220(2):271-7.

**\*Suzuki K, Sorimachi H.** (1998). A novel aspect of calpain activation. *FEBS Lett.*, 14;433(1-2):1-4

**\*Suzuki Y, Yoshida K, Ichimiya T, Yamamoto T, Sinohara H.** (1990). Trypsin inhibitors in guinea pig plasma: isolation and characterization of contrapsin and two isoforms of alpha-1-antiproteinase and acute phase response of four major trypsin inhibitors. *J Biochem (Tokyo)*., 107(2):173-9

## T

**\*Takahara H, Sinohara H.** (1982). Mouse plasma trypsin inhibitors. Isolation and characterization of alpha-1-antitrypsin and contrapsin, a novel trypsin inhibitor. *J Biol Chem.*, 257(5):2438-46

**\*Takano E, Kitahara A, Sasaki T, Kannagi R, Murachi T.** (1986). Two different molecular species of pig calpastatin. Structural and functional relationship between 107 kDa and 68 kDa molecules. *Biochem J.*, 235(1):97-102.

**\*Takano E, Maki M, Mori H, Hatanaka M, Marti T, Titani K, Kannagi R, Ooi T, Murachi T.** (1988). Pig heart calpastatin: identification of repetitive domain structures and anomalous behavior in polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochemistry.*, 27(6):1964-72.

**\*Takano E, Nosaka T, Lee WJ, Nakamura K, Takahashi T, Funaki M, Okada H, Hatanaka M, Maki M.** (1993). Molecular diversity of calpastatin in human erythroid cells. *Arch Biochem Biophys.*, 303(2):349-54.

**\*Takano E, Ma H, Yang HQ, Maki M, Hatanaka M.** (1995). Preference of calcium-dependent interactions between calmodulin-like domains of calpain and calpastatin subdomains. *FEBS Lett.*, 362(1):93-7.

**\*Takano E. and Maki M.** (1999) Structure of calpastatin and its inhibitory control of calpain. in *Calpain: Pharmacology and Toxicology of Calcium-Dependent Protease* (Wang, K.K.W. and Yuen, P.-W., eds.) pp. 25-49, Taylor & Francis, Philadelphia, PA

**\*Tan FC, Goll DE, Otsuka Y.** (1988). Some properties of the millimolar Ca<sup>2+</sup>-dependent proteinase from bovine cardiac muscle. *J Mol Cell Cardiol.*, 20(11):983-97.

**\*Tanaka K, Ii K, Ichihara A, Waxman L, Goldberg AL.** (1986). A high molecular weight protease in the cytosol of rat liver. I. Purification, enzymological properties, and tissue distribution. *J Biol Chem.*, 261(32):15197-203.

**\*Tatsumi R, Shimada K, Hattori A.** (1997). Fluorescence detection of calcium-binding proteins with quinoline Ca-indicator quin2. *Anal Biochem.*, 254(1):126-31

**\*Tatsumi R, Maeda K, Hattori A, Takahashi K.** (2001). Calcium binding to an elastic portion of connectin/titin filaments. *J Muscle Res Cell Motil.*, 22(2):149-62.

**\*Taveau M, Bourg N, Sillon G, Roudaut C, Bartoli M, Richard I.** (2003). Calpain 3 is activated through autolysis within the active site and lyses sarcomeric and sarcolemmal components. *Mol Cell Biol.*, 23(24):9127-35

**\*Taylor RG, Tassy C, Briand M, Robert N, Briand Y, Ouali A.** (1995). Proteolytic activity of proteasome on myofibrillar structures. *Mol Biol Rep.*, 21(1):71-3.

**\*Temm-Grove CJ, Wert D, Thompson VF, Allen RE, Goll DE.** (1999). Microinjection of calpastatin inhibits fusion in myoblasts. *Exp Cell Res.*, 247(1):293-303.

**\*Theopold U, Pinter M, Daffre S, Tryselius Y, Friedrich P, Nassel DR, Hultmark D.** (1995). CalpA, a *Drosophila* calpain homolog specifically expressed in a small set of nerve, midgut, and blood cells. *Mol Cell Biol.*, 15(2):824-34.

**\*Thompson VF, Goll DE, Kleese WC.** (1990). Effects of autolysis on the catalytic properties of the calpains. *Biol Chem Hoppe Seyler.*, 371 Suppl:177-85.

**\*Tompa P, Emori Y, Sorimachi H, Suzuki K, Friedrich P.** (2001). Domain III of calpain is a Ca<sup>2+</sup>-regulated phospholipid-binding domain. *Biochem Biophys Res Commun.*, 280(5):1333-9.

**\*Tompa P, Mucsi Z, Orosz G, Friedrich P.** (2002). Calpastatin subdomains A and C are activators of calpain. *J Biol Chem.*, 277(11):9022-6.

**\*Tortora, Grabowski** (1994). *Principes d'anatomie et de physiologie*. De Boeck University

**\*Travis J, Salvesen G.** (1983). Control of coagulation and fibrinolysis by plasma proteinase inhibitors. *Behring Inst Mitt.* 1983 Aug;(73):56-65.

**\*Trinick J, Tskhovrebova L.** (1999). Titin: a molecular control freak. *Trends Cell Biol.*, (10):377-80

**\*Trombitás, K. and Pollack, G. H.** (1993). Elastic properties of the titin filament in the Z-line region of vertebrate striated muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 14, 416-422.

**\*Turk V, Brzin J, Kotnik M, Lenarcic B, Popović T, Ritonja A, Trstenjak M, Begić-Odobasić L, Machleidt W.** (1986). Human cysteine proteinases and their protein inhibitors stefins, cystatins and kininogens. *Biomed Biochim Acta.* 1986;45(11-12):1375-84

**\*Turk V, Turk B, Turk D.** (2001). Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *EMBO J.*, 20(17):4629-33.

**\*Twining SS.** (1994). Regulation of proteolytic activity in tissues. *Crit Rev Biochem Mol Biol.*, 29(5):315-83

## U

**\*Uemori T, Shimojo T, Asada K, Asano T, Kimizuka F, Kato I, Maki M, Hatanaka M, Murachi T, Hanzawa H, et al.** (1990). Characterization of a functional domain of human calpastatin. *Biochem Biophys Res Commun.*, 166(3):1485-93.

## V

**\*Vignon X, Beaulaton J, Ouali A.** (1989). Ultrastructural localization of calcium in post-mortem bovine muscle: a cytochemical and X-ray microanalytical study. *Histochem J.*, 21(7):403-11.

## W

**\*Wang J, Shaner N, Mittal B, Zhou Q, Chen J, Sanger JM, Sanger JW.** (2005). Dynamics of Z-band based proteins in developing skeletal muscle cells. *Cell Motil Cytoskeleton.*, 61(1):34-48

\***Wang K.** (1985). Sarcomere-associated cytoskeletal lattices in striated muscle. Review and hypothesis. *Cell Muscle Motil.*, 6:315-69.

\***Wang KK, Villalobo A, Roufogalis BD.** (1989). Calmodulin-binding proteins as calpain substrates. *Biochem J.*, 262(3):693-706.

\***Wang KK, Posmantur R, Nadimpalli R, Nath R, Mohan P, Nixon RA, Talanian RV, Keegan M, Herzog L, Allen H.** (1998). Caspase-mediated fragmentation of calpain inhibitor protein calpastatin during apoptosis. *Arch Biochem Biophys.*, 356(2):187-96.

\***Wang KK.** (2000). Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci.*, 23(1):20-6.

\***Wang LF, Wei SG, Miao SY, Liu QY, Koide SS.** (1994). Calpastatin gene in human testis. *Biochem Mol Biol Int.*, 33(2):245-51

\***Wang SM, Greaser ML, Schultz E, Bulinski JC, Lin JJ, Lessard JL.** (1988). Studies on cardiac myofibrillogenesis with antibodies to titin, actin, tropomyosin, and myosin. *J Cell Biol.*, 107(3):1075-83.

\***Wang SM, Jeng CJ, Sun MC.** (1992). Studies on the interaction between titin and myosin. *Histol Histopathol.*, 7(3):333-7.

\***Waxman L, Krebs EG.** (1978). Identification of two protease inhibitors from bovine cardiac muscle. *J Biol Chem.*, 253(17):5888-91.

\***Wyllie A.** (1998). Apoptosis. An endonuclease at last. *Nature.*, 391(6662):20-1

\***Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR.** (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol.*, 68:251-306

\***Williams AF, Barclay AN.** (1988). The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition. *Annu Rev Immunol.*, 6:381-405.

X

Y

\***Yamaguchi R, Maki M, Hatanaka M, Sabe H.** (1994). Unphosphorylated and tyrosine-phosphorylated forms of a focal adhesion protein, paxillin, are substrates for calpain II in vitro: implications for the possible involvement of calpain II in mitosis-specific degradation of paxillin. *FEBS Lett.*, 356(1):114-6.

**\*Yang HQ, Ma H, Takano E, Hatanaka M, Maki M.** (1994). Analysis of calcium-dependent interaction between amino-terminal conserved region of calpastatin functional domain and calmodulin-like domain of mu-calpain large subunit. *J Biol Chem.*, 269(29):18977-84.

**\*Yang YT, McElligott MA.** (1989). Multiple actions of beta-adrenergic agonists on skeletal muscle and adipose tissue. *Biochem J.*, 261(1):1-10.

**\*Yarom R, Meiri U.** (1971). N lines in striated muscle: a site of intracellular Ca<sup>2+</sup>. *Nat New Biol.*, 234(51):254-6.

**\*Yoshikawa Y, Mukai H, Hino F, Asada K, Kato I.** (2000). Isolation of two novel genes, down-regulated in gastric cancer. *Jpn J Cancer Res.*, 91(5):459-63.

**\*Yoshimura N, Murachi T, Heath R, Kay J, Jasani B, Newman GR.** (1986). Immunogold electron-microscopic localisation of calpain I in skeletal muscle of rats. *Cell Tissue Res.*, 244(2):265-70.

**\*Yoshimura T, Kameyama K, Takagi T, Ikai A, Tokunaga F, Koide T, Tanahashi N, Tamura T, Cejka Z, Baumeister W, Tanaka K, Ichihara A.** (1993). Molecular characterization of the "26S" proteasome complex from rat liver. *J Struct Biol.*, 111(3):200-11.

## Z

**\*Zamora F.** (1997). Prédiction, à partir de variables biologiques, de la variabilité de l'attendrissage de la viande bovine, en fonction du facteur animal et du facteur type de muscle. Thèse d'état.

**\*Zhang W, Lu Q, Xie ZJ, Mellgren RL.** (1997). Inhibition of the growth of WI-38 fibroblasts by benzyloxycarbonyl-Leu-Leu-Tyr diazomethyl ketone: evidence that cleavage of p53 by a calpain-like protease is necessary for G1 to S-phase transition. *Oncogene.*, 14(3):255-63.

**\*Zimmerman UJ, Schlaepfer WW.** (1991). Two-stage autolysis of the catalytic subunit initiates activation of calpain I. *Biochim Biophys Acta.*, 1078(2):192-8.

*Publications et  
communications*

## Publications et communications

### *Publications*

Sentandreu M, **Coulis G**, Ouali A. (2002). Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. Trends in Food Science and Technology, Volume 13, Number 12, December 2002 , pp. 400-421(22)

**Coulis G**, Sentandreu MA, Bleimling N, Gautel M, Benyamin Y, Ouali A. (2004). Myofibrillar tightly bound calcium in skeletal muscle fibers: a possible role of this cation in titin strands aggregation. FEBS Lett., 556(1-3):271-5

Raynaud F, Fernandez E, **Coulis G**, Aubry L, Vignon X, Bleimling N, Gautel M, Benyamin Y, Ouali A. (2005). Calpain 1-titin interactions concentrate calpain 1 in the Z-band edges and in the N2-line region within the skeletal myofibril. FEBS J., (10):2578-90

Herrera-Mendez CH, Brémaud L, **Coulis G**, Pélissier P, Sentandreu MA, Aubry L, Delourme D, Chambon C, Maftah A, Leveziel H, Ouali A. (2006). Purification of the skeletal muscle protein Endopin 1B and characterization of the genes encoding Endopin 1A and 1B isoforms. FEBS Lett., 12;580(14):3477-84. Epub 2006 May 15

Ahmed Ouali, Carlos Hernan Herrera-Mendez, **Gerald Coulis**, Samira Becila, Abdelghani Boudjellal, Laurent Aubry and Miguel Angel Sentandreu. (2006). Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. Meat Science, 74 (1) : 44-58



## **Calcium regulates the oligomeric organisation of recombinant titin I2-I6 fragments enhancing concomitantly its calpain 1 binding capacities**

Coulis G, Becila S., Herrera Mendez C., Sentandreu MA, Raynaud F, Richard I, Benyamin Y, Ouali A

### **ABSTRACT**

Calpain 1 a ubiquitous calcium-dependent intracellular protease, was recently shown to bind tightly to the proximal end of the I-band titin segment and this interaction was found to be calcium regulated. (Raynaud F, Fernandez E, Coulis G, Aubry L, Vignon X, Bleimling N, Gautel M, Benyamin Y, Ouali A. (2005). FEBS Journal, 272, 2578-90). The present work aimed at (1) the identification of the exact calpain binding site in the N1-line region of titin using a recombinant fragment spanning the I2-I6 Ig domains and its sub-fragments and (2) the clarification of the role of calcium in this interaction. For this purposes I2-I6 and I3-I4 titin recombinant fragments were titrated with calcium. Both exhibited a biphasic profile with Kd values of  $1.9 \cdot 10^{-7}$  M and  $3.3 \cdot 10^{-3}$  M for I2-I6 and  $1.6 \cdot 10^{-6}$  M and  $1.4 \cdot 10^{-4}$  M for I3-I4. Binding of calcium to I2-I6 induced oligomerization of the titin I2-I6 fragment leading to a mixture of trimmers, hexamers and monomers, each of them predominating at different calcium concentrations. Amongst these oligomers, trimmers predominate at physiological calcium concentration and were found to bind tightly highest amounts of calpain 1 with a Kd of 65 nM. Analysis of different subfragments including I2-I3, I3-I4 and I5-I6, calpain 1 was shown to bind essentially to the I4 Ig-domain ( Kd = 89 nM) in a calcium dependent manner. It was concluded that calcium induced oligomerisation of titin is essential for calpain 1 binding.

### **INTRODUCTION**

Calpain designed a complex group of cytoplasmic cysteine proteases requiring calcium ions for activity. Although their physiological function is still not fully understood, several sets of evidence support their implication in a variety of calcium-regulated cellular processes such as signal transduction, cell proliferation, cell cycle progression, differentiation, apoptosis, membrane fusion, and platelet activation (rev Sorimachi et al., 1997; Goll et al., 2003; Suzuki et al., 2004). Deregulation of their activity also contributes to various pathological conditions such as neuronal degeneration, Alzheimer's disease, metastasis, and cataract (Huang and Wang, 2001; Suzuki et al., 2004).

Calpain 1 (microcalpain or  $\mu$ -calpain) and calpain 2 (millicalpain or m-calpain) are the best characterized calpains and show the widest tissue distribution amongst members of this family. These calcium dependent cysteine proteases play important roles in a large set of intracellular events (Sorimachi et al., 1997; Carafoli and Molinari, 1998; Wang, 2000; Baghdiguian et al., 1999), particularly in the selective proteolysis of factors involved in the cell cycle (Raynaud et al., 2004), during apoptosis in association with caspases (Yamashima, 2004), or in the cleavage of membrane-cytoskeleton complexes during cell motility phases (Lebart and Benyamin, 2006). Calpain 1 (active in vitro at 50  $\mu$ M Ca<sup>2+</sup> ions) and calpain 2 (active in vitro at 500  $\mu$ M Ca<sup>2+</sup> ions) are heterodimeric structures composed of a different 80 kDa subunit and a common 30 kDa subunit (reviewed by Benyamin, 2006). In skeletal muscle tissue, they coexist with calpain 3, a monomeric calpain homologous to the 80 kDa calpain subunit (Sorimachi et al., 1989), and with calpain 10, which is deprived of the calcium binding domain or domain IV (Ma et al., 2001).

Cellular localization of ubiquitous calpains in the skeletal muscle fiber has long been highly controversial. Some investigations suggest that calpains are located at the Z-line (Ishiura et al., 1980; Dayton and Schollmeyer, 1981), whereas Yoshimura et al. ((1986) reported a predominant intracellular localization of calpain 1 in the I-band region of rat muscle, stressing that this enzyme is not exclusively associated with the Z-line. Other reports indicated that a significant part if not all calpain 1 is tightly bound to myofibrils (Goll and Geesink, 1995) but the carrier protein has not been identified. A recent study of

calpain 1 location in bovine skeletal muscle, by immunofluorescence confocal microscopy and immunoelectron microscopy, using an isoform-specific antibody revealed that calpain 1 is mainly found within the I-band at the N1-line level (a transverse dense structure located 100 nm from the Z-band) and at the N2-line level, on the myofiber fractures lines described in bovine muscles, as a postmortem highly susceptible proteolytic site (Vignon et al., 1989; Raynaud et al., 2005). To comfort these ultrastructural observations, these authors further showed that calpain 1 binds tightly to purified titin fragments ( $K_d \# 10^{-8}$  M) containing either the N1 line region or the N2-line area of this giant molecule in a calcium dependent manner.

Since the beginning of the 70's, N-lines of striated skeletal muscles were known to bind a relatively large amount of calcium detectable at the ultrastructural level by pyroantimonate precipitation and X-ray microanalysis (Yarom and Meiri, 1971; Vignon et al., 1989). This binding is quite irreversible since this cation can not be displaced by common  $Ca^{++}$  chelators including EDTA, EGTA and Quin2. However the calcium carrier protein remained unknown until the discovery that titin, one of the major components of the sarcomere, was a potential candidate for calcium binding. Titin is the third myofilament type of vertebrate striated muscle, with a single molecule spanning the half-sarcomere, from the Z-line to the M-line. Passive tension is generated by titin's extensible region, found in the I-band of the sarcomere and comprising serially linked and mechanically distinct elements, i.e. the tandem Ig and the PEVK (proline-glutamate-valine-lysine rich region) segments (Maruyama, 1997; Gregorio *et al.* 1999; Tskhovrebova and Trinick, 2002;). Previous works suggest that the PEVK segment binds calcium with high affinity, raising the possibility that the extensibility of the PEVK segment may be calcium regulated (Tatsumi et al., 2001). Calcium binding thus affects the stiffness and/or the flexibility of the molecule within the sarcomere (Labeit et al., 2003). In addition, it was also recently shown that calcium binds quite irreversibly to the Z9-I1 linking sequence ( $K_d \# 0.049 \pm 0.004$  nM.), a glutamate rich segment, and that calcium induced an ordered polymerisation of this titin fragment (Coulis et al., 2004). While the A-band section of the molecule is conserved between isoforms, the I-band section of titin reveals large size variations between isoforms (Freiburg *et al.* 2000) correlating with the structure and elastic properties of the different muscle types. In general, the I-band section comprises three major regions, two composed of conserved tandem Ig segments (I1-I15 and 184-I105), flanking a central region (I16-I83) formed by unique sequences and variable tandem Ig segments. The unique sequence regions, in turn, contain two subregions: N2, consisting of alternating Ig domains and unique sequences and the PEVK region named from its preponderance of these amino-acid residues (Tskhovrebova and J. Trinick, 2002). The conserved part of proximal tandem Ig segment (I1-I15) also contains some specific particularities including the unique sequence linking Ig domains Z9 and I1 and the T12 epitope which was presumed to be located between Ig domains I2 and I3. This proximal segment is also known to bind tightly calcium and calpain 1 (Coulis et al., 2004; Raynaud et al., 2005).

The objective of the present study was to characterize the interaction of calpain 1 with the proximal region of the I-band segment of titin which presents several specificities including the presence of the N1-line and the ability to bind calcium and calpain 1 with high affinity (Figure 1). We therefore used recombinant I2-I6 titin segment located in the N1-line region of the protein and its sub-fragments as well with the purpose to identify the exact binding site of calpain 1 and the role of calcium ions in this interaction which is known to enhance the amount of bound calpain.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### *Calpain 1*

Porcine calpain 1 was purchased from Calbiochem (CN Biosciences, Nottingham, UK).

### *Cloning, Expression and purification of titin fragments*

The cDNA for human titin fragment spanning I2 to I6 was donated by I. Richard (Genethon, Evry). Titin fragments corresponding to regions I2-I6, I2-I3, I3-I4, I5-I6 were obtained by PCR amplification (primers in Table) and then cloned into pET 101 TOPO expression vector (Invitrogen) according to the

manufacturer's instructions. Primers used are depicted in Table 1. The DNA sequences of positive clones were verified.

Plasmid encoding titin fragments were transformed into competent *Escherichia coli* BL21 DE3 (Invitrogen). The colonies obtained were used to inoculate Luria-Bertani medium containing 100 µg/ml ampicillin. Overnight cultures were then diluted 1:40 in fresh medium, grown to an O.D<sub>600nm</sub> of 0.6 at 37°C. Expression was induced by adding 1mM IPTG for 4h at 37°C. The cells were collected, resuspended in 50 ml of lysis buffer (50mM potassium phosphate pH 7.4, 500mM NaCl, 5mM β-mercaptoethanol, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 40mM imidazole, 1mg/ml lysozyme) and sonicated. The soluble fraction was applied to a 8 ml Ni-Sepharose column (Amersham). After washing with 40mM imidazole, proteins were eluted successively with 100mM and 250mM imidazole in buffer containing 50 mM potassium phosphate pH 7.4, 500mM NaCl, 5mM β-mercaptoethanol. Fractions containing recombinant protein as determined by SDS-PAGE and Western blot were pooled and dialysed against experiment buffer (50mM Tris-HCl pH 7.5, 100mM NaCl, 1mM DTT, 4mM EGTA).

Inclusion bodies containing recombinant fragment I5-I6 were solubilized with denaturing buffer including 50mM potassium phosphate pH 7.4, 500mM NaCl, 5mM β-mercaptoethanol, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 40mM imidazole (buffer B), 6M Guanidine-HCl. The extract was then loaded on a Ni-Sepharose column (1x8 cm) equilibrated in 8M urea in buffer B. The recombinant fragment was eluted with the same imidazole concentration than for the more soluble titin fragments. Satisfactory refolding of the purified fragment was then achieved by successive dialysis steps according to Seckler and Jaenicke (1992) and Rudolph and Lilie (1996).

### ***Antibodies***

Rat polyclonal anti-bovine calpain 1 was obtained by injection of the native heterodimeric protein (Raynaud et al., 2005). The Monoclonal antibody directed against the C-terminal polyhistidine tag (Invitrogen R932-25) was purchased from Invitrogen (Cergy Pontoise, France).

### ***Electrophoresis and western blot analysis***

SDS/PAGE was performed) under reducing conditions on a 12.5% slab gel as described by Laemmli (1970). Molecular masses were estimated by using the Pharmacia low *Mr* calibration kit. Proteins were revealed using either Coomassie Brilliant blue R250 or silver staining. Electrophoresis in non-denaturing conditions was carried out as above on 10% slab gel, but in non-reducing conditions and in the absence of SDS. Immunoblot analysis were carried out as described previously (Sentandreu et al., 1003).

### ***Fluorescent assays***

Assays were conducted using a LS 50B Perkin-Elmer luminescence spectrofluorimeter by measuring the fluorescence changes of fluorescein isothiocyanate labelled calpain 1 (FITC-calpain 1). Increasing amounts of titin fragments were added to the FITC-calpain 1 (25 µg/ml) in 50 mM Tris/HCl buffer pH 7,5 containing 1mM DTT, 4mM EGTA, 0,6 µM E64 and 100 mM NaCl and fluorescence recorded using excitation and emission wavelengths of 495 and 520 nm, respectively.

### ***Binding assays***

Binding assays were carried out with both bovine or porcine calpain 1 and titin fragments (I2-I6, I2-I3, I3-I4, I5-I6) by using solid phase enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Titin fragments (1 µg/ml) in 50 mM Tris/HCl buffer pH 7.5, 1mM DTT, 4mM EGTA, and 100 mM NaCl containing either 12 µM free calcium or without calcium ( $[Ca] \leq 2.4 \cdot 10^{-11}$  M) were immobilized on plastic microtitration plates (Maxisorp, Nalgen Nunc International, Denmark). The plate was then saturated with 5% skimmed milk in PBS buffer pH 7.4. Incubation with increasing amounts of calpain 1 were performed in 50 mM Tris/HCl buffer pH 7.5, 1mM DTT, 0.6 µM E64, 4mM EGTA, and 100 mM NaCl containing either 500 µM calcium free or no calcium free. Binding assays were monitored at 492 nm using peroxidase-labelled

anti rabbit IgG antibodies (1:2000). Absorbance values were plotted after subtraction of non specific absorption based upon wells saturated with skimmed milk alone.

Apparent dissociation constant (Kd) determination from ELISA and fluorospectroscopy assays were performed as previously described (Raynaud et al., 2003). For sigmoidal response of the measured parameter, data were fit to the one-, two- or three-site models of the non-linear Hill equation depicted below for calcium titration of titin fragments.

### ***Calcium titration of the recombinant titin fragments***

To avoid calcium contamination, all buffers were prepared with deionized water and previously run three times through a Chelex-100 column (1x8 cm) for 1 h each at a low rate of 0.3 ml/min, according to the cleaning procedure reported for aluminium contamination of aqueous solution (Mitrovic et al., 1998). All subsequent experiments were carried out in 50 mM Tris-HCl buffer pH 7.5 containing 100 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol (DTT) and 4 mM EGTA (buffer A). Similarly, buffer A was also run three times through the Chelex-100 column. After Chelex-100 treatment of buffer A, no calcium was detected with Quin-2 (Linse, 2002). Its concentration in the buffer was therefore assumed to be in the nM range as compared to the control for which the calcium concentration was similarly estimated to be in the  $\mu$ M range. The free calcium concentration was then calculated from the contaminating calcium (1 nM), plus the amount of calcium added, using the computer Biosoft Eqcalwin program from Mike Haygall (Biosoft Company, London, UK) with the following logarithmic association constants for metals and H<sup>+</sup> to EGTA: H<sup>+</sup> to EGTA<sup>4-</sup>, 9.53; H<sup>+</sup> to HEGTA<sup>3-</sup>, 8.88; H<sup>+</sup> to H<sub>2</sub>EGTA<sup>2-</sup>, 2.65; H<sup>+</sup> to H<sub>3</sub>EGTA<sup>1-</sup>, 2.00; Ca<sup>2+</sup> to EGTA<sup>4-</sup>, 11.0; Ca<sup>2+</sup> to HEGTA<sup>3-</sup>, 5.33. Using a Roebling automatic micro-osmometer (Bioblock, Illkirch, France), the osmotic pressure of buffer A was estimated to be 292 mOsm, a value corresponding to physiological conditions.

The titin recombinant fragments (250  $\mu$ g/ml) were incubated overnight at 4°C, under mild continuous stirring, with a few mg of Chelex-100 resin pre-hydrated in buffer A. The solid phase was sedimented by centrifugation at 1000xg for 5 min and the polypeptide recovered in the supernatant used for calcium titration. Calcium titration of each recombinant titin fragment was carried out as described previously by Johnson and Tikunova (2002). Increasing amounts of a 2 M calcium stock solution in buffer A were added to each recombinant fragment (1  $\mu$ M) and changes in the intrinsic tryptophan fluorescence recorded using a Perkin Elmer LS50 spectrofluorometer ( $\lambda_{Exc}$  305 nm,  $\lambda_{Em}$  358 nm). Calibration of the free calcium concentration was carried out by titration of Quin-2 (1  $\mu$ M in buffer A) using excitation and emission wavelengths of 330 and 495 nm, respectively. The fluorescence data were fit to the one-, two- or three-site models of the non-linear Hill equation:

$$y = y_{max1} / (1 + 10^{(n_1 * (Kd_1 - pCa)})} + y_{max2} / (1 + 10^{(n_2 * (Kd_2 - pCa)})} + y_{max3} / (1 + 10^{(n_3 * (Kd_3 - pCa)})}$$

where y = normalized fractional maximal fluorescence y<sub>max</sub>; y<sub>max</sub> = maximal percentage enhancement observed in that phase of the titration; n = Hill coefficient; Kd = free Ca<sup>2+</sup> concentration producing half-maximal enhancement in the indicated phase of titration; pCa = logarithm of the free Ca<sup>2+</sup> concentration producing y% of maximal enhancement. The curves were fit with a least squares non-linear regression (Microsoft Excel Solver, 1997).

### ***Identity of the calcium induced oligomers of the I2-I6 titin fragment***

The nature of the calcium induced I2-I6 aggregates was determined by gel filtration of a protein sample preincubated with defined calcium concentrations. After overnight treatment of the Z9-I1 recombinant fragment with few mg of the Chelex-100 resin in 50 mM Tris-HCl buffer pH 7.5 containing 100 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol (DTT) and 4 mM EGTA (buffer A), the resin was sedimented by centrifugation at 500g for 5 min and the supernatant collected. Calcium concentration in the I2-I6 fragment solution was adjusted to the desired value by addition of an aliquot of a 2M calcium stock solution in buffer A and incubated at room temperature for 30 min under gentle stirring. A sample of each mixture (250  $\mu$ l) was then loaded on a Superose 12 HR 10/30 column previously equilibrated in buffer A. Proteins were eluted at a flow rate of 0.3 ml/min and fractions of 0.3 ml collected. Calibration

of the column was performed using ferritin (418 kDa), catalase (232 kDa), aldolase (158 kDa), bovine serum albumin (BSA; 67 kDa) and bovine alpha-lactoglobulin (30 kDa).

### ***Affinity chromatography detection of the calpain-titin complex on a Ni-Sepharose column***

Experiments were performed at room temperature using 25 µg Calpain 1 mixed with 10µg of I2-I6 in binding buffer without EGTA. The presence of EGTA could indeed strip nickel ion from the chelating group coupled to agarose. After an incubation of 60 min at room temperature of calpain 1 with the I2-I6 fragment, 50µl of a Ni-Sepharose suspension (dynamic binding capacity 40µg His- tagged protein /µl medium) (Amersham Biosciences) were added and the mixture kept at room temperature for 60 min before sedimentation of the gel by centrifugation at 500g for 5 min. The pelleted gel was washed three times with 4 volumes of the incubation buffer and gently mixed for 5 min. Bound proteins were eluted from the gel by addition of 2 volumes of buffer A containing 250 mM imidazole. The medium was sedimented by centrifugation and the supernatant collected. The elution step was repeated 3 times and each supernatant collected was saved for SDS PAGE and immunoblotting analysis.

### ***Protein determination***

Protein concentrations were measured by using the Bradford's method (Bio-Rad protein assay) with rabbit immunoglobulin as the standard (Bradford, 1976).

## **RESULTS**

### ***Expression and purification of the recombinant titin fragments***

For cloning of the I2-I6 fragment, primers were defined according to the sequence of each domain provided in the I-band genomic sequence of the whole titin gene (web site: <http://www.embl-heidelberg.de/ExternalInfo/Titin/genomic/I-Band.html>). Cloning of the titin region comprising exons 29 to 32 encoding domains I2 to I6 was carried out using primers 1 ((forward primer 5'-CACCATGCCAAGCAATTGATCACTTTCACAC-3') and 2 (reverse primer 5'-CTTCAACTTTGAGTTTGGCAGATGTTTTGGAGG-3'). The cloned cDNA was sequenced, translated to protein and the protein sequence analysed for the occurrence of all Ig-like domains. All domains were well identified according to the sequences available in the Swiss-Prot database (Features of ID Q8WZ42) except the C-terminal end of the polypeptide comprising the last 89 amino acids. From the different analysis performed, we concluded that this error resulted from the identification of the linker between I5 and I6 as an Ig-domain designed I6 (for more details, see the supplemental data provided with this paper).

All recombinant fragments were expressed and purified by chromatography on a Ni chelating Sepharose column as described in the experimental section. Purified fragments appeared homogenous as assessed by SDS-gel electrophoresis (Figure 2). The molecular masses determined by SDS-PAGE under reducing conditions were about 60 kDa for the I2-I6 fragment and 23, 22 and 30 kDa for tandems I2-I3, I3-I4 and I5-I6, respectively.

### ***Calcium titration of the titin I2-I6 recombinant fragment and Ca<sup>++</sup> induced polymerisation***

Previous findings strongly suggested that calpain 1 binds to the N1 line region of titin in a calcium dependent manner (Raynaud et al., 2005). To assess whether calcium effect occurs through its binding to either calpain 1 or titin or both, calcium titration of the I2-I6 titin fragment was carried out by measuring changes in intrinsic tryptophan fuorescence as previously described (Coulis et al., 2004).

Using Ca<sup>++</sup> concentrations ranging from 10<sup>-11</sup> to 0.1 M, calcium titration of the I2-I6 titin recombinant fragment provided a biphasic curve for calcium binding. The first half-maximal binding was observed between Ca<sup>++</sup> concentrations of about 10<sup>-7</sup> and 10<sup>-6</sup> M followed by a plateau between 10<sup>-6</sup> and 10<sup>-4</sup> M and a second half-maximal binding between 10<sup>-4</sup> M and 0.1 M (Figure 3).

The fluorescence data fitted well to the two-site models of the nonlinear Hill equation providing two  $K_d$  values of  $1.9 \pm 0.09 \cdot 10^{-7}$  M and  $3.3 \pm 0.8 \cdot 10^{-3}$  M (mean values  $\pm$  SD for three independent determination). The estimated Hill coefficient values indicate a significant cooperativity between titin molecules in calcium binding for the first high affinity binding site ( $n=2.3$ ) and no cooperativity for the low affinity binding site. It is worthy to note that the  $K_d$  values of titin for calcium are much lower than that reported for calpains. Calpains indeed were assumed to exhibit  $K_d$  values of approximately 25  $\mu$ M for calpain 1 and 325  $\mu$ M for calpain 2 (Dutt et al., 2002) suggesting that, in physiological conditions, titin will be saturated with calcium much earlier than calpain 1. The present results would suggest either the presence of two different binding sites or a  $\text{Ca}^{++}$  induced ordered oligomeric organisation of titin with higher affinity for this cation as previously observed for the Z9-I1 recombinant titin fragment.

As no arguments to support the first hypothesis were available, only the second hypothesis was tested. Such feature has been reported for the PEVK region of titin which is prone to be more flexible in the presence of calcium (Labeit et al., 2003). The identity of the various polymeric forms was assessed through the  $M_r$  determination of titin mixture incubated with various amounts of calcium corresponding to the major transition points noticed from the titration curve. The  $\text{Ca}^{++}$  concentrations selected were 10 mM,  $1.2 \cdot 10^{-5}$  M,  $1.4 \cdot 10^{-6}$ ,  $5 \cdot 10^{-8}$  M and  $2.4 \cdot 10^{-11}$  M.

According to the data of Figure 4, only three types of I2-I6 organisation including monomers, trimmers and hexamers were found at all calcium levels tested with  $M_r$  of about 60, 180 and 360 kDa as assessed by gel filtration on a Superose 12 column. The four calcium concentrations were chosen according the calcium titration profile of Figure 4 and each of them corresponds to a transition point indicated by arrows. For a given calcium concentration the percentage of each type of I2-I6 organisation was plotted. At very low  $\text{Ca}^{++}$  level ( $2.4 \cdot 10^{-11}$  M), the I2-I6 titin fragment is majoritarily either in a monomeric (46%) or in an hexameric (48%) form. Upon raising the calcium concentration to the first transition point ( $5.0 \cdot 10^{-8}$  M), the major form detected is the trimmer and this is also true for the next calcium concentration, i.e.  $1.4 \cdot 10^{-6}$  M, corresponding the end of this transition. At higher calcium levels, the trimmer decreases significantly and the major forms detected were the hexamer complex and the monomeric form. The trimmer is totally absent at the highest calcium concentration tested (0.01 M). From these findings, it was concluded that, in aqueous phase, calcium governed the spatial organisation of the titin I2-I6 fragment. In addition, it can be stressed that, among the three type of structure observed, titin trimmer exhibited the highest affinity towards calcium.

### ***Does to the I2-I6 titin fragment contain the calpain 1 binding site?***

This was the first question to be addressed before detailed investigation of the interaction process and this was done by affinity chromatography of the complex to Ni-Sepharose gel. The recombinant I2-I6 titin fragment was thus tagged with histidine at its N-terminal end allowing its purification by affinity chromatography on a Ni-Sepharose column. This property was used to test the binding of calpain 1 to I2-I6. If they bind to each other, the complex might be retained on the column and eluted with imidazole as this was done for the elution of the I2-I6 fragment alone. As shown in Figure 5a, when calpain alone was loaded on the column, the whole protein was recovered in the unretained fraction (Figure 5b lanes 1 to 4) and nothing was obtain upon elution with 250 mM imidazole (Figure 5a lane 5) as revealed by western blot with the calpain 1 antibody raised against the heterodimeric protein. By contrast, when a preincubated mixture containing I2-I6 and an excess of calpain 1 was run on the same column, the excess of calpain 1 was recovered in the unretained fraction (Figure 5b, lanes 1 to 4) whereas the I2-I6 bound calpain 1 was eluted with 250 mM imidazole. Interestingly, upon dissociation with 250 mM imidazole of the tagged I2-I6 recombinant fragment preincubated with calpain 1 from the column, we noted the co-elution of both calpain subunits (30 and 80 kDa) as revealed by western blot (Figure 5b, lane 5). This result clearly demonstrates that the calpain heterodimer is not dissociated when bound to titin and stressed that titin binds calpain 1 in its native form. Co-sedimentation (with both anti-hist-tag and anticalpain 1 antibodies) and chemical crosslinking (with the zero-length bifunctional reactant EDC/ NHS) experiments comforted these findings (not shown).

### ***Calpain 1 binding to I2-I6 at different calcium concentrations***

Binding of calpain 1 to the I2-I6 titin fragment in liquid phase was followed by measurement of the changes in the fluorescence ( $\Delta F$ ) of FITC labelled calpain 1 (25  $\mu\text{g/ml}$ ) upon addition of increasing amounts of the titin fragment. The experiment was done in the presence of three different calcium concentrations corresponding to the previously established transition points. All profiles shown in Figure 5 indicate that the plot of  $\Delta F$  versus I2-I6 titin fragment concentration is polyphasic.

At the lowest calcium level (2.4  $10^{-11}$  M), a triphasic increase in the  $\Delta F$  was observed upon addition of increasing levels of the titin fragment. Fluorescence of calpain 1-FITC starts to rise at about 0.5  $\mu\text{g/ml}$  of the I2-I6 fragment up to about 15% of the maximum value. This soft increase was followed by a sharp one up to 65% of the maximum value. A slight decrease in the  $\Delta F$  value of about 10-12% between I2-I6 concentrations of 2 and 3.5  $\mu\text{g/ml}$  was then noticed, a feature observed in all experiments. This limited drop in the fluorescence of the FITC labelled calpain 1 suggests a release of the peptidase concomitantly with a reorganisation of the I2-I6 complex. The  $\Delta F$  values increased again thereafter up to 78% of the maximum value obtained at higher calcium concentrations suggesting that, at low  $\text{Ca}^{++}$  levels, the I2-I6 complex cannot reach its optimum calpain 1 binding capacities. Fitting this curve with the three-site models of the nonlinear Hill equation provided  $K_d$  values of  $18 \pm 2$  nM for the first transition T1,  $33 \pm 4$  nM for the second transition T2 and  $77 \pm 9$  nM for the last transition T3 (mean values  $\pm$  SD for three independent determination), respectively.

When incubation was performed in the presence of 50 nM calcium, binding of calpain 1 to titin starts at higher levels of I2-I6 fragment and two phases can be distinguished. A first rise in  $\Delta F$  occur between 1.5 and 2  $\mu\text{g/ml}$  followed by a plateau between 2 and 3  $\mu\text{g/ml}$  and a sharp increase up to the maximum value (100%) between 3  $\mu\text{g/ml}$  and 4.5  $\mu\text{g/ml}$ . It is worthy to note that the  $\Delta F$  value corresponding to an I2-I6 concentration of 4  $\mu\text{g/ml}$  is often out of the fitted curve, a feature observed in most of our experiments with 50 nM calcium. Dissociation constants determined by fitting the curve with the two-site models of the nonlinear Hill equation were  $29 \pm 4$  nM and  $65 \pm 7$  nM, respectively. It must be emphasized that the plateau between 2 and 3  $\mu\text{g/ml}$  corresponds exactly to the second pseudo-plateau observed previously at a calcium concentration of 2.4  $10^{-11}$  M suggesting that similar events affect the I2-I6 complex at these concentrations. This would also suggest a series of the I2-I6 titin complex reorganisation occurring at defined concentrations of the fragment, an assumption supported by the concomitant appearance of the different phases and the decrease in the corresponding  $\Delta F$  values upon increasing the calcium concentration in the mixture. For example, the  $\Delta F$  value decreased from 78% at the lowest  $\text{Ca}^{++}$  concentration to 5-6% at 50 nM calcium. Similarly, the  $\Delta F$  value increased from 78% to 100% at an I2-I6 concentration of 4.5  $\mu\text{g/ml}$ . In addition, the first phase, between 0.5 and 1  $\mu\text{g/ml}$ , disappeared at 50 nM calcium. Increasing calcium concentration from 50 to about 650 nM (end of this transition) did not change the  $K_d$  value but led to a progressive lowering of the plateau value between 2 and 3  $\mu\text{g/ml}$  of titin and an alignment on the fitting curve of the  $\Delta F$  value at 4  $\mu\text{g/ml}$  (not shown).

For calcium concentrations ranging from 1 to 10 mM, a similar biphasic profile was obtained. The first rise in the  $\Delta F$  to about 3-4 % of the maximum value was noted between I2-I6 titin levels of 1 to 2  $\mu\text{g/ml}$ . This step was followed by a long plateau (2 to 6  $\mu\text{g/ml}$ ) and a sharp increase thereafter above 6  $\mu\text{g/ml}$ . Dissociation constants determined by fitting the curve with the two-site models of the nonlinear Hill equation were  $30 \pm 5$  nM and  $140 \pm 7$  nM, respectively. From these findings it can be stressed that calpain 1 binding to the titin I2-I6 fragment is optimal at 4.5  $\mu\text{g/ml}$  of I2-I6 and a calcium level very likely centred around the first  $K_d$  value of  $1.9 \cdot 10^{-7}$  M previously found upon calcium titration of this titin fragment. Moreover, values of the dissociation constants ( $K_d$ ) summarised in Table 2 indicate that, in the presence of various amount of calcium, transitions always occurred at similar I2-I6 concentrations and shifted towards higher values upon increasing the calcium level in the mixture. The present shift of the  $K_d$  values originated very likely from changes in the polymeric organisation of the titin fragment, an organisation which depends not only upon the calcium level but also upon the titin concentration.

Calpain 1 binding to I2-I6 titin fragment was also investigated using solid phase assays (ELISA). In these assays, calpain 1 binding to coated I2-I6 was carried out in the presence of various amount of calcium ranging from 2.4  $10^{-11}$  M to 10 mM (Table 3). Coating of calpain 1 and addition of increasing amounts of I2-I6 was not successful since the labelling of the titin fragment with the anti-Hist tag

antibody was highly variable. Only the first assay was performed in the present work. For this assay, dissociation constants and maximum absorbance values are depicted in Table 3. According to these data, the different calcium concentrations tested cause only very few changes in the  $K_d$  values which ranged between  $2.1 \cdot 10^{-7}$  and  $3.2 \cdot 10^{-7}$  M. Similarly, the maximum absorbance values ( $A_{492nm}$ ) are only moderately affected by calcium and all ranged between 2.4 to 3.2 Abs-Units. This contrasted with the greater variability in the dissociation constant observed previously in liquid phase assays. One of the major reasons is very likely that, when coated into the well, the protein, i.e. the I2-I6 titin fragment, is subjected to important constraints impairing any structural adaptation/modification of the polymeric or non polymeric forms.

### ***Identification of the Calpain 1 binding site within the I2-I6 titin fragment***

This was achieved by investigation of calpain 1 binding to different recombinant tandem sub-domains of I2-I6 including tandems I2-I3, I3-I4 and I5-I6. The tandem I4-I5 was excluded since, because of its high insolubility, we did not succeed to purify it with a sufficient yield despite the drastic conditions used for its extraction. Note that this comparative study was carried out with no added calcium and an EGTA concentration of 4 mM indicative of a  $Ca^{++}$  level lower than  $2.4 \cdot 10^{-11}$  M.

Study of the interaction was first performed by addition of various amounts of each tandem domains to FITC conjugated calpain 1 and measurement of the changes affecting the fluorescence of the labelled peptidase. As shown in Figure 7 whereas quite no change in the fluorescence was observed upon addition of the tandems I2-I3 and I5-I6, a significant increase in the calpain 1 fluorescence occurred upon addition of increasing amounts of the tandem I3-I4. As the tandem I2-I3 did not affect the calpain 1 fluorescence, it can be concluded that calpain 1 binds to domain I4 with a very low  $K_d$  value of  $89 \pm 1$  nM suggesting an affinity of calpain 1 to the Ig-domain I4 wholly comparable to that observed for the I2-I6 fragment in the absence of calcium and for the last transition T3 ( $K_d= 77$  nM) (Table 2).

Similar results were obtained by solid phase ELISA analysis of the interaction (Figure 8). Addition of various amounts of calpain 1 to the coated titin fragments led to an increase in the absorbance only in the presence of the tandem I3-I4. By contrast, no modification of the absorbance value was noted when tandems I2-I3 or I5-I6 were coated in the wells indicating that these fragments did not bind calpain 1. Calpain 1 tight binding to I3-I4 occurred with a  $K_d$  value similar to that observed in the previous experiment ( $K_d= 98 \pm 2$  nM). These findings confirmed that, within the I2-I6 titin fragment, calpain 1 binds specifically to I4 and did not interact with the other Ig-domains. It must be also emphasized that calpain 1 binding to I4 is as strong as to the longer I2-I6 fragment.

### ***Influence of calcium on calpain 1/I3-I4 interaction.***

We previously showed that calcium is an essential modulator of the titin/calpain 1 interaction. Therefore, the first question arising is to know whether the calcium effect will be similar with that observed for titin fragment I2-I6. As for the I2-I6 fragment, calcium titration of I3-I4 was performed using the intrinsic Trp fluorescence as an index of the conformational changes. As shown in Figure 9, a biphasic change in the intrinsic fluorescence wholly comparable with the I2-I6 fragment was obtained. The curve was fitted with the 2-site models of the Hill equation to determine the dissociation constant for the 2 binding sites. Half-maximal binding was found to occur at pCa values of about -5.8 and -3.5 for the first and second transitions, respectively. These correspond to dissociation constants of  $1.58 \pm 0.05 \cdot 10^{-6}$  for the highest affinity binding transition and  $1.40 \pm 0.07 \cdot 10^{-4}$  for the low affinity binding transition. As compared to the I2-I6 fragment, whereas the highest affinity binding site for I3-I4 showed approximately a 10 fold higher  $K_d$  value ( $K_d=1.9 \cdot 10^{-7}$  for I2-I6), the low affinity binding exhibited approximately a 20 fold lower dissociation constant ( $K_d=3.3 \cdot 10^{-3}$  for I2-I6). The affinity for calcium was therefore higher for I2-I6 at lowest calcium levels while the reverse is observed at higher calcium levels in the mM range. According to the findings obtained by gel filtration for I2-I6, this difference might originate from the nature of the calcium induced complex formed by each fragment and their compactness as well.

Calpain 1/I3-I4 interaction was tested in the absence of calcium and then in the presence of  $12\mu M$  calcium, a concentration corresponding to the middle of the plateau between the two low and high affinity

binding sites (Figure 10). In solid phase assays (ELISA) and in the absence of calcium, addition of increasing calpain 1 led to a rapid saturation of the binding sites with a  $K_d$  value of  $5.8 \pm 0.2 \cdot 10^{-8}$  M. By contrast and although with a lower affinity ( $K_d = 5.1 \pm 0.2 \cdot 10^{-7}$  M), in the presence of  $12 \mu\text{M}$  calcium, the I3-I4 fragment showed a higher propensity to bind calpain 1 since about 5 fold more calpain 1 are bound in these conditions (1.39 versus 0.26 Absorbance Units). It is therefore clear that, as for the I2-I6 titin fragment, the presence of physiological concentration of calcium improved significantly the calpain 1 titin binding capacity even with very short fragment such as I3-I4.

Liquid phase assays confirmed these findings and clearly demonstrate the significantly higher calpain 1 binding capacity of the I3-I4 titin fragment in the presence of calcium as compared to the results obtained in its absence ( $\Delta F$  of 12 versus 56) (Figure 11b). The  $K_d$  values are closely similar to those obtained using the solid phase assay, i.e.  $3.6 \cdot 10^{-8}$  M versus  $5.8 \cdot 10^{-8}$  M in the absence of calcium and  $5.7 \cdot 10^{-7}$  M versus  $5.1 \cdot 10^{-7}$  M in its presence.

## DISCUSSION

Ubiquitous calpains 1 and 2 also called  $\mu$ - and m-calpains with reference to their different calcium requirements are calcium dependent peptidase widely expressed in mammals' tissues (for review see Sorimachi et al., 1997; Goll et al 2003; Suzuki et al. 2004). Despite the large set of investigations on these peptidases, their intracellular localisation in skeletal muscle has long been controversial. Some investigations suggest that calpains are located at the Z-line (Ishiura et al., 1980; Dayton et al., 1981), whereas Yoshimura et al. (1986) reported a predominant intracellular localization of calpain 1 in the I-band region of rat muscle, stressing that this enzyme is not exclusively associated with the Z-line.

A recent ultrastructural investigation revealed that calpain 1 is located at the middle of the I-band and close to the Z-line of freshly prepared skeletal muscle myofibres (Raynaud et al., 2005). Calpain 1 was found to be strongly associated to particular structures of the myofibrils including the N2-line and the N1-line, two regions also known to bind calcium (Yarom and meri, 1971; Vignon et al., 1989). The carrier protein was further shown to be titin but the exact calpain 1 binding domains are not yet identified. The calpain 1/titin interaction was shown to be calcium regulated but the role of calcium in this interaction is still unclear. Both proteins are indeed able to bind calcium. Calpains 1 and 2 exhibited relatively low affinity towards this cation since  $K_d$  values were assumed to be 25 and 325  $\mu\text{M}$ , respectively (Dutt et al., 2002). Regarding titin, several sets of evidence suggested that some region of this giant protein can bind calcium but all studies carried out so far were focused on the PEVK region of titin which was shown to bind this cation with a dissociation constant of about  $9 \cdot 10^{-7}$  M (Tatsumi et al., 2001). We recently showed that the linker between Ig-domains Z9 and I1, a sequence rich in Glu residues, binds quite irreversibly calcium with a dissociation constant of about  $4.9 \cdot 10^{-11}$  M (Coulis et al., 2004). Apart from the N2 and N1 line region, the PEVK rich elastic segment and the Z9-I1 linker segment, we still do not know whether other regions of titin are able to bind calcium. In addition, we have no clear view about the role of calcium in the physiological function of the different titin segments of concern.

In the present work, we addressed therefore two questions. The first was to identify the exact binding sites of calpain 1 in the N1-line region of the titin molecule. The second was to clarify the role of calcium in this interaction since both proteins are able to bind this cation. It was previously shown that one of the calpain 1 binding sites is very likely located at the proximal end of the conserved I-band segment of titin and more precisely between Ig-domains I2 and I6, a titin segment containing the N1 line and identified to be the carrier protein (Raynaud et al., 2005). This region of titin was therefore cloned from a human cDNA bank and expressed in *E. coli*. The purified recombinant fragment was then used for a detailed investigation of the calpain 1/titin interaction and the role of calcium ions in this interaction.

As calcium is the primary effector of the calpain 1/titin interaction we first titrated the I2-I6 titin fragment with calcium and observed two types of site with  $K_d$  values of  $1.9 \cdot 10^{-7}$  M and  $3.3 \cdot 10^{-3}$  M. We further showed that these different sites correspond in fact to various polymeric structure of the titin fragment and that trimmers exhibited the highest affinity for calcium. At the highest calcium concentration tested, i.e. 1 to 10 mM, the recombinant fragment is present under either monomeric or hexameric forms suggesting that these organisations of the titin segment have a significantly lower affinity towards calcium.

The calcium binding constant for the high affinity binding site of this titin fragment was very similar to that of calcium-modulator proteins such as the high affinity binding sites of the skeletal muscle troponin C ( $K_d \approx 2.1 \cdot 10^{-7}$  M) being applicable to the rapid response of the calcium binding sites for oscillation of free calcium ion concentration ranging approximately from  $10^{-8}$  to  $10^{-6}$ - $10^{-5}$  M. During this transition, the titin fragment will be subjected to transient structural changes with a possible transitory conversion of the monomeric/ hexameric forms towards a trimeric form and conversely.

Recent findings suggested that there are six titin molecules per thick filament, a number in good adequation with the three-fold symmetry of thick filaments and the two-fold symmetry of thin filaments (Liversage et al., 2001; Knupp et al., 2002). Emerging from the tips of the thick filaments are stalk-like structures called end-filaments, whose size, location and distinctive 4 nm cross suggest they are an aggregate of a part of the titin molecule striations (Trinick, 1981; Funatsu et al., 1993), but how the titin molecules pack together to form them remains to be determined. From each myosin filament, it was assumed that two pairs of titin strands move out and interact with the actin filaments close to the Z-band (Knupp et al., 2002) suggesting that they are relatively free within the I-band. The two other strands span the I-band to the Z-line where they might interact with actin filaments of opposite polarity from the next half sarcomere (Liversage et al., 2001). For a better efficiency of the titin molecules in controlling passive elasticity of sarcomeres, a strict coordination of the shortening or strengthening of the elastic region of each titin strand would have to be performed with exquisite precision. This could be achieved through a strictly regulated aggregation at defined region of the titin spanning from the A-band to the Z-disk before they interact with actin filaments. Up to date, several calcium binding regions of titin have been identified including the PEVK segment (Tatsumi et al., 2001; Labeit et al., 2003), the N2 line (Yarom and meri, 1971; Vignon et al., 1989; Tatsumi et al., 2001) and the Z9-I1 linking segment (Coulis et al., 2004) with dissociation constant of physiological significance. In most of these titin segment calcium was believed to bind to Glu-rich motifs.

Moreover, binding of calcium to E-rich motifs of the PEVK segment causes reversible aggregation of the titin stands affecting their conformation and the mechanical properties (stiffness) of this titin elastic segment (Labeit et al., 2003). Examination of the titin I2-I6 sequence revealed that there is no concentration of Glu residues as can be observed in other titin segment like the PEVK region, the N2-line region and the Z9-I6 linker. For these tandem Ig-domains the proportion of this residue vary between 5 and 15 % (maximum of 14.9 % in I3 Ig-domain). In some exons, this proportion could be higher than 30% (33% in exon 105). Furthermore Glu residues are not regularly set out again along the sequence. How calcium binds to the Ig-domains is unclear and we can wonder whether the spatial distribution of these residues in the 3D structure of the proteins is not the most important parameter to be considered. In this respect, it is finally essential to keep in mind that calcium is able to cause important changes in the spatial organisation of titin strands. Such studies carried out on the first Ig-domains of the proximal end of titin must be extended to other tandem Ig-domains of the I-Band and test whether this observation can apply to the whole set of Ig-domains of this segment. Calcium regulated aggregation of the titin strands spanning the I-band to the Z-disk at particular points of the structure or all along the I-band segment must be considered. In the contractile system, titin filaments function as entropic molecular spring to centre the thick filaments within the sarcomere to ensure efficient active force generation. Titin also represents a template for the binding of a large set of proteins involved in the energy metabolism like LDH or in the degradation of unfolded proteins like proteasome. Coordination of their behaviour during the contraction-relaxation cycle will therefore be of prime importance for force transmission. Six strands acting together in a coordinate manner will be indeed able to develop much stronger forces than each strand alone.

Interaction of calpain 1 with the I2-I6 titin segment was then investigated in liquid phase assays in the presence of different calcium concentrations selected according to the dissociation constant of calcium binding to this titin fragment. Optimum calpain 1 binding to titin was found to occur at calcium concentration corresponding to the first transition observed upon calcium titration of I2-I6, i.e. approximately  $1.9 \cdot 10^{-7}$  M. At this  $\text{Ca}^{++}$  concentration maximum binding of calpain 1 to titin was observed for a concentration of the fragment of about  $4.5 \mu\text{g/ml}$ , i.e.  $\approx 6 \cdot 10^{-8}$  M. At very low calcium level ( $[\text{Ca}] \leq 2.4 \cdot 10^{-11}$  M) the amount of calpain 1 bound to the titin segment did not exceed 80% of the maximum value achieved in above conditions. The amount of calpain bound in the absence of calcium is therefore relatively important suggesting that even in the absence of calcium, a major part of the total

enzyme present in the cell is under the bound state. The bound calpain 1 might be considered as a reservoir from which the peptidase is delivered according to the requirements of muscle cells. How this peptidase is released from its binding site is still not known but we can wonder whether calcium may play a role in this releasing process.

Finally we attempt to identify, within the I2-I6 fragment, the Ig-domain which binds calpain 1 and whether this interaction is also calcium regulated. Solid (ELISA) and liquid (fluorescence of FITC labelled calpain 1) phase assays using recombinant tandems I2-I3, I3-I4 and I5-I6, clearly showed that, in the absence of calcium ( $[Ca] \leq 2.4 \cdot 10^{-11}$  M), calpain 1 binds undoubtedly to domain I4 of the titin segment with closely related dissociation constant of  $9.8 \pm 0.2 \cdot 10^{-8}$  and  $8.9 \pm 0.1 \cdot 10^{-8}$  M, respectively. These values are wholly comparable to the dissociation constant of  $1.9 \pm 0.09 \cdot 10^{-7}$  M found for the calpain 1/I2-I6 interaction. The I3-I4 fragment was then titrated with calcium and, similarly to the whole titin segment, a biphasic profile was observed with dissociation constant of  $1.58 \pm 0.05 \cdot 10^{-6}$  for the highest affinity binding transition and  $1.40 \pm 0.07 \cdot 10^{-4}$  for the second one. It is worthy to note that the dissociation constant for the highest binding site is about 10 fold higher than that observed for the I2-I6 fragment. The most probable explanation of this difference is very likely that the configuration of the complex formed by the small I3-I4 fragment is less favourable for calcium binding than that obtained with the longer I2-I6 segment. Nevertheless, calpain 1 binding is calcium sensitive and the most affected parameter is not the Kd value but the amount of calpain 1 bound (5 fold more calpain 1 bound in the presence of calcium).

In conclusion we must emphasize the probable essential role of calcium in the spatial organization of the titin I2-I6 fragment a change affecting the amount of bound calpain 1 segments. We might speculate that this observation can apply for the whole titin strand spanning from the A-band to the Z-disk. But this point remains to be tested. The second important output of the present work is that calpain 1 binds to the Ig-domain I4 and this interaction is calcium regulated. But in contrast to previous findings, the calcium concentration needed for this interaction is much lower than that needed for a saturation of the calpain 1 calcium binding sites of highest affinity. In addition, this calcium concentration is of physiological significance. Furthermore, we might wonder whether calcium can be involved in the release process of calpain 1 from its titin binding site. Much remains to be learnt about the inter-relationship between the titin strands in the I-band, the type of link with the thin filament and the regulation of the release of the large set of proteins interacting with this giant protein.

## REFERENCES

- Baghdiguian S, Martin M, Richard I, Pons F, Astier C, Bourg N, Hay RT, Chemaly R, Halaby G, Loiselet J et al. (1999) Calpain 3 deficiency is associated with myonuclear apoptosis and profound perturbation of the IkappaB alpha/NF-kappaB pathway in limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Nat Med* 5, 503–511.
- Benyamin Y (2006). The structural basis of calpain behavior. *FEBS J.* 273, 3413-3414.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248–254.
- Carafoli E & Molinari M (1998) Calpain: a protease in search of a function? *Biochem Biophys Res Commun* 247, 193–203.
- Coulis G, Sentandreu MA, Bleimling N, Gautel M, Benyamin Y & Ouali A (2004). Myofibrillar tightly bound calcium in skeletal muscle fibers: a possible role of this cation in titin strands aggregation. *FEBS Lett* 556, 271–275.
- Dayton WR & Schollmeyer JV (1981) Immunocytochemical localization of a calcium-activated protease in skeletal muscle cells. *Exp Cell Res* 136, 423–433.
- Dutt P, Spriggs CN, Davies PL, Jia Z, Elce JS. (2002). Origins of the difference in Ca<sup>2+</sup> requirement for activation of mu- and m-calpain. *Biochem J.* 367, 263-9.<
- Freiburg A, Trombitas K, Hell W, Cazorla O, Fougerousse F, Centner T, Kolmerer B, Witt C, Beckmann JS, Gregorio CC, Granzier H, Labeit S. (2000). Series of exon-skipping events in the elastic spring region of titin as the structural basis for myofibrillar elastic diversity. *Circ Res.* 86, 1114-21.
- Funatsu, T., Kono, E., Higuchi, H., Kimura, S., Ishiwata, S., Yoshioka, T., Maruyama, K. and Tsukita, S. (1993) *J. Cell Biol.* 120, 711-724.

- Goll D. E. and Geesink G. H. (1995). Measurement of calpain activity in postmortem muscle extracts underestimates levels of  $\mu$ -calpain. In: Proc. 41st Ann. Int. Congr. Meat Sci. and Technol., American Meat Sci. Assoc., Kansas City, MO. pp 547–549.
- Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W & Cong J (2003). The calpain system. *Physiol. Rev.* 83, 731–801.
- Gregorio CC, Granzier H, Sorimachi H, Labeit S. (1999). Muscle assembly: a titanic achievement? *Curr Opin Cell Biol.* 11, 18-25.
- Huang Y. and K.K.W. Wang, (2001) The calpain family in human disease, *Trends Mol. Med.* 7, 355– 362.
- Ishiura S, Sugita H, Nonaka I & Imahori K (1980) Calcium-activated neutral protease. Its localization in the myofibril, especially at the Z-band. *J Biochem (Tokyo)* 87, 343–346.
- Johnson, J.D. and Tikunova, S.B. (2002) in: *Calcium-Binding Protein Protocols, Vol. 2: Methods and Techniques* (Vogel, H.J., Ed.), pp. 89–102, Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Knupp, C., Luther, P.K. and Squire, J.M. (2002) Titin organisation and the 3D architecture of the vertebrate-striated muscle I-band. *J. Mol. Biol.* 322, 731-739.
- Labeit D, Watanabe K, Witt C, Fujita H, Wu Y, Lahmers S, Funck T, Labeit S, Granzier H. (2003). Calcium-dependent molecular spring elements in the giant protein titin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 13716-21.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227, 680–685
- Lebart MC, Benyamin Y. (2006). Calpain involvement in the remodeling of cytoskeletal anchorage complexes. *FEBS J.* 273, 3415-26.
- Linse, S. (2002). Calcium Binding to Proteins Studied via Competition with Chromophoric Chelators. In: *Calcium-Binding Protein Protocols, Vol. 2: Methods and Techniques* (Vogel, H.J., Ed.), pp. 15-24, Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Liversage, A.D., Holmes, D., Knight, P.J., Tskhovrebova, L. and Trinick, J.A. (2001). Titin and the sarcomere symmetry paradox. *J. Mol. Biol.* 305, 401-409.
- Ma H, Fukiage C, Kim YH, Duncan MK, Reed NA, Shih M, Azuma M & Shearer TR (2001) Characterization and expression of calpain 10. A novel ubiquitous calpain with nuclear localization. *J Biol Chem* 276, 28525–28531.
- Maruyama K. (1997). Connectin/titin, giant elastic protein of muscle. *FASEB J.* 11, 341-5.
- Mitrovic, R.L., Pihlar, B. and Simonc, P. (1998) Speciation of trace amounts of aluminium in environmental samples by cation-exchange FPLC-ETAAS. *Analisis* 26, 381-388.
- Raynaud F, Bonnal C, Fernandez E, Bremaud L, Cerutti M, Lebart MC, Roustan C, Ouali A & Benyamin Y. (2003) The calpain 1– $\alpha$ -actinin interaction. Resting complex between the calcium-dependent protease and its target in cytoskeleton. *Eur J Biochem* 270, 4662–4670.
- Raynaud F, Carnac G, Marcilhac A & Benyamin Y (2004) m-Calpain implication in cell cycle during muscle precursor cell activation. *Exp Cell Res* 298, 48–57.
- Raynaud F, Fernandez E, Coulis G, Aubry L, Vignon X, Bleimling N, Gautel M, Benyamin Y, Ouali A. (2005). Calpain 1-titin interactions concentrate calpain 1 in the Z-band edges and in the N2-line region within the skeletal myofibril. *FEBS J.* 272, 2578-90.
- Rudolph R, Lilie H. (1996). In vitro folding of inclusion body proteins. *FASEB J.* 10, 49-56.
- Seckler R, Jaenicke R. (1992). Protein folding and protein refolding. *FASEB J.* 6, 2545-52.
- Sentandreu, M. A., Aubry, L. and Ouali, A. (2003) Purification of bovine cathepsin B: proteomic characterization of the different forms and production of specific antibodies. *Biochem. Cell Biol.* 81, 317–326
- Sorimachi H, Imajoh-Ohmi S, Emori Y, Kawasaki H, Ohno S, Minami Y & Suzuki K (1989) Molecular cloning of a novel mammalian calcium-dependent protease distinct from both m- and  $\mu$ -types. Specific expression of the mRNA in skeletal muscle. *J Biol Chem* 264, 20106–20111.
- Sorimachi H., S. Ishiura, K. Suzuki, (1997). Structure and physiological function of calpains, *Biochem. J.* 328 721–732.
- Suzuki K, Hata S, Kawabata Y, Sorimachi H. (2004). Structure, activation, and biology of calpain. *Diabetes.* 53 Suppl 1:S12-18.
- Tatsumi R, Maeda K, Hattori A, Takahashi K (2001). Calcium binding to an elastic portion of connectin/titin filaments. *J Muscle Res Cell Motil.* 22, 149-62.
- Trinick, J.A. (1981). End-filaments: a new structural element of vertebrate skeletal muscle thick filaments. *J. Mol. Biol.* 151, 309-314.
- Tskhovrebova L & Trinick J (2002) Role of titin in vertebrate striated muscle. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 357, 199–206.
- Vignon X, Beaulaton J & Ouali A (1989). Ultrastructural localization of calcium in post-mortem bovine muscle: a cytochemical and X-ray microanalytical study. *Histochem J* 21, 403–411.

Wang KK (2000) Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci* 23, 20–26.

Yamashima T (2004) Ca<sup>2+</sup>-dependent proteases in ischemic neuronal death; a conserved 'calpain-cathepsin cascade' from nematodes to primates. *Cell Calcium* 36, 285–293.

Yarom R, Meiri U. (1971). N lines in striated muscle: a site of intracellular Ca<sup>2+</sup>. *Nat New Biol.* 234, 254-6.

Yoshimura N, Murachi T, Heath R, Kay J, Jasani B & Newman GR (1986) Immunogold electron-microscopic localisation of calpain I in skeletal muscle of rats. *Cell Tissue Res* 244, 265–270.

## SUPPLEMENTAL DATA

### *Cloning of the I2-I6 titin cDNA*

For this purpose, primers were defined according to the sequence of each domain provided in the I-band genomic sequence of the whole titin gene (web site: <http://www.embl-heidelberg.de/ExternalInfo/Titin/genomic/I-Band.html>). Cloning of the titin region comprising exons 29 to 32 encoding domains I2 to I6 was carried out using primers 1 (forward primer 5'-CACCATGCCAAGCAATTGATCACTTTTCACAC-3') and 2 (reverse primer 5'-CTTCAACTTTGAGTTTGGCAGATGTTTTGGAGG-3'). The cloned cDNA was sequenced, translated to protein and the protein sequence analysed for the occurrence of all Ig-like domains expected using the ScanProsite tool (PRATT program) available on the web site of the ExPASy Proteomics Server (<http://us.expasy.org>). According to the data of Figure 1a the sequence corresponding to the titin I2-I6 contained only four Ig-domains out of the five expected. All domains were well identified according to the sequences available in the Swiss-Prot database (Features of ID Q8WZ42) except the C-terminal end of the polypeptide comprising the last 89 amino acids. This sequence does not exist as an Ig-like domain in the feature aligner of Q8WZ42 corresponding to human titin. We were therefore wondering whether a possible error in the titin domains definition at the Z-I band junction may exist within the schematic diagram of the genomic sequence of the titin gene proposed at the web site mentioned above. To address this question a longer sequence of the protein was similarly analysed with the ScanProsite tool. The selected sequence (AA 1530 to 3030 of the Swiss-Prot titin sequence ID Q8WZ42) spanned approximately the titin region comprising Ig-like domains Z7 to I7. This sequence included the well characterized Z9-I1 domains and their linker which was used as an internal reference.

As depicted in figure 1b, ScanProsite identified 10 Ig-like domains as expected. Their sequences were then compared to the domain sequences provided in the features of ID Q8WZ42 and named accordingly. This 1501 amino acids sequence therefore included domains Z7 to I7 of titin and the C-terminal end of our cDNA which was not identified as an Ig-like domain. From these findings, it was stressed that the C-terminal sequence of 89 amino acids found in our presumed I2-I6 cDNA clone corresponds in fact to the linker sequence between I5 and I6 domains. The sequence of the identified I6 domain (length: 84 AA) is fully identical to that provided for the Ig-like 15 domain (I6) in the features of ID Q8WZ42 and corresponding to AA 2620-2703 in the complete human titin sequence. We therefore invite scientists who use, as we did, the structure and sequences provided in the genomic structure of the titin gene to take into account the modification depicted in figure 1c in which the additional Ig-like domain was suppressed and the next one renumbered I6 instead of I7. The authors of this web site will also be informed of the present statement.



## Tables

<u>Titin Fragments</u>	<b>Forward primer</b>	<b>Reverse primer</b>
I2-I6	5'-CACCATGCCAAGCAATTGATCACTTTCACAC-3'	5'-CTTCAACTTTGAGTTTGGCAGATGTTTGGAGG-3'
I2-I3	5'-CACCATGCCAAGCAATTGATCACTTTCACAC-3'	5'-GTTTCATCTTTAATTACAGGTTGCTTTTTCCCGTCGA -3'
I3-I4	5'-CACCATGCAGTTGTTGAGTTTGTGAAAGAAGCTTC-3'	5'-TATAGACAGAGACACGCCCACTGGTGG-3'
I5-I6	5'-CACCATGGTGTGGACGTGATAACACCTC-3'	5'-CTTCAACTTTGAGTTTGGCAGATGTTTGGAGG-3'

Table 1: Primers used for cloning of the different titin fragments spanning domains I2-I6, I2-I3, I3-I4 and I5-I6

Ca <sup>++</sup> (M)	Kd values for each transition* (nM)		
	2.4 10 <sup>-11</sup>	5 10 <sup>-8</sup>	1 10 <sup>-3</sup>
Transition 1	18 ± 2	ND <sup>1</sup>	ND
Transition 2	33 ± 4	29 ± 4	30 ± 5
Transition 3	77 ± 9	65 ± 7	ND
Transition 4	ND	ND	140 ± 7

(\*) Kd values: Mean ± SD for at least 3 independent experiments; <sup>(2)</sup> ND: not detected.

Table 2: Fluorescent assay of calpain 1/titin interaction: dissociation constants determined in the presence of various amounts of calcium

Ca (M)	2.4 10 <sup>-11</sup>	5 10 <sup>-8</sup>	12 10 <sup>-6</sup>	10 10 <sup>-2</sup>
Kd (µg/ml)	23	30	37	32
Kd (M)	2.1 10 <sup>-7</sup>	2.7 10 <sup>-7</sup>	3.2 10 <sup>-7</sup>	2.9 10 <sup>-7</sup>
A492nm. Maxi	2.45	2.83	3.21	2.95

Table 2: Solid phase assay (ELISA) of calpain 1/titin interaction: dissociation constants and maximum absorbance values determined in the presence of various amounts of calcium

## Legends to figures

Figure 1: Schematic representation of the Z and I-band region of titin (skeletal isoform). Calcium and calpain 1 binding sites and N1-line position are indicated in regard to titin organisation or below.

Figure 2: SDS-PAGE analysis of the purified titin recombinant fragments including I2-I6 (lane 1), I2-I3 (lane 2), I3-I4 (lane 3) and I5-I6 (lane 4). Mr indicates the molecular mass of the markers used (Amersham-Pharmacia low Mr kit).

Figure 3: Calcium titration of the I2-I6 titin fragment using the intrinsic tryptophan fluorescence as the marker of the induced conformational changes. Incubation were carried out in 50 mM Tris-HCl buffer pH 7.5 containing 100 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol (DTT) and 4 mM EGTA. Various amounts of calcium were added to the I2-I6 titin fragment (1  $\mu$ M) and fluorescence measured. The data points were fitted to the two-site models of the non-linear Hill equation and Kd values determined:  $Kd_1=1.9 \pm 0.09 \cdot 10^{-7}$  M;  $Kd_2= 3.3 \pm 0.8 \cdot 10^{-3}$  M.

Figure 4: Identification by gel filtration on a superose 12 column of the different I2-I6 titin oligomers induced by calcium. For each calcium concentration the percentage of each structure are indicated.

Figure 5: Affinity chromatography fractionation of the calpain 1/I2-I6 complex using Ni-Separeose gel. Fractionation was performed in batch. Fifty  $\mu$ l of the gel suspension were added to calpain 1 (25  $\mu$ g/ml) alone (a) and a mixture of calpain 1 (25  $\mu$ g/ml) and I2-I6 titin fragment (10  $\mu$ g/ml) preincubated for 60 min at room temperature (b) in a total volume of 200  $\mu$ l. After 60 min at room temperature, the gel was decanted by centrifugation for 5 min at 500g. The gel was washed three to four times with 2 volumes of the initial buffer and each supernatant was saved and analysed by SDS-PAGE. Bound proteins were then eluted with the same buffer containing 250 mM imidazole. The resin washed again several times with the same buffer, sedimented and the supernatants saved for SDS-PAGE analysis. Lane 1: unretained proteins revealed with the rat calpain 1 antiserum; Lane 2 to 4: washing supernatants; Lane 5: fraction eluted with 250 mM imidazole and pooled altogether.

Figure 6: Interaction of the I2-I6 titin fragment with FITC conjugated calpain 1 as assessed by fluorescent assay. Various amounts of I2-I6 titin fragment were added to calpain 1 (25  $\mu$ g/ml) in 50 mM Tris/HCl buffer pH 7.5 containing 1mM DTT, 4mM EGTA, 0,6 $\mu$ M E64 and 100 mM NaCl and changes in the peptidase fluorescence was recorded. Incubations were carried out in the presence of different concentrations of calcium as indicated. For the calcium concentration noted  $< 0.1$  nM, the residual concentration was estimated to be  $2.4 \cdot 10^{-11}$  M. The data points were fitted to the two- or three-site models of the non-linear Hill equation and Kd values determined (see text for more details and for Kd values).

Figure 7: Interaction of the I2-I6 titin sub-fragments with FITC conjugated calpain 1 as assessed by fluorescent assay. Various amounts of the titin sub-fragment (Ig-tandem I2-I3, I3-I4 and I5-I6) were added to calpain 1 (25  $\mu$ g/ml) in 50 mM Tris/HCl buffer pH 7.5 containing 1mM DTT, 4mM EGTA, 0,6 $\mu$ M E64 and 100 mM NaCl and changes in the peptidase fluorescence was recorded. The sigmoidal curve obtained with the I3-I4 subfragment was fitted to the one-site models of the non-linear Hill equation and the Kd value determined:  $Kd= 89$  nM.

Figure 8: Interaction of the I2-I6 titin sub-fragments with FITC conjugated calpain 1 as assessed by solid phase assay (ELISA). Various amount of calpain 1 were added to coated I2-I3, I3-I4 or I5-I6 titin recombinant fragments (1  $\mu$ g/ml) in 50 mM Tris/HCl buffer pH 7.5, 1mM DTT, 4mM EGTA, and 100 mM NaCl.

Figure 9: Calcium titration of the I3-I4 titin fragment using the intrinsic fluorescence using the intrinsic tryptophan fluorescence as the marker of the induced conformational changes. Incubation were carried out in 50 mM Tris-HCl buffer pH 7.5 containing 100 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol (DTT) and 4 mM EGTA. Various amounts of calcium were added to the titin fragment (1  $\mu$ M) and fluorescence measured.

The data points were fitted to the two-site models of the non-linear Hill equation and Kd values determined:  $Kd_1 = 1.58 \pm 0.05 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ ;  $Kd_2 = 1.40 \pm 0.07 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ .

Figure 10: Influence of calcium on calpain 1/I3-I4 interaction as assessed by ELISA (a) and fluorescent (b) assays in the absence ( $[\text{Ca}] \leq 2.4 \cdot 10^{-11} \text{ M}$ ) or the presence of  $12 \mu\text{M}$  calcium.

## Figures

Figure 1

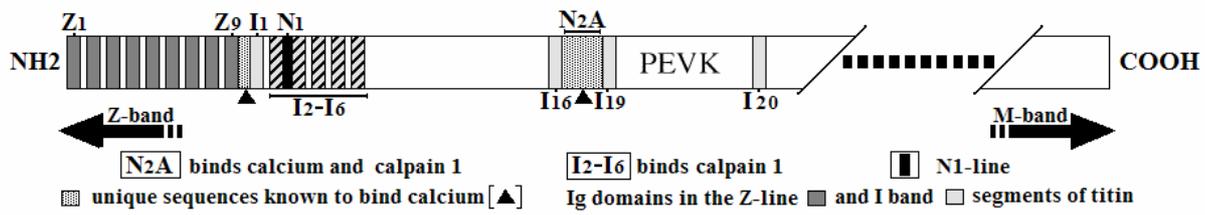


Figure 2

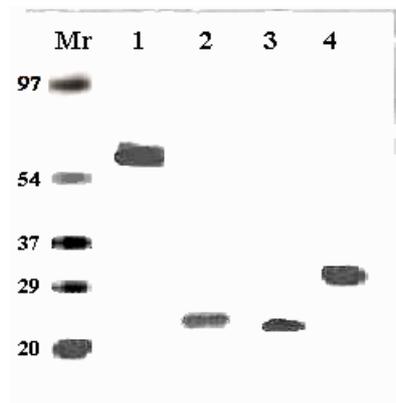


Figure 3

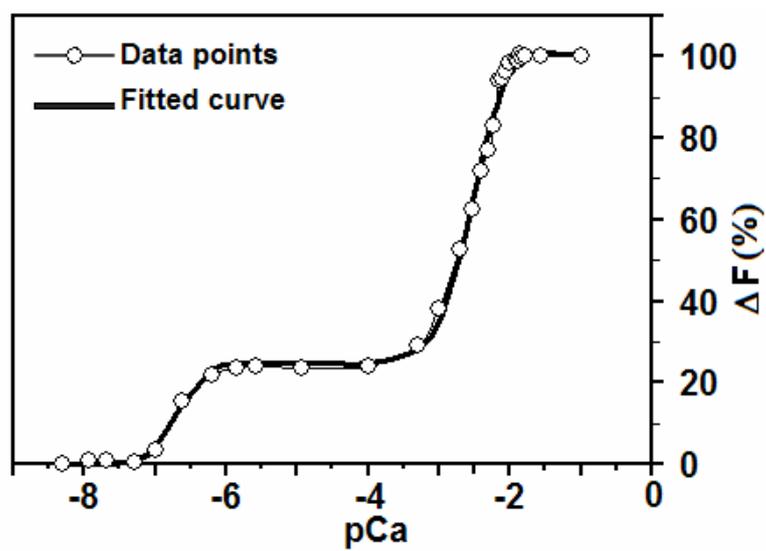


Figure 4

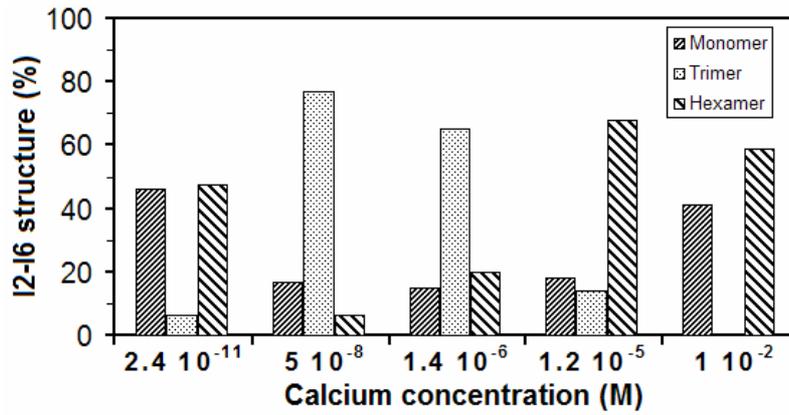


Figure 5

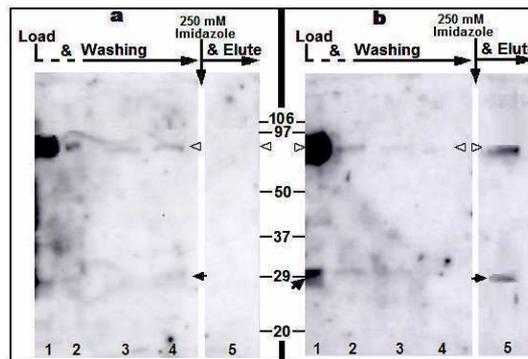


Figure 6

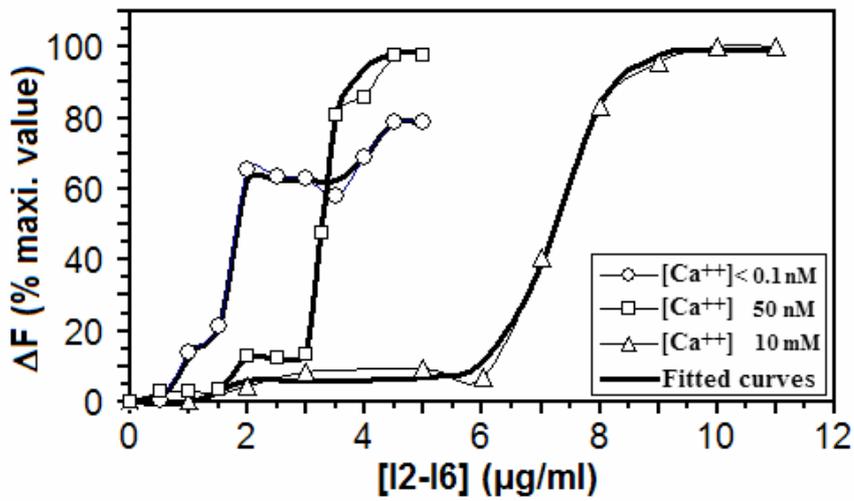


Figure 7

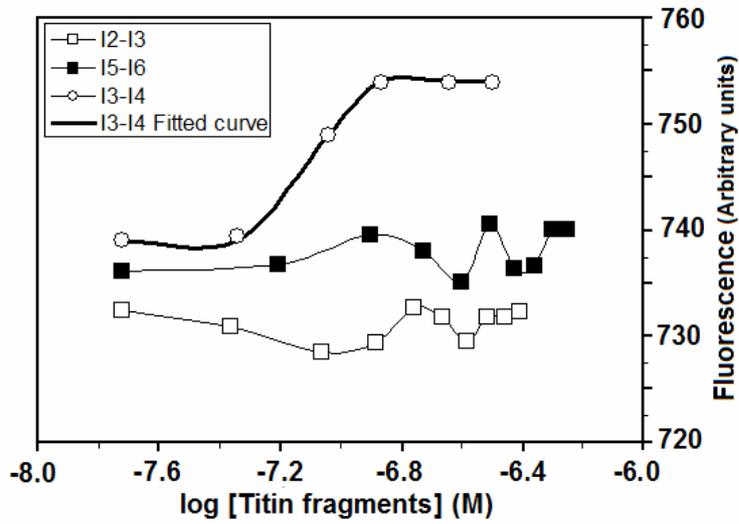


Figure 8

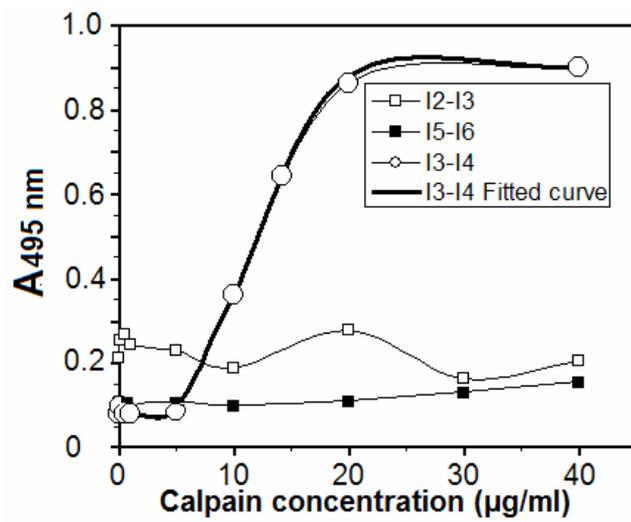


Figure 9

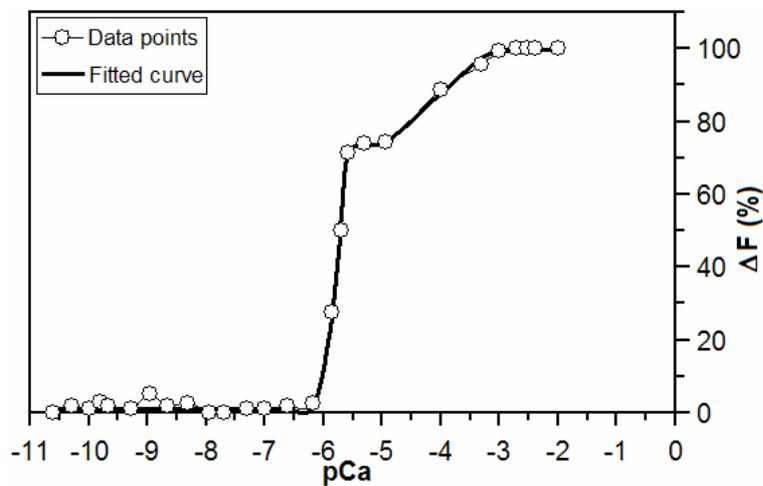
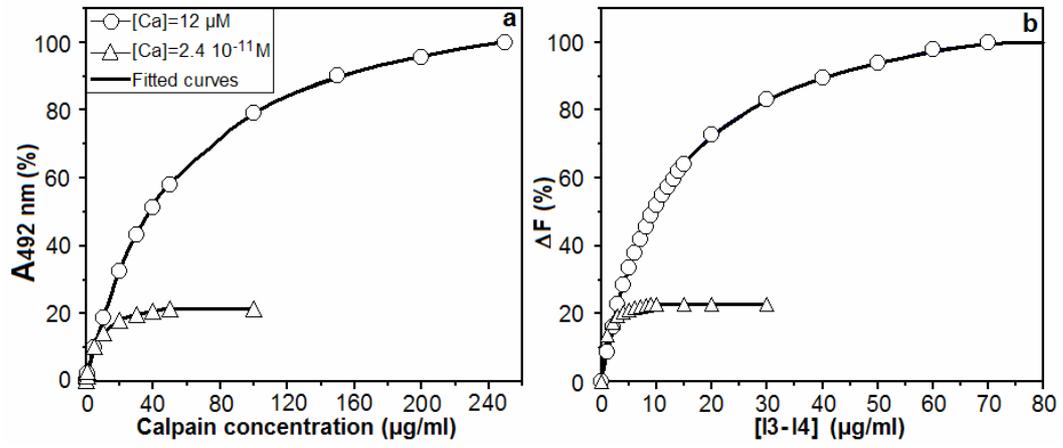


Figure 10





# Calpain 1–titin interactions concentrate calpain 1 in the Z-band edges and in the N2-line region within the skeletal myofibril

Fabrice Raynaud<sup>1</sup>, Eric Fernandez<sup>2</sup>, Gerald Coulis<sup>2</sup>, Laurent Aubry<sup>2</sup>, Xavier Vignon<sup>3</sup>, Nathalie Bleimling<sup>4</sup>, Mathias Gautel<sup>5</sup>, Yves Benyamin<sup>1</sup> and Ahmed Ouali<sup>2</sup>

1 Cell Motility Laboratory, EPHE, UMR-5539, UM2, Montpellier, France

2 Muscle Biochemistry Group, INRA-Theix, Saint Genès Champanelle, France

3 UMR-Developmental Biology and Biotechnology, INRA, Jouy en Josas, France

4 Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie, Abt. Physikalische Biochemie, Dortmund, Germany

5 Muscle Cell Biology, The Randall Centre, New Hunt's House, King's College London, Guy's Campus, London, UK

## Keywords

calcium; calpain; proteolysis; sarcomere; titin

## Correspondence

Y. Benyamin, UMR 5539, CC 07, UM2, Place E. Bataillon, 34 090 Montpellier, France

Fax: +33 4 67144927

Tel: +33 4 67143813

E-mail: benyamin@univ-montp2.fr

(Received 13 January 2005, revised 22 March 2005, accepted 23 March 2005)

doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04683.x

Calpain 1, a ubiquitous calcium-dependent intracellular protease, was recently found in a tight association with myofibrils in skeletal muscle tissue [Delgado EF, Geesink GH, Marchello JA, Goll DE & Koochmariaie M (2001) *J Anim Sci* **79**, 2097–2107]. Our immunofluorescence and immunoelectron microscopy investigations restrain the protease location at the periphery of the Z-band and at the midpoint of the I-band. Furthermore, calpain 1 is found to localize in myofibril fractures, described as proteolysis sites, in postmortem bovine skeletal red muscles, near the calcium deposits located at the N1 and N2 level. This *in situ* localization of calpain 1 is substantiated by binding assays with two titin regions covering the I-band region: a native fragment of 150 kDa (identified by mass spectrometry) that includes the N-terminal Z8–I5 region and the N1-line region of titin, and an 800 kDa fragment external to the N1 line that bears the PEVK/N2 region. These two titin fragments are shown to tightly bind calpain 1 in the presence of CaCl<sub>2</sub> and E64, a calpain inhibitor. In the absence of E64, they are cleaved by calpain 1. We conclude that titin affords binding sites to calpain 1, which concentrates the protease in the regions restrained by the Z-band edge and the N1-line as well as at the N2-line level, two sarcomeric regions where early postmortem proteolysis is detected.

Calpain 1 (microcalpain) and calpain 2 (millicalpain), the best characterized calpains, are known as intracellular calcium-dependent endoproteases and are expressed in different tissues of vertebrates. These ubiquitous cysteine proteases [1] play important roles in a large set of intracellular events [2–5], particularly in the selective proteolysis of factors involved in the cell cycle [6], during apoptosis in association with caspases [7], or in the cleavage of membrane–cytoskeleton complexes during cell motility phases [8]. Their activities are blocked by calpastatins (a specific inhibitor family

largely expressed in the cell) and are regulated at the membrane level by phospholipids, which decrease the calcium requirements of calpains [1]. Calpain 1 (active *in vitro* at 50 μM Ca<sup>2+</sup> ions) and calpain 2 (active *in vitro* at 500 μM Ca<sup>2+</sup> ions) are composed of an 80 kDa and a 30 kDa subunit. The spatial structure of calpain 2 has recently been determined [9] and the organization of the six domains (dI–dIV in the 80 kDa subunit, and dV–dVI in the 30 kDa subunit) has been defined as well as the calcium-binding regions. In particular, it was found that dIV and dVI (calmodulin-like

## Abbreviations

CP1 Ig, anti-calpain 1 Ig; FITC, fluorescein isothiocyanate.

structures) belong to the penta-EF-hand family of proteins, and another EF-hand site was further detected in the dII catalytic domain [10]. Furthermore, a negatively charged loop in dIII also offers  $\text{Ca}^{2+}$ -binding capacity [11], which affords 11 EF-hand sites and one acidic cluster in the whole molecule, corresponding to at least eight effective  $\text{Ca}^{2+}$ -binding sites [12].

In skeletal muscle tissue, calpains 1 and 2 coexist with calpain 3, a monomeric calpain homologous to the 80 kDa calpain subunit [13], and with calpain 10, which is deprived of domain IV [14]. The behaviour of calpain 1 and calpain 2 during muscle growth and development has recently been detailed [1]. Thus, translocation of calpain 2 to nuclei at the G1 stage was observed during myoblast proliferation, as was the transactivation of calpain 2 by myogenic factors, or the regulation of MyoD by calpains [6,15]. The participation of the two proteases in the degradation of the cortical cytoskeleton all along the myoblast fusion process was also explored [16]. Furthermore, the proteolysis of muscle fibers during the early stages of the postmortem process [17], in ischemic pathologies [1] or during muscle wasting [18], are also situations where putative roles of calpains are largely illustrated. In particular, calpain 1 was found in a tight association with myofibrils isolated from at-death muscle, rapidly degrading desmin, nebulin, titin, and troponin T [19]. Within myofibrils, calpain 3 has been found to be associated with titin [20–22], a giant cytoskeletal protein spanning continuously from the Z-line to the M-band of the sarcomeres [23–25]. Two calpain 3-binding sites, located at the C-terminal end of titin (M-line region) and at the N2-line region (a transverse dense structure at the midpoint of I-band) near the PEVK, amino acid region, have been identified by using the two-hybrid technique [20,21]. In contrast to

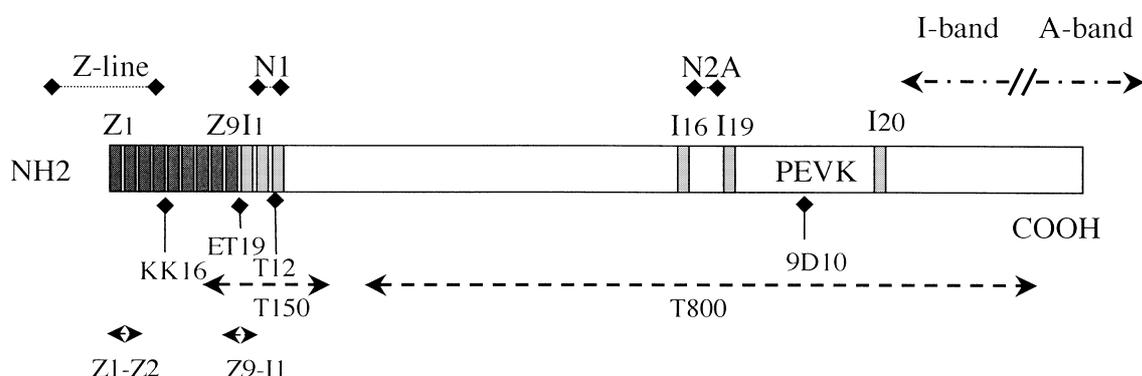
these precise observations, the localization of ubiquitous calpains in the skeletal muscle fiber is still highly controversial. Some investigations suggest that calpains are located at the Z-line [26,27], whereas Yoshimura *et al.* [28] reported a predominant intracellular localization of calpain 1 in the I-band region of rat muscle, stressing that this enzyme is not exclusively associated with the Z-line.

To identify the myofibril compartments where calpain 1 is concentrated, the previous locations were refined by immunofluorescence confocal microscopy and immunoelectron microscopy by using an isoform-specific antibody. Calpain 1 is found mainly within the I-band between the Z-band and the N1-line (a transverse dense structure located 100 nm from the Z-band) and at the N2-line level, on the myofiber fractures lines described in bovine red muscles as postmortem proteolysis sites. Calpain 1 can also be detected at the periphery of cell under the sarcolemma membrane. In a second step of the work, we identified titin as a calpain 1 carrier in the I-band. Titin fragments (Fig. 1), corresponding to the regions where calpain 1 is located, were found to bind calpain 1 strongly in a calcium-dependent manner and were cleaved in the absence of calpain inhibitor.

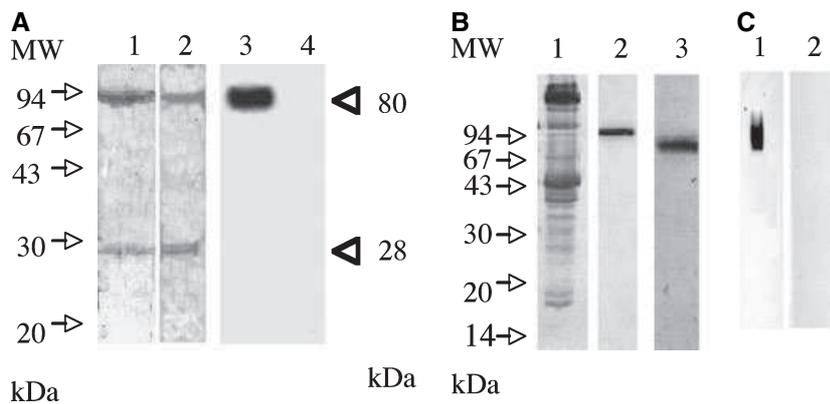
## Results

### Specificity of the anti-(calpain 1) Ig

Western blot analysis of anti-(calpain 1) Ig (CP1 Ig) shows specific labelling of calpain 1 but not of calpain 2 (Fig. 2). In addition, the 30 kDa subunit shared by the two isoforms is not recognized (Fig. 2A). When tested against a crude extract of skeletal muscle (Fig. 2B), CP1 Ig reveals only one band, of 80 kDa,



**Fig. 1.** Schematic representation of the I-band region of titin (skeletal isoform), including the N-terminal extremity. Titin fragments (T150, T800, Z1–Z2, Z9–I1) as the antibody epitopes (KK16, ET19, T12, 9D10) are indicated in regard to titin organization (Z and I domains) and sarcomeric structures (Z, N1 and N2 lines) in the I-band.



**Fig. 2.** Western blot analysis of anti-(calpain 1) Ig (CP1 Ig) specificity. (A) Calpain 1 (lanes 1 and 3) and calpain 2 (lanes 2 and 4) were analysed by SDS/PAGE and stained by silver (lanes 1 and 2) or after western blotting (lanes 3 and 4) by the CP1 Ig. (B) A crude muscle extract was stained by Coomassie blue (lane 1) and assayed with anti-calpain 3 Ig (lane 2) and CP1 Ig (lane 3). (C) Western blot analysis of the specificity of the CP1 Ig towards the native calpain 1 (lane 1) and the native calpain 2 (lane 2).

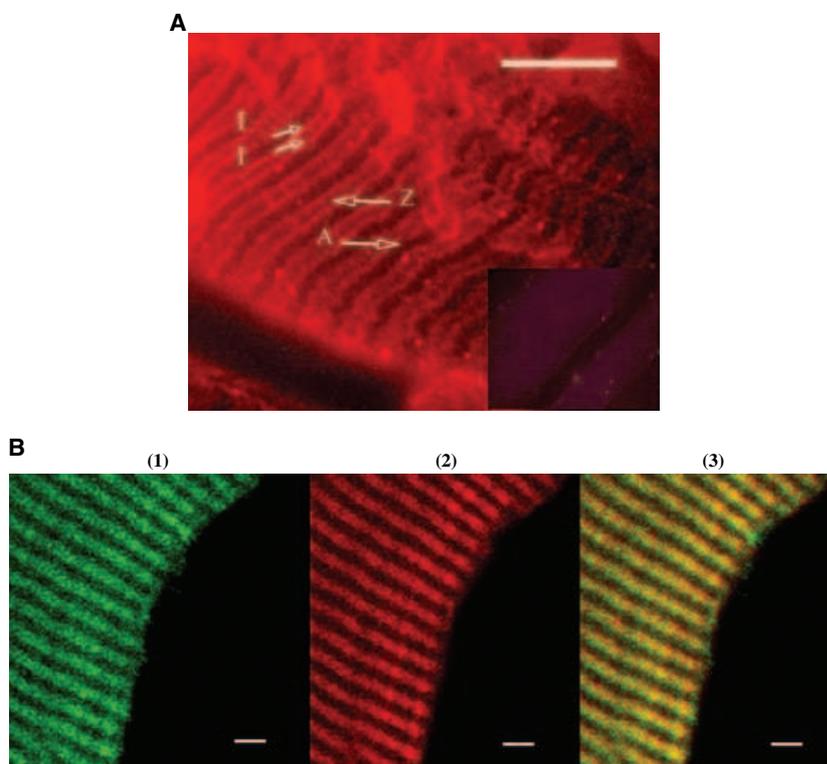
and nothing at the 94 kDa position of calpain 3. We checked further for the ability of CP1 Ig to specifically label calpain 1 under nondenaturing conditions (Fig. 2C). Despite the strong sequential homology of calpain 1 and calpain 2, which could induce a similar folding in the sequence 539–553 (CP1 epitope) and thus generate some antigenic cross-reactivity, the antibody recognizes only the native calpain 1.

It is concluded, from this analysis, that CP1 Ig is highly specific for calpain 1 and does not cross-react with any other skeletal muscle calpain isoform. Moreover, this antibody retains its specificity when tested

under nondenaturing electrophoresis conditions, which is essential for the localization of calpain 1 *in situ*.

### Immunohistochemical localization of calpain 1

Immunostaining of bovine muscle fibers with CP1 Ig led to specific fluorescent labelling of the I-band (Fig. 3A), whereas no other sarcomeric structure, except for a slight and broad fluorescence, was revealed when the primary antibody was omitted (inset). This fluorescent staining is strikingly superposable



**Fig. 3.** Immunohistochemical localization of calpain 1 in bovine Longissimus dorsi and in mouse leg muscle (Vastus lateralis). (A) Indirect immunofluorescent staining of bovine muscle fibers with anti-(calpain 1) Ig (CP1 Ig;  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), as revealed with a rhodamin-labeled secondary anti-rabbit IgG. Inset: control muscle sample treated with the secondary antibody alone. Scale bar represents  $10 \mu\text{m}$ . (B) Immunofluorescent staining of mouse muscle fibres by (1) the rabbit CP1 Ig ( $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) and a fluorescein-labeled secondary antirabbit IgG antibody; (2) the mouse antimyotilin monoclonal antibody (diluted to  $1 : 1000$ ) and a rhodamin-labeled anti-mouse IgG secondary antibody and (3), merged images. Scale bar represents  $2 \mu\text{m}$ . A, A-band; I, I-band; Z, Z-disk.

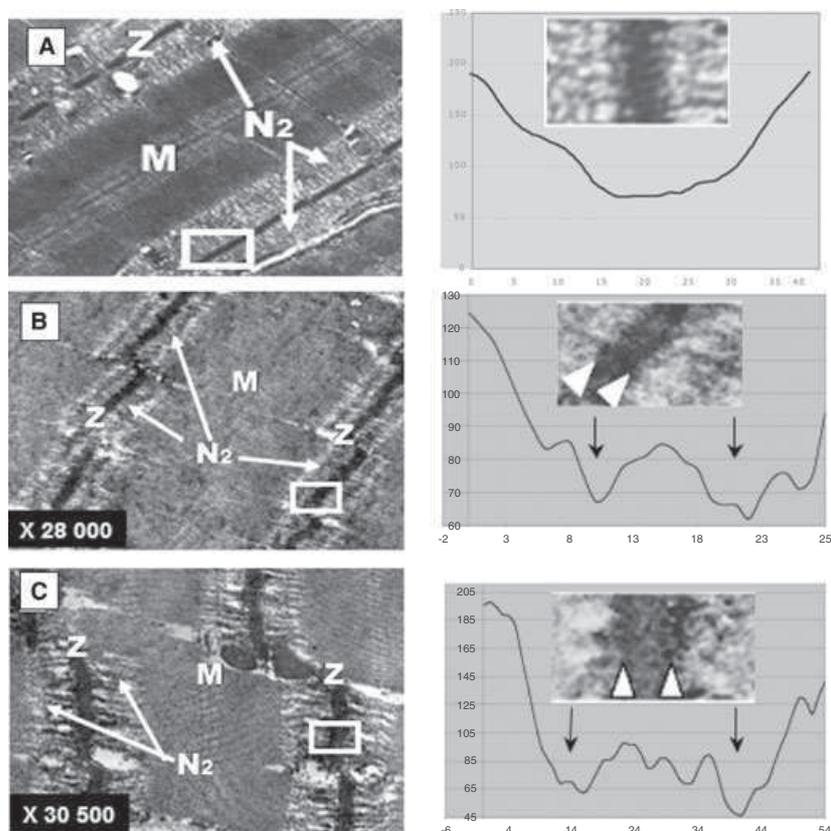
to the calpain 3 staining recently obtained under the same conditions and identified as the I-band [29], in accordance with previous observations [22] and immunoelectron microscopy investigations (A. Ouali and Y. Benyamin, unpublished results). To establish, more clearly, the location of calpain 1 in the I-band, we compared, in mouse skeletal muscle, immunostaining of the protease with that of myotilin (Fig. 3B). The latter is known to decorate Z-disk edges in sarcomeres [30,31]. Calpain 1 staining gives a striated pattern that clearly overlaps myotilin localization.

Calpain 1 location was refined by immunoelectron microscopy with the CP1 Ig and a peroxidase-conjugated secondary antibody by using the pre-embedding technique. When compared to the control sample treated with the secondary antibody alone (Fig. 4A), labelling with the CP1 Ig led to an increase of the density in the center of the I-band at the N2 position and a dark gray line was observed at the Z-line periphery (Fig. 4B). This was also the case when T12 mAb, which labels the N1-line, was used instead of CP1 Ig (Fig. 4C). The observation was confirmed by the density analysis of Z-lines, which showed the highest densities to be at the edges of the structure.

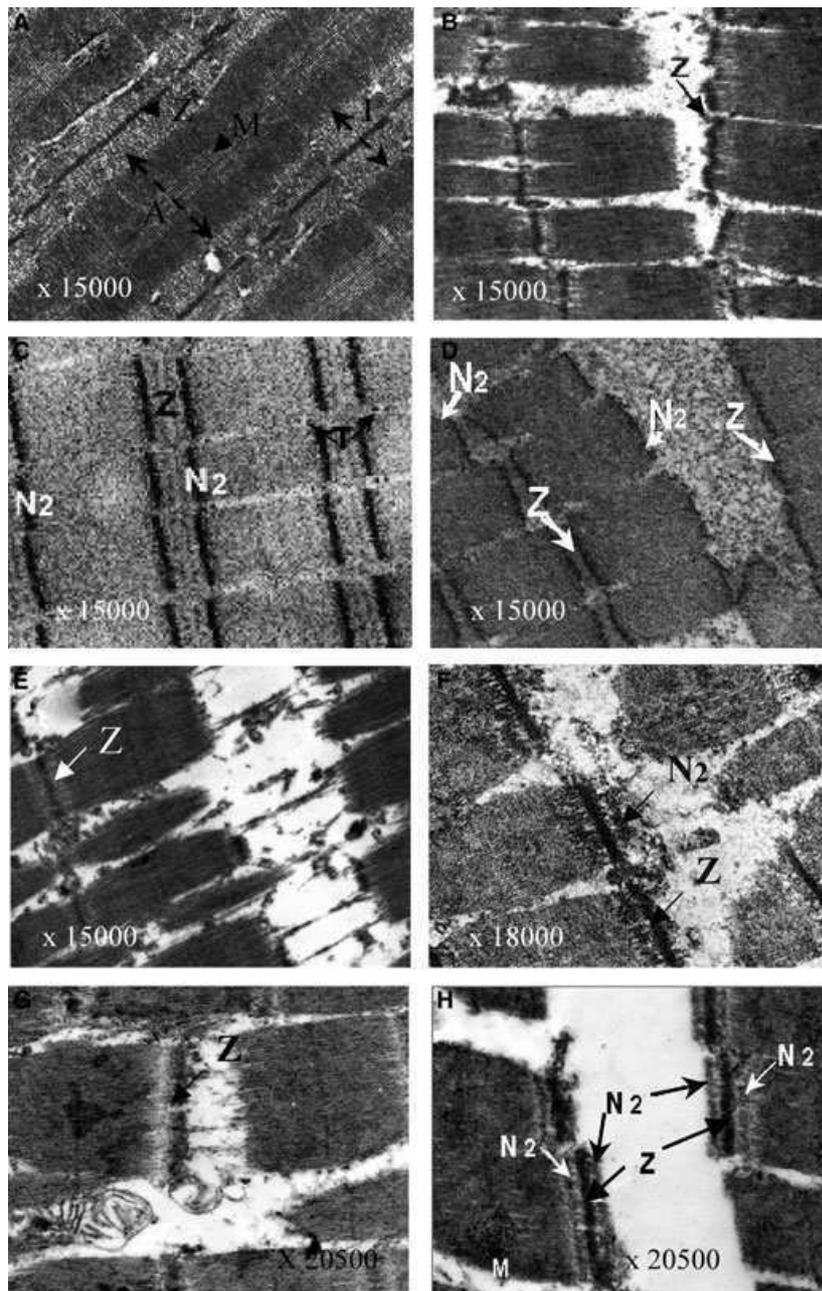
These data pointed out a localization of calpain 1 in bovine skeletal muscle within sarcomeres, essentially defined at the center of the I-band and at the periphery of Z-lines.

### Postmortem cleavages, calcium deposits and calpain 1 localization in the myofibril

It was previously described [32] that in bovine post-mortem red muscle stored for at least 12–14 days at low temperature (0–4 °C), fractures affect several adjacent myofibrils and run transverse to the myofibrils axis within the I-band. The fractures were further located at the N-lines of the myofibrils (Fig. 5A,B) and imputed to the proteolysis and the rigor mortis contraction [33]. On the other hand, the presence of calcium deposits at the N1- and N2-line levels was also described (Fig. 5C,D) by X-ray microanalytical study [33]. As illustrated, we observe that in intact myofibrils, most calcium deposits are located at the N2-line level, whereas two less-intense precipitate lines are present in the vicinity of the Z-line (Fig. 5C). In stored muscle, the transversal fracture line is obviously adjacent to the N2-line calcium precipitates (Fig. 5D). Samples from bovine skeletal muscle stored at 0–4°C



**Fig. 4.** Pre-embedding immunoperoxidase localization of calpain 1 in fresh bovine Longissimus dorsi muscle. (A) Control muscle strips treated with the secondary peroxidase labeled antibody alone. (B) Muscle strips treated with CP1s Ig. (C), Muscle strips treated with T12 Ig. M, M-line; N2, N2-line; Z, Z-line. From each picture, the Z-line was expanded and analysed for density in relation to pixel position by using IMAGEJ software. The highest densities were indicated by arrows.



**Fig. 5.** Calpain 1 and calcium localization in freshly excised and stored bovine Longissimus dorsi muscle. Structural changes (A and B) affecting bovine Longissimus dorsi muscle during storage at 0–4 °C for 14 days (B), as compared to the control sample excised within 1 h postmortem (A). Calcium localization (C and D) in freshly excised muscle (C) and muscle stored as described above (D). Localization of calpain 1 (E–H) with CP1s Ig in muscle stored as described above (F, H) as compared to the control where the primary antibody was omitted (E, G). A, A-band; M, M-band; N1, N1-line; N2, N2-line; T, Triads; Z, Z-band.

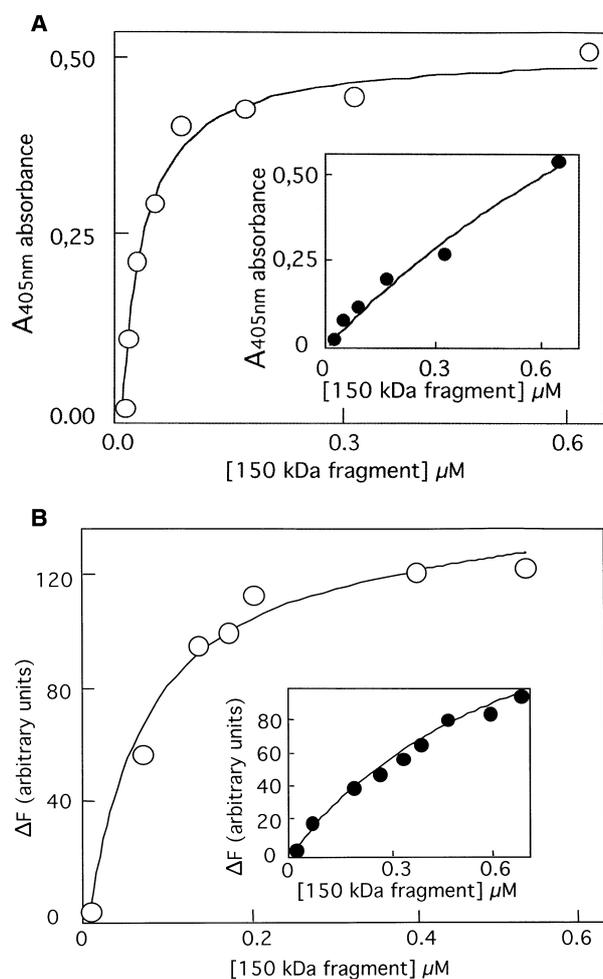
for 14 days were then used to test whether calpain 1 binds at the N2-line position, located approximately at the midpoint between the Z-line and the A–I junction. In comparison with the control, where the primary antibody is omitted (Fig. 5E,G), the treatment of such samples with CP1 Ig results in an increased density of the N2-line, which is adjacent to the fracture line (Fig. 5F,H). In addition, Z-lines appear darker and more clearly delineated.

Thus, according to our observations and those described above, N-line regions, defined as transverse striations of higher density in the I-band, appear to bring together calcium deposits, postmortem proteolytic cleavage sites and the presence of calpain 1. The strong susceptibility of titin to the postmortem Ca-dependent proteolysis [34,35], as well as its propensity to interact with calpain 3, led us to analyze the titin–calpain 1 interactions in the N1- and N2-line regions.

### Calpain 1 binding to the I-band region of titin

Two fragments of 150 kDa (T150) and 800 kDa (T800), issued from titin proteolysis and spanning the I-band region (Fig. 1), were then assayed to test calpain 1 binding and proteolysis, as well as to locate the related sites.

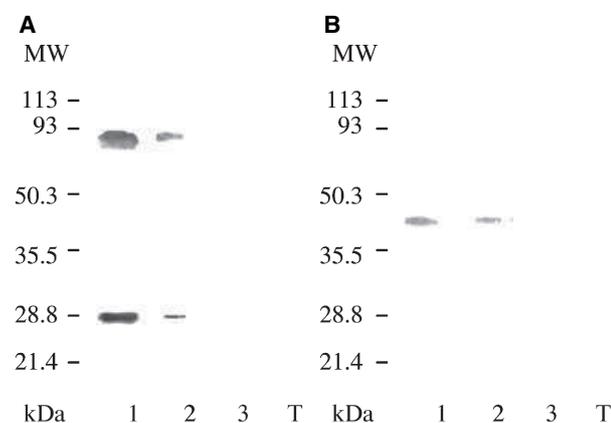
In solid-phase assays (ELISA), in the presence of 1 mM calcium, T150 binding to coated calpain 1 is of high affinity ( $K_d = 30 \pm 6$  nM) (Fig. 6A). In the presence of EGTA, the association is weaker and the



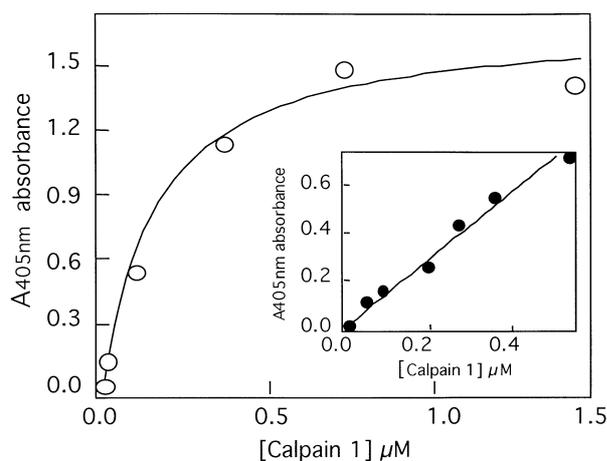
**Fig. 6.** Interaction of calpain 1 T150 and T800 titin fragments. (A) Solid phase immunoassay between coated calpain 1 and T150 in the presence of calcium or in its absence (inset). The binding of increased amounts of T150 in the presence of 1 mM  $\text{CaCl}_2$  or 1 mM EGTA (inset) to immobilized calpain 1 was determined at 405 nm by using ET19 ( $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) as the first antibody and alkaline phosphatase-labeled anti-rabbit IgG as the secondary antibody. (B) Fluorescence decrease ( $\Delta F$ ) of fluorescein labeled calpain 1 ( $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) induced by increasing concentrations of T150 in the presence of 1 mM  $\text{CaCl}_2$  or 1 mM EGTA (inset).

calculated apparent dissociation constant is 100-fold lower ( $K_d = 3 \pm 0.6 \mu\text{M}$ ) (Fig. 6A, inset). Similar findings were obtained in reversed conditions when T150 was coated and calpain 1 added at various concentrations (data not shown). In liquid phase (fluorescent assay), the binding of T150 to fluorescein-labeled calpain 1 confirms the above results (Fig. 6B). When the interaction was conducted in the presence of 1 mM calcium, a significant increase in the affinity constant ( $K_d = 70 \pm 15$  nM) was again observed as compared with the value ( $K_d = 0.3 \pm 0.06 \mu\text{M}$ ) obtained in the presence of EGTA (Fig. 6B, inset).

Labeling of the Z-band periphery by the CP1 Ig (Fig. 4) is consistent with the binding of calpain 1 in a region restrained by the Z-band and the N1-line localized by the T12 Ab reactivity (Fig. 1), which corresponds to 100 nm from the Z-band center [23]. We tested a titin recombinant fragment corresponding to the N-terminal part of the 150 kDa fragment and spanning domains Z9 to I1 of titin (Fig. 1), which are included in this region. In a coimmunoprecipitation assay, the mix of calpain 1/Z9–I1, precipitated either by the Z9a Ab or by the RtC1A Ab, contains calpain and the titin recombinant fragment in the pellet, as revealed by Western blot using RtC1A Ab (Fig. 7A) and RZ9a Ab (Fig. 7B). In an ELISA assay (data not shown), the Z9–I1 fragment binds to the coated



**Fig. 7.** Localization of a calpain 1-binding region within T150. Immunoprecipitation of the calpain 1/Z9–I1 complex was performed with RZ9a Ab or RtC1A Ab and Sepharose–protein G. After SDS/PAGE and electrotransfer of the sedimented proteins, membranes were treated with (A) RtC1A Ab directed against calpain 1 (lane 1) and (B) RZ9a Ab directed against Z9–I1 fragment (lane 1). The two antibodies do not present any reactivity against the titin fragment or calpain 1, respectively (lanes 3). RtC1A Ab reveals calpain 1 in the pellet sedimented by RZ9a Ab (Fig. 7A, lane 2). Similarly RZ9a Ab gives a positive reaction with the pellet sedimented by RtC1A Ab (Fig. 7B, lane 2). In the absence of the primary antibody, neither calpain 1 nor Z9–I1 is recovered in the pellet (lanes T).



**Fig. 8.** Solid phase immunoassay between coated T800 and calpain 1 in the presence of calcium or in its absence (inset). The binding of increased amounts of calpain 1 in the presence of 1 mM  $\text{CaCl}_2$  or 1 mM EGTA (inset) to immobilized T800 was determined at 405 nm using CP1 ( $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) as the first antibody and alkaline phosphatase-labeled antirabbit IgG as the secondary antibody.

calpain 1 with a comparable affinity in the presence ( $K_d = 2.7 \pm 0.5 \mu\text{M}$ ) or absence ( $K_d = 6.2 \pm 1 \mu\text{M}$ ) of calcium. Under the same experimental conditions, the Z1–Z2 N-terminal segment located in the center of the Z-band (Fig. 1) gave a negative result.

The T800–calpain 1 interaction also revealed a marked affinity ( $K_d = 0.1 \pm 0.02 \mu\text{M}$ ) (Fig. 8) and  $40 \mu\text{M}$  (Fig. 8, inset) in the presence of calcium and EGTA, respectively. The poor stability of the 800 kDa fragment and its slow aggregation in the presence of calcium (Y. Benyamin, unpublished results) impeded further analysis of the interaction in the liquid phase. These binding experiments, associated with those

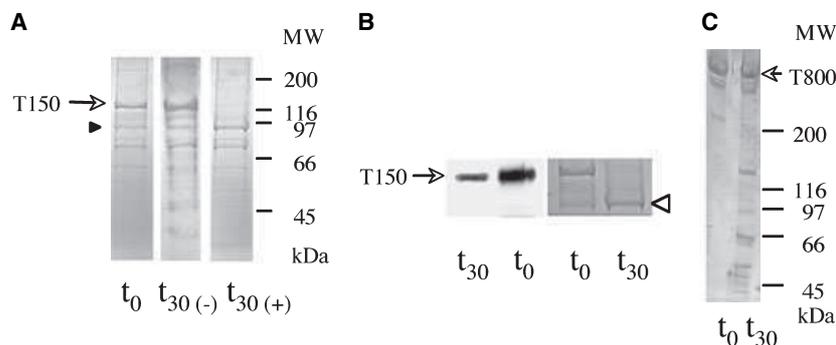
locating calpain 1 at the midpoint of the I-band, provide reasonable evidence to support the interaction of the protease within the 800 kDa fragment.

The binding interaction of calpain 1 with T150 and T800 was further checked by using titin fragments as substrates to calpain proteolysis. Cleavage patterns (Fig. 9) show that T150 is quickly and totally cleaved in a 90 kDa and then in a 75 kDa fragment (Fig. 9A), in contrast to T800, which is partially digested in several fragments (Fig. 9C). This limited proteolysis is probably related to the aggregation of T800 as a result of the presence of calcium in the mixture. The molecular weight of the T150 primary cleavage product (90 kDa), and its negative reaction with the polyclonal antibody directed against the Z9–I1 recombinant fragment (333 residues), indicate (Fig. 9A,B) that the cleavage site is located in the N-terminal region of T150 (130 kDa) near the I1–I2 junction.

## Discussion

In this work, we have addressed the question of the molecular interaction support of the calpain 1 location within the I-band by using both ultrastructural and biochemical approaches. The prerequisite for such a cellular localization was the strict selectivity of our antibody directed against calpain 1, which targets a specific sequence within domain IV at the junction with domain III. These antibodies ( $K_d$  below the nm range) recognized both the unfolded and the native calpain 1, as a result of the accessibility and the hydrophilic helical content of the epitope [9].

The localization of calpain 1 in the periphery of the Z-line is based on its colocalization with myotilin, an alpha-actinin, gamma-filamin binding protein found in



**Fig. 9.** Proteolysis of titin fragments by calpain 1. (A) T150 was submitted to calpain 1 cleavage, and aliquots taken after calcium addition ( $T_0$ ) and after 30 min of incubation in the absence [ $T_{30(-)}$ ] or in the presence [ $T_{30(+)}$ ] of calpain before SDS/PAGE analysis and Coomassie blue staining. T150 (arrow) and its main cleavage product (arrowhead), as well as molecular mass markers (MW) are indicated. (B) T150 and the main cleavage product (90 kDa) are revealed by western blotting using RZ9a Ab. (C) T800 (arrow) was submitted to calpain 1 cleavage and analysed by SDS/PAGE as described in (A).

the Z-band edges [30,31]. After analysis with immunoelectron microscopy coupled to peroxidase labelling, density increasing of the Z-line, in particular at the edges of the structure, confirms the immunofluorescent staining. On the other hand, labelling of the Z-band region by CP1 Ig is comparable to the pattern obtained with T12 mAb, which specifically labeled the N1 line [23] at 100 nm from the Z-line center. So, taking into account the Z-band thickness in the bovine Longissimus dorsi red muscle, as well as the limited resolution of immunoperoxidase labelling, we conclude that calpain 1 is situated between the Z-line and the N1 line. Furthermore, we detected another location of calpain 1 at the midpoint of the I-band, in accordance with previous electron microscopy data [28] showing the presence of calpain in the N2-line region. This observation is consistent with the immunofluorescent labelling of the whole I-band by CP1 Ig (Fig. 3A) and the identical pattern obtained for calpain 3 [29], situated near the Z-band and the N2-line [22]. Hence, besides the Z–N1 region, the N2-line sector might constitute another binding region for calpain 1 in the I-band.

The analysis of postmortem bovine skeletal muscle, presenting transversal fractures at the N2-line level, has shown the localization of both calcium and calpain 1 adjacent to the fracture line. These myofibril breaks were analyzed as a consequence of the proteolytic actions at the N2 level and the rigor mortis contraction [36]. These myofibrillar cleavages were described to affect, in particular, the high molecular weight proteins titin and nebulin, which stabilize thin filaments, and to resolve the tension consecutive to the rigor mortis contraction [19,37]. For years, and although its physiological function remains still unclear, it was acknowledged that, irrespective of the muscle type, calcium could bind tightly to the N2 and N1 lines [38]. Consequently, the colocalization of calpain 1 and calpain 3 at N1- and N2-line levels, the postmortem fractures at the N2-line level, as well as the implication of titin in the binding to calpain 3 [20] and calcium [39], have directed our investigations towards titin–calpain 1 interactions.

The binding of calpain 1 to the N-terminal region of titin was investigated *in vitro* by using two distinct titin fragments: firstly, a native purified fragment of 1200 residues (T150), containing at least the Z8–I5 domains and which includes the N1-line related region; and secondly a recombinant fragment (Z9–I1) located between the Z-line and the N1-line (Fig. 1). Calpain 1 is shown to interact strongly with T150 in a calcium-dependent manner ( $K_d = 30$  nM). Replacement of EGTA by calcium decreases the dissociation constant by 10–100-fold, depending on the technique used for affinity determination (solid vs. aqueous phase). The presence

of a calpain 1-binding region in the N-terminal part of the T150 fragment is in accordance with our immunocytological locations. Lastly, proteolysis of T150 by calpain 1 allowed us to locate the cleavage site within the I1–I3 domains, which agrees with the proximity of a calpain 1-binding region in Z9–I1. A similar topological situation has already been observed with smooth muscle alpha-actinin [40].

The interaction of calpain 1 with the other titin fragment (T800) was evidenced by using a solid-phase assay to avoid fragment aggregation in the presence of calcium. This fragment, which contains the PEVK and N2-line regions of titin, as assessed by MALDI-MS, tightly binds calpain 1 in the presence of calcium. Immunoelectron microscopy patterns performed with CP1 Ig illustrate the interaction by the presence of a dense line at the midpoint of the I-band. This interaction is also in accordance with the proteolysis of T800 by calpain 1.

The direct interaction of calpain 1 with two titin regions, implied in calcium binding [39,41], questions the ability of the protease to specifically recognize its targets [40]. Sequential alignments and statistical analysis of calpain substrates revealed that several include PEST motifs [42,43], calmodulin-binding domains [44] or EF-hand motifs [40]. Analysis of the titin I-band sequence, by using a PEST sequence research program (EMBNET Austria server), gave high scores, in particular in the PEVK region (data not shown). These PEST sequences, which include negatively charged clusters affording  $\text{Ca}^{2+}$  avidity [40,41], are believed to be putative intramolecular signals for rapid proteolytic degradation [43]. They were found in IkappaBalpha, a calpain-binding protein and a substrate [45]. Thus, these data reinforced the observations of the high sensitivity of titin to degradation, in a calcium-dependent manner, in the early steps of the postmortem stage [34,35], giving two major polypeptides of 1200 kDa and 2400 kDa with a cleavage site located in the PEVK region at the N2-line proximity [46,47]. Thus, according to these and previous results [20,21], titin appears to be a calpain carrier that concentrates calpain 1 and 3 in the N1- and N2-line region. The presence of calpain 1 in the vicinity of these transverse structures can be explained in the muscle physiological context. Thus, the recent localization of proteasome 20S as a myofibrillar attached particle [48] needs, for muscle protein breakdown, initial steps of myofibrillar disassembly starting by the destruction of Z lines [49] and cleavages in the PEVK and M-line region. Calpain 1 and calpain 3, located in these places, are good candidates for this role in the myofibril renewal function. In addition, mounting evidence indicates that titin interacts with multiple signaling proteins in Z-line and

N2A/N2B segments [50,51], which may be involved in sensing stress signals (i.e. an activation and translocation of calpain 1 or calpain 3) and linking these to muscle gene regulation [5,6,15].

## Experimental procedures

### Antibodies

Rabbit CP1 Ig was obtained by injection of the peptide, corresponding to residues 539–553 in domain IV of the human calpain 1 large subunit, into rabbit [40]. A polyclonal antibody (RtC1A Ig), directed against the native heterodimeric calpain 1, was induced in the rat.

Rabbit polyclonal anti-titin Ig (KK16 Ig and ET19 Ig) was directed [52] against the sequences of the human cardiac titin (TrEMBL entry name: Q10466) corresponding (Fig. 1) to residues 1169–1185 (sequence located in the Z4–Z5 junction) and residues 1983–2000 (sequence located in the Z9–I1 insertion), respectively. Their cross-reactivity with the rabbit skeletal muscle titin, previously described [52], is in accordance with the rabbit soleus muscle titin N-terminal sequence (TrEMBL entry name: O97791). A rabbit polyclonal antibody was raised against the recombinant Z9–I1 fragment (RZ9a Ig) of human cardiac titin expressed in *Escherichia coli* [41].

mAbs directed against titin, T12 from Boehringer and 9D10 from the Hybridoma Bank, University of Iowa (Iowa City, IA, USA), label I2–I3 domains at the N1-line level [23,53] and the titin PEVK segment close to the N2A epitope [54], respectively (Fig. 1). mAb directed against myotilin was purchased from Novocastra.

All the polyclonal antibodies were purified by affinity, as previously described [52]. Goat anti-rabbit, anti-rat and anti-mouse IgG or IgM, conjugated with alkaline phosphatase (diluted to 1 : 2000), fluorescein or rhodamine (diluted to 1 : 200), were from Tebu (Le Perray en Yvelines, France). Goat anti-rabbit IgG, labeled with peroxidase (diluted to 1 : 100), was from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France).

### Protein and protein fragment preparation

Bovine calpain 1 was purified from bovine sternomandibularis muscle [55] and porcine calpain 1 was purchased from Calbiochem (CN Biosciences, Nottingham, UK). The titin fragments of 150 kDa (T150) and 800 kDa (T800) (SDS/PAGE molecular mass values) were purified from rabbit muscle myofibrils treated with *Staphylococcus aureus* V8 protease [52,56]. They were recently characterized by Maldi-Tof MS [57,58], using the human skeletal muscle titin sequence (NCBI data library, accession no. gi17066105). T150 contains  $\approx$ 1200 residues, encompasses the Z8–I5 domains (Fig. 1) and gives a positive reaction with the T12 Ab, a specific marker of the N1 line [23]. Its

extreme borders are estimated at residue 1300 (lower value) in the Z5 domain after the KK16 epitope (negative reaction of T150 with the KK16 Ab) and at residue 3180 (upper value) in the I13 domain (calculated from the ET19 epitope). T800 could contain  $\approx$ 7200 residues and 22 peptides were found to be located within residues 4670 and 9070 in the I-band region of the muscle sarcomere. It encompasses the so-called PEVK domain (segment 5618–7792), as also substantiated by its positive reaction with the 9D10 Ab. We estimated the extreme borders of T800 to be located at residue 1870 (lower value) and residue 11 500 (higher value). Its negative reaction with the T12 Ab localizes, in fact, the lower border after the segment 2350–2400 (I2–I3) where the T12 epitope was found [53]. The recombinant titin fragment containing the Z9–I1 domains (sequence 1840–2173 in the titin cardiac sequence) was expressed in *E. coli* using the pET expression systems [59]. The location of the three titin fragments in Z- and I- bands, as well as the related antibody epitopes, are schematized in Fig. 1.

Titin fragment proteolysis was conducted for 30 min at 20 °C in 0.25 mM CaCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris/HCl buffer, pH 7.5, by using a calpain 1/substrate ratio of 1 : 20 (w/w). The kinetic was followed by SDS/PAGE and stopped with 1 mM EGTA. Protein concentrations were measured by using the method of Bradford [60].

### Electrophoresis and western blot analysis

Freshly excised fiber bundles from bovine Longissimus dorsi muscle were homogenized and dissolved in 2 volumes (w/v) of 30 mM Tris/HCl buffer, pH 6.8, containing 8 M urea, 4% (w/v) SDS and 1% (v/v) 2-mercaptoethanol, and heat denatured for 3 min in boiling water. For calpain p94, the myofibrillar 5000 g pellet of the muscle homogenate (homogenization in 2 volumes of 30 mM Tris/HCl buffer, pH 8.0, containing 5 mM EGTA) was denatured as described above. Electrophoresis were performed [61] on 12% (w/v) SDS polyacrylamide slab gels or on a 2–10% gradient resolving gel (denaturing conditions) and without SDS (native gels), then revealed either by silver staining or stained with Coomassie brilliant blue G250. The high and low range molecular mass markers were from Bio-Rad.

For immunoblot analysis, proteins were transferred to poly(vinylidene difluoride) membrane by electroblotting [62]. After incubation with the appropriate antibody, membrane bound immunoreactive proteins were revealed with the Aurora luminescent kit (ICN, Orsay, France) using alkaline-phosphatase labeled goat anti-rabbit or anti-rat IgG as the secondary antibody.

### Immunofluorescence microscopy

Muscle strips (3 × 10 mm) were isolated from fresh cuts of bovine Longissimus dorsi muscle, parallel to the long axis

of the fibers, stretched and fixed with needles on cork plates before immersion in 4% (v/v) paraformaldehyde and 0.1% (v/v) glutaraldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.4, for 45 min at room temperature. Stretched samples were then immersed in 30% (w/v) sucrose in NaCl/P<sub>i</sub> buffer (0.15 M NaCl, 50 mM phosphate buffer, pH 7.4) to reach equilibrium. Thick sections of  $\approx 10 \mu\text{m}$  were cut by using a Reichert Frigocut 2800 (Leika, Heidelberg, Germany) and treated with goat serum (diluted to 1 : 20 in NaCl/P<sub>i</sub>) for 15 min followed by three 5 min successive washes in NaCl/P<sub>i</sub>. Mice were perfused by intracardiac procedure with NaCl/P<sub>i</sub>, followed by 4% (v/v) paraformaldehyde in NaCl/P<sub>i</sub>. Leg muscle (Vastus lateralis) was rapidly dissected and immersed in the same fixative for 15 h at 4 °C, then incubated for 15 h in 10% (w/v) sucrose at 4 °C. After freezing on dry ice, tissue was cut into 18  $\mu\text{m}$  cryosections.

Sections were pretreated for 30 min with NaCl/P<sub>i</sub>, supplemented with 2% (w/v) BSA and 0.1% Triton (v/v), before incubation overnight at 4 °C in a humid atmosphere with the primary antibodies diluted in NaCl/P<sub>i</sub>. After three washes in NaCl/P<sub>i</sub>, cryosections were incubated for 90 min in the secondary antibody (1 : 200 dilution). Finally, sections were mounted on glass slides in Mowiol and observed by using an Axioplan 2E Zeiss light microscope (Zeiss, Lyon, France) or a Leica TCS 4D confocal laser-scanning microscope.

### Immunoelectron microscopy

The localization of calpains was performed by using the pre-embedding procedure [63] with a peroxidase labeled secondary antibody. Muscle strips (1 × 5 mm) of bovine Longissimus dorsi muscle were fixed for 30 min at room temperature in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4, containing 1% (v/v) paraformaldehyde. Small pieces (0.5 × 1 mm), were incubated for 2 h in NaCl/P<sub>i</sub> containing 1% (w/v) BSA, washed in NaCl/P<sub>i</sub> for 30 min and immunostained with the primary antibody [antiserum diluted 10-fold in NaCl/P<sub>i</sub> supplemented with 0.05% (v/v) Triton X-100] at room temperature and stirred continuously for 20 h. After extensive washing in NaCl/P<sub>i</sub>, endogenous peroxidase activity was blocked by the addition of 0.6% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in methanol for 15 min. Samples were then rinsed three times with NaCl/P<sub>i</sub> and treated for 15 h at room temperature with peroxidase labeled goat anti-rabbit IgG diluted 1 : 100 (v/v) in NaCl/P<sub>i</sub>. After extensive washing in NaCl/P<sub>i</sub>, peroxidase activity was revealed by the addition of substrate tablets, according to the manufacturer's recommendation (Sigma, St Quentin Favallier, France). Samples were then postfixed for 1 h in 1% (w/v) osmium tetroxide in NaCl/P<sub>i</sub>, pH 7.4, and dehydrated before embedding in epoxy resin. Ultrathin sections (70 nm) were cut with a Reichert Ultracut E (Leika) and positively stained with uranyl acetate and Reynold's lead citrate before examination with a Philips

EM400 at a voltage of 80 kV. Control samples were similarly treated except that the primary antibody was omitted.

### Intracellular calcium localization

*In situ* precipitation of calcium ions was performed on muscle strips, using potassium pyroantimonate/osmium tetroxide [64] and X-ray microanalysed, according to our previously described method [33].

### Binding assays

Binding assays were carried out with both bovine or porcine calpain 1 and titin fragments by using solid-phase ELISA [65], soluble-phase fluorescence using FITC-labeled calpain 1 [66] and coimmunoprecipitation.

For ELISA, microplates were coated with 0.1  $\mu\text{g}$  of calpain 1 in 10 mM sodium bicarbonate buffer, pH 8.5, containing either 1 mM CaCl<sub>2</sub> and 0.6  $\mu\text{M}$  E<sub>64</sub> or 1 mM EGTA and 0.6  $\mu\text{M}$  E<sub>64</sub>. Incubation with increasing concentrations of T150 were performed in 0.5% (w/v) gelatin, 3% (w/v) gelatin hydrolysate, 20 mM Mes buffer, pH 7.5, containing 150 mM KCl and either 1 mM CaCl<sub>2</sub> and 0.6  $\mu\text{M}$  E<sub>64</sub> (Mes-Ca) or 1 mM EGTA and 0.6  $\mu\text{M}$  E<sub>64</sub> (Mes-EGTA). T800, which aggregates strongly in the presence of Ca<sup>2+</sup> ions, was directly coated (0.3  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) onto the microplate before incubation with increased calpain 1 concentrations, in the Mes-Ca or Mes-EGTA buffers.

Assays in fluorospectroscopy were carried out by measuring the changes affecting the fluorescence of FITC-conjugated calpain 1. Increasing amounts of T150 were added to the FITC-conjugated calpain 1 (1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) in 1 mM CaCl<sub>2</sub>/0.6  $\mu\text{M}$  E<sub>64</sub> or 1 mM EGTA/0.6  $\mu\text{M}$  E<sub>64</sub> in Mes buffer, pH 7.1. Fluorescence measurements were carried out by using a Perkin-Elmer LS50 spectrofluorimeter ( $\lambda_{\text{exc}} = 494 \text{ nm}$ ). The emission fluorescence of the calpain 1 spectrum was recorded between 510 and 550 nm, and the peak area calculated for three distinct registrations. Fluorescence changes were deduced from the initial area of emission spectra obtained in the absence of the titin fragment.

Apparent dissociation constant ( $K_d$ ) determination from ELISA and fluorospectroscopy assays were performed as previously described [40].

Immunoprecipitation assays between calpain 1 (50  $\mu\text{g}$ ) and the Z9–I1 recombinant fragment (50  $\mu\text{g}$ ) were performed at 25 °C for 30 min in 5 mM 2-mercaptoethanol, 20 mM imidazole buffer, pH 7.0, in the presence of 1 mM CaCl<sub>2</sub> and 1  $\mu\text{M}$  E<sub>64</sub> as incubation medium. After addition of 250  $\mu\text{L}$  of RZ9a Ig (rabbit) or RtC1A Ig (rat) and 30 min of incubation, the mixture was supplemented with 50  $\mu\text{L}$  of Sepharose–protein G (Pharmacia, Uppsala) to sediment immune complexes. The washed pellets were analyzed by SDS/PAGE and western blotting, using either RtC1A Ig or RZ9a Ab.

## Acknowledgments

This work was supported by grants from the Association Française contre les Myopathies (AFM). The authors would like to thank Dr P. Chaussepied for the mass spectrometry analysis of the 800 kDa titin fragment and Dr C. Astier for critical reading of the manuscript.

## References

- Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W & Cong J (2003) The calpain system. *Physiol Rev* **83**, 731–801.
- Sorimachi H, Ishiura S & Suzuki K (1997) Structure and physiological function of calpains. *Biochem J* **328**, 721–732.
- Carafoli E & Molinari M (1998) Calpain: a protease in search of a function? *Biochem Biophys Res Commun* **247**, 193–203.
- Wang KK (2000) Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci* **23**, 20–26.
- Baghdiguian S, Martin M, Richard I, Pons F, Astier C, Bourg N, Hay RT, Chemaly R, Halaby G, Loiselet J *et al.* (1999) Calpain 3 deficiency is associated with myonuclear apoptosis and profound perturbation of the IkappaB alpha/NF-kappaB pathway in limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Nat Med* **5**, 503–511.
- Raynaud F, Carnac G, Marcilhac A & Benyamin Y (2004) m-Calpain implication in cell cycle during muscle precursor cell activation. *Exp Cell Res* **298**, 48–57.
- Yamashita T (2004) Ca<sup>2+</sup>-dependent proteases in ischemic neuronal death; a conserved 'calpain-cathepsin cascade' from nematodes to primates. *Cell Calcium* **36**, 285–293.
- Rios-Doria J, Day KC, Kuefer R, Rashid MG, Chinnaiyan AM, Rubin MA & Day ML (2003) The role of calpain in the proteolytic cleavage of E-cadherin in prostate and mammary epithelial cells. *J Biol Chem* **278**, 1372–1379.
- Strobl S, Fernandez-Catalan C, Braun M, Huber R, Masumoto H, Nakagawa K, Irie A, Sorimachi H, Bourenkow G, Bartunik H *et al.* (2000) The crystal structure of calcium-free human m-calpain suggests an electrostatic switch mechanism for activation by calcium. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 588–592.
- Moldoveanu T, Hosfield CM, Jia Z, Elce JS & Davies PL (2001) Ca<sup>2+</sup>-induced structural changes in rat m-calpain revealed by partial proteolysis. *Biochim Biophys Acta* **1545**, 245–254.
- Hosfield CM, Moldoveanu T, Davies PL, Elce JS & Jia Z (2001) Calpain mutants with increased Ca<sup>2+</sup> sensitivity and implications for the role of the C(2)-like domain. *J Biol Chem* **276**, 7404–7407.
- Michetti M, Salamino F, Minafra R, Melloni E & Pontremoli S (1997) Calcium-binding properties of human erythrocyte calpain. *Biochem J* **325**, 721–726.
- Sorimachi H, Imajoh-Ohmi S, Emori Y, Kawasaki H, Ohno S, Minami Y & Suzuki K (1989) Molecular cloning of a novel mammalian calcium-dependent protease distinct from both m- and mu-types. Specific expression of the mRNA in skeletal muscle. *J Biol Chem* **264**, 20106–20111.
- Ma H, Fukiage C, Kim YH, Duncan MK, Reed NA, Shih M, Azuma M & Shearer TR (2001) Characterization and expression of calpain 10. A novel ubiquitous calpain with nuclear localization. *J Biol Chem* **276**, 28525–28531.
- Dedieu S, Mazerès G, Dourdin N, Cottin P & Brustis JJ (2003) Transactivation of capn2 by myogenic regulatory factors during myogenesis. *J Mol Biol* **326**, 453–465.
- Dedieu S, Poussard S, Mazerès G, Grise F, Dargelos E, Cottin P, Brustis JJ & Brustis JJ (2004) Myoblast migration is regulated by calpain through its involvement in cell attachment and cytoskeletal organization. *Exp Cell Res* **292**, 187–200.
- Geesink GH & Koohmaraie M (1999) Postmortem proteolysis and calpain/calpastatin activity in callipyge and normal lamb biceps femoris during extended postmortem storage. *J Anim Sci* **77**, 1490–1501.
- Jackman RW & Kandarian SC (2004) The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* **287**, 834–843.
- Delgado EF, Geesink GH, Marchello JA, Goll DE & Koohmaraie M (2001) Properties of myofibril-bound calpain activity in longissimus muscle of callipyge and normal sheep. *J Anim Sci* **79**, 2097–2107.
- Sorimachi H, Kinbara K, Kimura S, Takahashi M, Ishiura S, Sasagawa N, Sorimachi N, Shimada H, Tagawa K & Maruyama K (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**, 31158–31162.
- Kinbara K, Sorimachi H, Ishiura S & Suzuki K (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.
- Taveau M, Bourg N, Sillon G, Roudaut C, Bartoli M & Richard I (2003) Calpain 3 is activated through autolysis within the active site and lyses sarcomeric and sarcolemmal components. *Mol Cell Biol* **23**, 9127–9135.
- Furst DO, Osborn M, Nave R & Weber K (1988) The organization of titin filaments in the half-sarcomere revealed by monoclonal antibodies in immunoelectron microscopy: a map of ten nonrepetitive epitopes starting at the Z line extends close to the M line. *J Cell Biol* **106**, 1563–1572.

- 24 Labeit S & Kolmerer B (1995) Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science* **270**, 293–296.
- 25 Tskhovrebova L & Trinick J (2002) Role of titin in vertebrate striated muscle. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **357**, 199–206.
- 26 Ishiura S, Sugita H, Nonaka I & Imahori K (1980) Calcium-activated neutral protease. Its localization in the myofibril, especially at the Z-band. *J Biochem (Tokyo)* **87**, 343–346.
- 27 Dayton WR & Schollmeyer JV (1981) Immunocytochemical localization of a calcium-activated protease in skeletal muscle cells. *Exp Cell Res* **136**, 423–433.
- 28 Yoshimura N, Murachi T, Heath R, Kay J, Jasani B & Newman GR (1986) Immunogold electron-microscopic localisation of calpain I in skeletal muscle of rats. *Cell Tissue Res* **244**, 265–270.
- 29 Konig N, Raynaud F, Feane H, Durand M, Mestre-Frances N, Rossel M, Ouali A & Benyamin Y (2003) Calpain 3 is expressed in astrocytes of rat and Microcebus brain. *J Chem Neuroanat* **25**, 129–136.
- 30 Salmikangas P, Mykkanen OM, Gronholm M, Heiska L, Kere J & Carpen O (1999) Myotilin, a novel sarcomeric protein with two Ig-like domains, is encoded by a candidate gene for limb-girdle muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* **8**, 1329–1336.
- 31 Van der Ven PF, Wiesner S, Salmikangas P, Auerbach D, Himmel M, Kempa S, Hayess K, Pacholsky D, Taivainen A, Schroder R *et al.* (2000) Indications for a novel muscular dystrophy pathway.  $\gamma$ -Filamin, the muscle-specific filamin isoform, interacts with myotilin. *J Cell Biol* **151**, 235–248.
- 32 Bendall JR (1973) Postmortem changes in muscles. In *The Structure and Function of Muscle*, Vol. 2, 2nd edn (Bourne GH, ed.), pp. 227–274. Academic Press, London.
- 33 Vignon X, Beaulaton J & Ouali A (1989) Ultrastructural localization of calcium in post-mortem bovine muscle: a cytochemical and X-ray microanalytical study. *Histochem J* **21**, 403–411.
- 34 Astier C, Labbe JP, Roustan C & Benyamin Y (1991) Sarcomeric disorganization in post-mortem fish muscles. *Comp Biochem Physiol B* **100**, 459–465.
- 35 Huff-Lonergan E, Mitsunashi T, Beekman DD, Parrish FC, Olson DG & Robson RM (1996) Proteolysis of specific muscle structural proteins by mu-calpain at low pH and temperature is similar to degradation in post-mortem bovine muscle. *J Anim Sci* **74**, 993–1008.
- 36 Maruyama K, Kimura M, Kimura S, Ohashi K, Suzuki K & Katunuma N (1981) Connectin, an elastic protein of muscle. Effects of proteolytic enzymes *in situ*. *J Biochem (Tokyo)* **89**, 711–715.
- 37 Lim CC, Zuppinger C, Guo X, Kuster GM, Helmes M, Eppenberger HM, Suter TM, Liao R & Sawyer DB (2004) Anthracyclines induce calpain-dependent titin proteolysis and necrosis in cardiomyocytes. *J Biol Chem* **279**, 8290–8299.
- 38 Yarom R & Meiri U (1971) N lines in striated muscle: a site of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . *Nat New Biol* **234**, 254–256.
- 39 Tatsumi R, Maeda K, Hattori A & Takahashi K (2001) Calcium binding to an elastic portion of connectin/titin filaments. *J Muscle Res Cell Motil* **22**, 149–162.
- 40 Raynaud F, Bonnal C, Fernandez E, Bremaud L, Cerutti M, Lebart MC, Roustan C, Ouali A & Benyamin Y (2003) The calpain 1– $\alpha$ -actinin interaction. Resting complex between the calcium-dependent protease and its target in cytoskeleton. *Eur J Biochem* **270**, 4662–4670.
- 41 Coulis G, Sentandreu MA, Bleimling N, Gautel M, Benyamin Y & Ouali A (2004) Myofibrillar tightly bound calcium in skeletal muscle fibers: a possible role of this cation in titin strands aggregation. *FEBS Lett* **556**, 271–275.
- 42 Barnes JA & Gomes AV (1995) PEST sequences in calmodulin-binding proteins. *Mol Cell Biochem* **149–150**, 17–27.
- 43 Barnes JA & Gomes AV (2002) Proteolytic signals in the primary structure of annexins. *Mol Cell Biochem* **231**, 1–7.
- 44 Wallace RW, Tallant EA & McManus MC (1987) Human platelet calmodulin-binding proteins: identification and  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent proteolysis upon platelet activation. *Biochemistry* **26**, 2766–2773.
- 45 Shumway SD, Maki M & Miyamoto S (1999) The PEST domain of IkappaB $\alpha$  is necessary and sufficient for *in vitro* degradation by mu-calpain. *J Biol Chem* **274**, 30874–30881.
- 46 Kimura S, Matsuura T, Ohtsuka S, Nakauchi Y, Matsuno A & Maruyama K (1992) Characterization and localization of  $\alpha$ -connectin (titin I): an elastic protein isolated from rabbit skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil* **13**, 39–47.
- 47 Kawamura Y, Kume H, Itoh Y, Ohtsuka S, Kimura S & Maruyama K (1995) Localization of three fragments of connectin in chicken breast muscle sarcomeres. *J Biochem (Tokyo)* **117**, 201–207.
- 48 Bassaglia Y, Cebrian J, Covan S, Garcia M & Foucrier J (2005) Proteasomes are tightly associated to myofibrils in mature skeletal muscle. *Exp Cell Res* **302**, 221–232.
- 49 Taylor RG, Papa I, Astier C, Ventre F, Benyamin Y & Ouali A (1997) Fish muscle cytoskeleton integrity is not dependent on intact thin filaments. *J Muscle Res Cell Motil* **18**, 285–294.
- 50 Miller MK, Bang ML, Witt CC, Labeit D, Trombitas C, Watanabe K, Granzier H, McElhinny AS, Gregorio CC & Labeit S (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**, 951–964.

- 51 Kojic S, Medeot E, Guccione E, Krnac H, Zara I, Martinelli V, Valle G & Faulkner G (2004) Ankrd2 protein, a link between the sarcomere and the nucleus in skeletal muscle. *J Mol Biol* **339**, 313–325.
- 52 Astier C, Raynaud F, Lebart MC, Roustan C & Benyamin Y (1998) Binding of a native titin fragment to actin is regulated by PIP2. *FEBS Lett* **429**, 95–98.
- 53 Sebestyen MG, Wolff JA & Greaser ML (1995) Characterization of a 5.4 kb cDNA fragment from the Z-line region of rabbit cardiac titin reveals phosphorylation sites for proline-directed kinases. *J Cell Sci* **108**, 3029–3037.
- 54 Trombitas K, Greaser M, French G & Granzier H (1998) PEVK extension of human soleus muscle titin revealed by immunolabeling with the anti-titin antibody 9D10. *J Struct Biol* **122**, 188–196.
- 55 Thompson VF & Goll DE (2000) Purification of mu-calpain, m-calpain, and calpastatin from animal tissues. *Methods Mol Biol* **144**, 3–16.
- 56 Astier C, Labbe JP, Roustan C & Benyamin Y (1993) Effects of different enzymic treatments on the release of titin fragments from rabbit skeletal myofibrils. Purification of an 800 kDa titin polypeptide. *Biochem J* **290**, 731–734.
- 57 Raynaud F, Astier C & Benyamin Y (2004) Evidence for a direct but sequential binding of titin to tropomyosin and actin filaments. *Biochim Biophys Acta* **1700**, 171–178.
- 58 Niederlander N, Raynaud F, Astier C & Chaussepied P (2004) Regulation of the actin–myosin interaction by titin. *Eur J Biochem* **271**, 4572–4581.
- 59 Gautel M, Goulding D, Bullard B, Weber K & Furst DO (1996) The central Z-disk region of titin is assembled from a novel repeat in variable copy numbers. *J Cell Sci* **109**, 2747–2754.
- 60 Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248–254.
- 61 Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- 62 Matsudaira P (1987) Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J Biol Chem* **262**, 10035–10038.
- 63 Stirling JW (1990) Immuno- and affinity probes for electron microscopy: a review of labeling and preparation techniques. *J Histochem Cytochem* **38**, 145–157.
- 64 Appleton J & Morris DC (1979) The use of the potassium pyroantimonate-osmium method as a means of identifying and localizing calcium at the ultrastructural level in the cells of calcifying systems. *J Histochem Cytochem* **27**, 676–680.
- 65 Mejean C, Lebart MC, Boyer M, Roustan C & Benyamin Y (1992) Localization and identification of actin structures involved in the filamin–actin interaction. *Eur J Biochem* **209**, 555–562.
- 66 Renoult C, Blondin L, Fattoum A, Ternent D, Maciver SK, Raynaud F, Benyamin Y & Roustan C (2001) Binding of gelsolin domain 2 to actin. An actin interface distinct from that of gelsolin domain 1 and from ADF/cofilin. *Eur J Biochem* **268**, 6165–6175.



# Myofibrillar tightly bound calcium in skeletal muscle fibers: a possible role of this cation in titin strands aggregation

Gerald Coulis<sup>a</sup>, Miguel A. Sentandreu<sup>a</sup>, Nathalie Bleimling<sup>b</sup>, Mathias Gautel<sup>c</sup>,  
Yves Benyamin<sup>d</sup>, Ahmed Ouali<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Muscle Biochemistry Group, INRA (Institut National de la Recherche Agronomique)-Theix, 63122 Saint Genès Champanelle, France

<sup>b</sup>Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie, Abt. Physikalische Biochemie, 44202 Dortmund, Germany

<sup>c</sup>Muscle Cell Biology, The Randall Centre, New Hunt's House, King's College London, Guy's Campus, London SE1 1UL, UK

<sup>d</sup>Cell Motility Laboratory, University of Montpellier II, Place E. Bataillon, 34 090 Montpellier, France

Received 16 September 2003; revised 4 November 2003; accepted 1 December 2003

First published online 10 December 2003

Edited by Amy McGough

**Abstract** In muscle cells, part of the calcium is tightly bound to the N1- and N2-line of the sarcomere but its physiological significance was unknown. In the present work we reported the ability of a recombinant titin fragment spanning titin domains Z9 to I1 to tightly bind calcium ions with a  $K_d$  of  $0.049 \pm 0.004$  nM. We further showed that calcium induced a spontaneous aggregation of the titin fragment and that the major aggregate is a tetramer. The implication of these findings on the organization of the six titin strands that emanate from the end of the thick filament within the I-band is discussed.

© 2003 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

**Key words:** Skeletal muscle; Titin; Recombinant fragment; N-line; Calcium; Titin polymerization

## 1. Introduction

Single titin molecules, a giant protein (3.0–3.7 MDa; 1  $\mu$ m long) [1] also known as connectin [2], span half of the sarcomere from M-line to Z-line [3], and pairs of molecules can therefore specify events over the entire sarcomere. Recent findings suggested that there are six titin molecules per thick filament, a number in good adequation with the three-fold symmetry of thick filaments and the two-fold symmetry of thin filaments [4,5]. Emerging from the tips of the thick filaments are stalk-like structures called end-filaments, whose size, location and distinctive 4 nm cross suggest they are an aggregate of a part of the titin molecule striations [6,7], but how the titin molecules pack together to form them remains to be determined. From each myosin filament, it was assumed that two pairs of titin strands move out and interact with the actin filaments close to the Z-band [5] suggesting that they are relatively free within the I-band. The two other strands span the I-band to the Z-line where they might interact with actin filaments of opposite polarity from the next half sarcomere [4]. For a better efficiency of the titin molecules in controlling passive elasticity of sarcomeres, a strict coordination of the shortening or strengthening of the elastic region of each titin strand would have to be performed with exquisite precision.

This could be achieved through a regulated aggregation at defined region of the titin spanning from the A-band to the Z-band before they interact with actin filaments.

As emphasized for the end-filaments we still do not know how the titin strands can form such aggregates. Can this property be regulated by calcium located at the N1- and N2-line levels of the sarcomere [8,9]? Such assumption is supported by the ability of titin to bind calcium [10,17]. The fact that calcium bound to the N1- and N2-lines of the sarcomere can not be displaced even with relatively high concentrations of ethyleneglycol-bis-( $\beta$ -aminoethylether)- $N,N,N',N'$ -tetraacetic acid (EGTA) in the range of 10–20 mM (personal observation) supports this hypothesis. Furthermore this unpublished observation suggests an unusually very high binding affinity and very likely much higher than that reported for the elastic portion of titin [10].

In the present work we address questions about how the titin strands can aggregate and the biological function of the N1- and N2-line bound calcium in this context was tested. We analyzed the ability of a recombinant titin fragment, spanning domains Z9 to I1 of titin, to bind calcium and to polymerize in the presence of this cation. Domains Z9 and I1 which are close to the N1-line insertion located between domains I2 and I3, are linked by a segment containing a coiled-coil sequence [11] as well as a negatively charge region enriched in Glu residues. The N1-line region is further known to bind calcium as evidenced in pyroantimonate treated fibers [8,9].

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Superose 12 HR 10/30 gel filtration column was purchased from Amersham Pharmacia Biotech. (Orsay, France). Chelex-100 resin was obtained from Sigma Chemical Co. (St Quentin Fallavier, France). Quin-2 was supplied by Molecular Probe (Interchim, Montluçon, France).

### 2.2. Recombinant fragment preparation

Recombinant titin fragment spanning Z9 to I1 domains of titin and located in the N1-line region of the protein was expressed in *Escherichia coli* using the pET expression systems as described previously [12].

### 2.3. Calcium titration of the recombinant Z9–I1 titin fragment

**2.3.1. Preparation of calcium buffer.** To avoid calcium contamination, all buffers were prepared with deionized water previously run three times through a Chelex-100 column (1  $\times$  8 cm), for 1 h each at a flow rate of 0.3 ml/min, according to the cleaning procedure reported

\*Corresponding author. Fax: (33)-4 73 62 42 68.

E-mail address: ouali@clermont.inra.fr (A. Ouali).

for aluminum contamination of aqueous solution [20]. All subsequent experiments were carried out in 50 mM Tris-HCl buffer pH 7.5 containing 100 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol (DTT) and 4 mM EGTA (buffer A). Similarly, buffer A was also run three times through the Chelex-100 column, for 1 h each at a flow rate of 0.3 ml/min. After Chelex-100 treatment of buffer A, no calcium was detected with Quin-2 [21]. Its concentration in the buffer was therefore assumed to be in the nM range as compared to the control for which the calcium concentration was similarly estimated to be in the  $\mu\text{M}$  range. The free calcium concentration was then calculated from the contaminating calcium (1 nM), plus the amount of calcium added, using the computer Biosoft Eqcalwin program from Mike Haygall (Biosoft Company, London, UK) with the following logarithmic association constants for metals and  $\text{H}^+$  to EGTA:  $\text{H}^+$  to  $\text{EGTA}^{4-}$ , 9.53;  $\text{H}^+$  to  $\text{HEGTA}^{3-}$ , 8.88;  $\text{H}^+$  to  $\text{H}_2\text{EGTA}^{2-}$ , 2.65;  $\text{H}^+$  to  $\text{H}_3\text{EGTA}^{1-}$ , 2.00;  $\text{Ca}^{2+}$  to  $\text{EGTA}^{4-}$ , 11.0;  $\text{Ca}^{2+}$  to  $\text{HEGTA}^{3-}$ , 5.33. Using a Roebbling automatic micro-osmometer (Bioblock, Illkirch, France), the osmotic pressure of buffer A was estimated to be 292 mOsm, a value corresponding to physiological conditions.

**2.3.2. Calcium titration of the Z9–I1 fragment.** The titin recombinant fragment (250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) was incubated overnight at 4°C, under mild continuous stirring, with a few mg of Chelex-100 resin pre-hydrated in buffer A. The solid phase was sedimented by centrifugation at  $1000\times g$  for 5 min and the polypeptide recovered in the supernatant used for calcium titration. Calcium titration of this recombinant titin fragment was carried out as described previously in [13]. Increasing concentrations of calcium were added, from a 2 M stock solution in buffer A, to the recombinant fragment (1  $\mu\text{M}$ ) and changes in the intrinsic tryptophan fluorescence recorded using a Perkin Elmer LS 50 spectrofluorometer ( $\lambda_{\text{Exc}}$  305 nm,  $\lambda_{\text{Em}}$  358 nm). Calibration of the free calcium concentration was carried out by titration of Quin-2 (1  $\mu\text{M}$  in buffer A) using excitation and emission wavelengths of 330 and 495 nm, respectively. The fluorescence data were fit to the one-site model of the non-linear Hill equation:

$$y = y_{\text{max}} / (1 + 10^{(n*(K_d - p\text{Ca}))})$$

where  $y$  = normalized fractional maximal fluorescence  $y_{\text{max}}$ ;  $y_{\text{max}}$  = maximal percentage enhancement observed in that phase of the titration;  $n$  = Hill coefficient;  $K_d$  = free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration producing half-maximal enhancement in the indicated phase of titration;  $p\text{Ca}$  = negative logarithm of the free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration producing  $y\%$  of maximal enhancement. The curves were fit with a least squares non-linear regression (Microsoft Excel Solver, 1997).

#### 2.4. Polymerization of the titin fragment in the presence of calcium

After overnight treatment of the Z9–I1 recombinant fragment with

Chelex-100 resin (see below), the mixture was run on a Superose 12 HR 10/30 column pre-equilibrated in buffer A containing 1 mM EGTA instead of 4 mM. The monomeric form eluted at a  $M_r$  of about 53 000 Da was collected and used for the calcium-induced polymerization study. The fragment (250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) was incubated at room temperature without calcium (control) or with 0.1 and 1  $\mu\text{M}$  calcium for 30 min (free calcium concentrations:  $3.35\times 10^{-11}$  and  $3.35\times 10^{-10}$ , respectively). An aliquot of each mixture (250  $\mu\text{l}$ ) was then loaded on a Superose 12 HR 10/30 column previously equilibrated with the same buffer. Proteins were eluted at a flow rate of 0.3 ml/min and fractions of 0.3 ml were collected. Calibration of the column was performed using ferritin (418 kDa), catalase (232 kDa), aldolase (158 kDa), bovine serum albumin (BSA; 67 kDa) and bovine  $\alpha$ -lactoglobulin (30 kDa).

#### 2.5. Depolymerization of the Z9–I1 complex in the presence of Chelex-100 resin

The recombinant peptide was incubated overnight at 4°C in buffer A with a few mg of Chelex resin previously hydrated in the same buffer and the supernatant recovered as described above. The control sample was similarly incubated but in the absence of Chelex-100 resin. An aliquot (250  $\mu\text{l}$ ) of the samples was then loaded on a Superose 12 HR 10/30 column previously equilibrated with the same buffer. Proteins were eluted at a flow rate of 0.3 ml/min and fractions of 0.3 ml were collected.

#### 2.6. Protein determination

Protein concentrations were measured by using Bradford's method (Bio-Rad protein assay) with rabbit immunoglobulin as the standard [14].

### 3. Results

#### 3.1. Structure, properties and location in titin of the Z9–I1 recombinant fragment

The recombinant fragment used in the present experiment spans domains Z9 to I1 of titin molecules (Fig. 1A) and connects the Z-line to the I-band. The polypeptide comprises 331 amino acid residues (from residue 1841 to 2172 in human cardiac titin [1]) and, on the basis of its primary sequence (Fig. 1B), its  $M_r$  was predicted to be 41 000 Da with the His tag inserted at its N-terminal end (not shown). The immunoglobulin-like domains Z9 (residues 1–90 in Fig. 1B) and

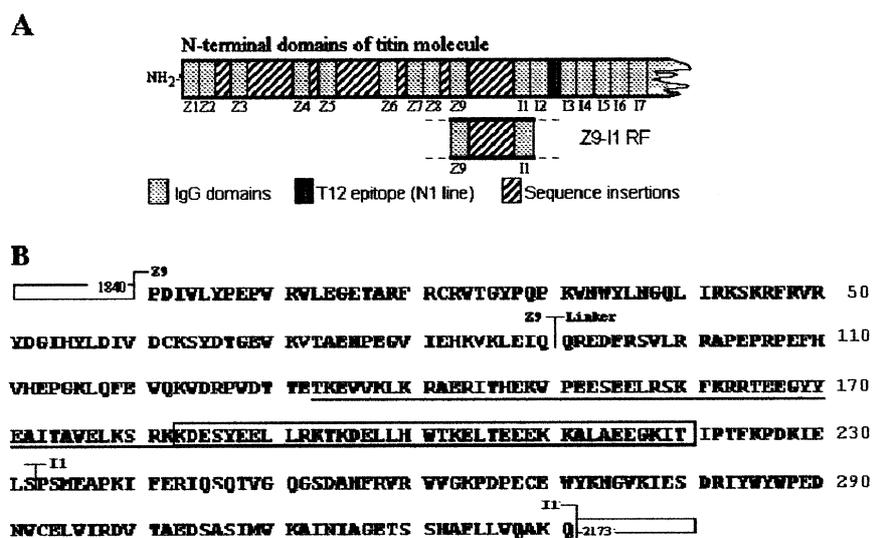


Fig. 1. Main characteristics of the Z9–I1 titin recombinant fragment. A: Localization of the fragment at the N-terminal end of the titin molecule. B: Primary sequence of the titin fragment extending from residue 1840 to 2173 in the cardiac titin sequence [1] with the cluster enriched in Glu residues (underlined and boxed sequences). Abbreviations used: IgG, immunoglobulin like; Z9–I1 RF, Z9–I1 recombinant fragment; Z9, Z9 titin domain; I1, I1 titin domain.

II (residues 233–331 in Fig. 1B) are linked by a unique insertion sequence (residues 91–232 in Fig. 1B). This insertion was shown to have a helical propensity with a strong amphiphilic character [11]. Analysis of this sequence using a secondary structure predictive program also predicts a large majority of  $\alpha$ -helices separated by very short random coil structures within the underlined sequence (residues 132–220). On the other hand, examination of the sequence revealed a particular high content in Glu residues especially within the underlined sequence and to a greater extent within the boxed sequence (residues 182–220 in Fig. 1B). Therefore, the present cluster of highly negative net charge could be a potential calcium binding site. This was substantiated by preliminary assessment of its calcium binding ability using the Quin-2 fluorescence technique described in [15] (data not shown).

### 3.2. Calcium titration of the titin Z9-II recombinant fragment

This fragment was subjected to quantitative measurements of calcium binding using the method described in [13]. Calcium binding to proteins generally produces large structural changes and these structural changes perturb the environment of intrinsic fluorophores such as Trp and Tyr residues. Study of the binding of calcium to the titin fragment was therefore performed using the changes in the intrinsic tryptophan fluorescence.

As shown in Fig. 2, increasing concentration of calcium causes a sharp increase in the Trp fluorescence and half-maximal binding was found to occur at  $pCa$   $10.31 \pm 0.03$  giving a  $K_d$  value of  $4.92 \times 10^{-11} \pm 0.38 \times 10^{-11}$  M (mean  $\pm$  S.D. for three independent experiments). The estimated Hill coefficient was about 4 suggesting a cooperativity in calcium binding.

To calibrate the free calcium concentrations, the chromo-

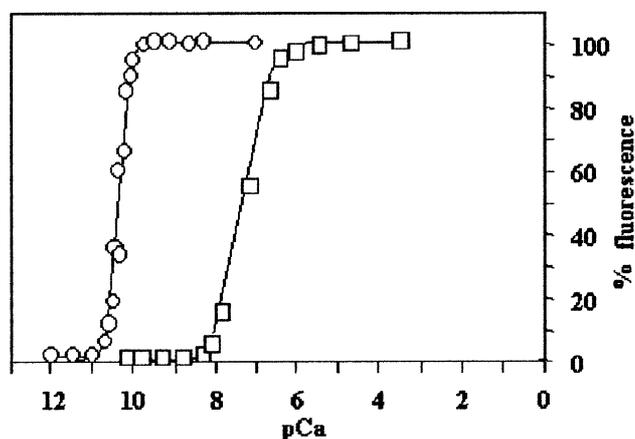


Fig. 2. Calcium titration of Quin-2 (open squares) and of the Z9-II titin fragment (open circles). Calcium was added to  $1 \mu\text{M}$  of each compound in 1 ml calcium buffer. 100% increase in the intrinsic tryptophan (Z9-II) and Quin-2 fluorescence corresponds to 2.2- and 5-fold increases for the titin fragment and Quin-2, respectively. The multistep cleaning of the buffer with Chelex-100 decreases significantly the calcium content and this cation was not more detectable with Quin-2. In the absence of EGTA, the free calcium in the buffer was therefore estimated to be in the nM range (1 nM). This concentration was taken as the basis of the amount of calcium added and of the free calcium determination in the presence of 4 mM EGTA. As an example, in the presence of 4 mM EGTA,  $1 \times 10^{-12}$  M free calcium needs a total calcium of  $1.2 \times 10^{-8}$  M. Assuming that we have 1 nM free calcium in the buffer, a total amount of  $\approx 1.1 \times 10^{-8}$  M was added to the mixture.

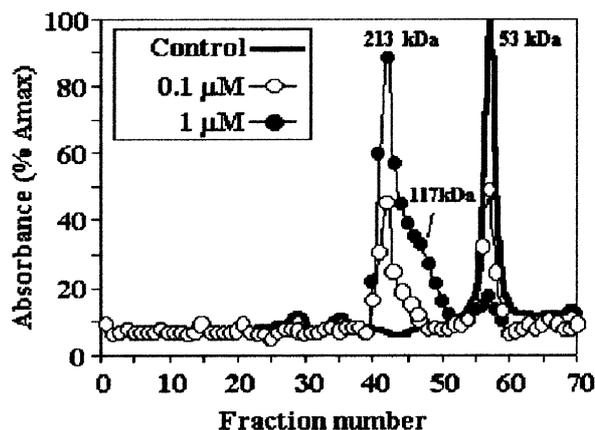


Fig. 3. Elution profile of the recombinant fragment from a Superose 12 HR column after incubation for 30 min at room temperature, without calcium (thick line) or with either  $0.1 \mu\text{M}$  total calcium (open circles) or  $1 \mu\text{M}$  total calcium (closed circles). Elution was performed at  $0.3 \text{ ml/min}$  and fractions of  $0.3 \text{ ml}$  were collected.

phoric chelator Quin-2 was titrated in the same conditions (Fig. 2). The half-maximal increase in fluorescence for Quin-2 occurs at  $pCa$   $7.21 \pm 0.01$  ( $K_d = 61 \pm 2 \text{ nM}$ ) (mean  $\pm$  S.D. for three independent experiments) with a Hill coefficient of 1.09. This  $K_d$  value is essentially identical to the  $K_d$  (60 nM) reported for Quin-2 by the supplier.

### 3.3. Calcium induced polymerization of the Z9-II titin fragment

To test this possibility, the fragment was treated with Chelex-100 and the monomeric form purified by gel filtration on a Superose 12 HR 10/30 column. The monomeric form was then incubated with different calcium concentrations and the mixture analyzed by gel filtration on the same column. Gel exclusion chromatography enables a good fractionation of the monomeric (53 kDa) and the aggregated forms of the recombinant Z9-II titin fragment (see the control elution profile in Fig. 4).

Upon addition of  $0.1 \mu\text{M}$  calcium (free calcium concentration close to the  $K_d$  value obtained above:  $3.35 \times 10^{-11}$  M),

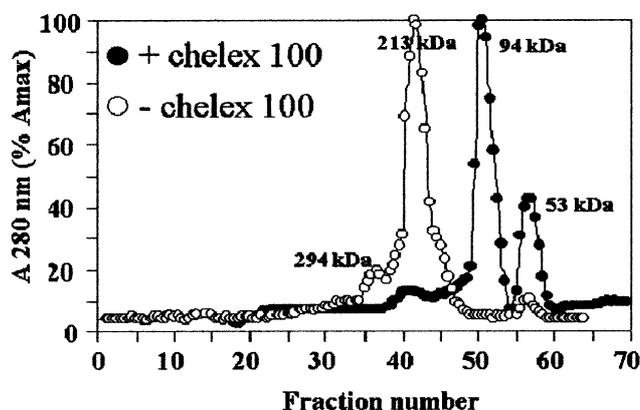


Fig. 4. Elution profile of the recombinant fragment from a Superose 12 HR column after overnight incubation at  $4^\circ\text{C}$  with a few mg of Chelex-100 resin (closed circles) or without Chelex-100 resin (open circles). Elution was performed at  $0.3 \text{ ml/min}$  and fractions of  $0.3 \text{ ml}$  were collected.

we observed a decrease in the level of the monomeric form and the appearance of an intermediate shoulder with a  $M_r$  of about 117 kDa which might possibly correspond to a dimer or a trimer (Fig. 3). Raising the calcium concentration from 0.1 to 1  $\mu\text{M}$  (saturating free calcium concentration of  $3.35 \times 10^{-10}$  as indicated in Fig. 2) led to an almost complete disappearance of the monomeric form and a significant increase in the shoulder coming out just after the tetrameric form. Hence, it can be stressed that calcium induces a polymerization of the Z9–I1 titin fragment. We then tested whether Chelex-100 resin will be able to depolymerize at least partly this aggregate.

#### 3.4. Chelex-100 induced depolymerization of the aggregated Z9–I1 titin fragment

As shown in Fig. 4 for the control sample, the purified titin fragment is originally a mixture comprising the monomeric form (53 kDa), the tetrameric form (213 kDa) and a minor fraction with a  $M_r$  of about 394 kDa which might correspond to the hexameric form. It is worthy to note that the major form is the tetramer whereas the hexameric form was always observed as a minor component in the mixture. The presence of the polymerized polypeptide in the mixture is not too much surprising since no caution has been taken with regard to calcium ions in the production and the purification procedures as well as in the composition of the storage buffer which lacked calcium chelators.

Because no effect was observed with Quin-2, Chelex-100 resin, which has a higher affinity for calcium than most of the chromophoric chelators available, we tested the ability of this resin to depolymerize aggregates of the Z9–I1 fragment. As the stock solution of the Z9–I1 fragment mostly comprised the polymerized form, an aliquot was incubated overnight at 4°C with a few mg of Chelex-100 resin. The control sample was similarly treated but in the absence of Chelex-100 resin. For the treated sample, two major peaks were resolved with a  $M_r$  of 53 and 94 kDa and a minor one with a  $M_r$  of 213 kDa (Fig. 4). Compared to the control sample we observed an almost total disappearance of the tetrameric form (213 kDa), and an increase in the amounts of the 94 and 53 kDa peaks, thus demonstrating a depolymerization of the aggregate by the chelator resin.

#### 4. Discussion and conclusion

In skeletal muscle fibers, most calcium is sequestered in the sarcoplasmic reticulum via a calcium binding protein (CaBP), the calsequestrin and its release in the cytoplasm activates myofibrillar contraction [16]. However, since the seventies, it has been well established that part of the cellular calcium is strongly bound to the myofibrils at the level of the N1- and N2-lines of the sarcomere [8]. The first association of calcium ions with titin/connectin was described several years ago in a hypothesis paper [17] and confirmed by the ability of the PEVK region to bind calcium [15]. However nothing is known about the ability of the N1- and N2-lines to bind calcium. Moreover, although titin/connectin was the best candidate, we did not know precisely to which proteins this calcium bound to and its exact physiological significance.

The present work provides possible answers to these questions. Indeed, in the N1-line region, we demonstrate that calcium binds tightly to a titin fragment spanning the Z9 to I1 domains of the molecule. This recombinant fragment contains

a particular insertion linking titin domain Z9 to domain I1 which exhibited a helical propensity with a strong amphiphilic character [11]. Because such amphiphilic  $\alpha$ -helices are generally unstable and tend to form aggregates [18], the linker segment was suspected to be responsible for titin polymerization in that region of the molecule. However, from the investigations carried out on a typical  $\alpha$ -helix motif (residues 182–220 in Fig. 1B), it was concluded that, in physiological conditions, the peptide did not polymerize [11]. The other important characteristic of the linker segment is its high content in Glu residues suggesting that this linker might be a potential calcium binding site. We demonstrate that this cluster of strong negative net charge was able to bind calcium with an unusually high affinity ( $K_d = 4.92 \pm 0.38 \times 10^{-11}$ ). With such a high affinity, calcium binding would seem quite irreversible, an assumption strengthened by the non-release of this cation upon addition of high concentrations of EGTA to myofibrils ranging from 10 to 20 mM (personal observation). To test this finding, the free calcium concentration was calibrated by titrating Quin-2 in similar conditions. The  $K_d$  value of 61 nM obtained for Quin-2 was identical to the value of 60 nM reported by the supplier suggesting that the free calcium concentrations are accurate up to the nM range.

Although the accuracy of the  $K_d$  value found for the calcium–titin fragment interaction can be discussed, it is clear that the affinity of this cation to titin is much higher (100–1000-fold) than that observed for Quin-2. Precise control of very low calcium concentrations as here is rather difficult and specialists would say that it is impossible. But we must take in mind that our objective was to evaluate the affinity range of this cation towards titin which is not displaced in current conditions and Quin-2 constitutes a good marker in this context. Besides the accuracy of this  $K_d$  value, the most important thing is that we can attest that the affinity of this cation for titin is much higher than for Quin-2.

As assessed by gel filtration, calcium induced the spontaneous polymerization of the recombinant fragment at the expense of the monomer which disappears almost totally at a higher calcium concentration. The major form obtained is the 213 kDa complex which might be the tetramer together with a transient appearance of an intermediate form (possibly a dimer or a trimer). Interestingly, it must be emphasized that the larger aggregate obtained is a tetramer of 213 kDa and not an hexamer as expected from the fact that six titin strands extend through the I-band to the Z-band. When detectable, the hexameric form (294 kDa) was present at a very low level and did not change to a large extent upon addition of calcium. Conversely, treatment of the polypeptide aggregates with a Chelex-100 resin, a high affinity calcium binding polymer, led to a dissociation of the complex into the dimeric and, though to a lesser extent, the monomeric forms. Taken together, these findings suggest that the most probable calcium-induced titin aggregates would be the dimer and/or the tetramer but not the hexamer.

The N1-lines bind calcium but a much greater amount of this bivalent cation is bound to the N2-line region of the sarcomere [9]. Analysis of the titin sequence revealed that the N2A- and N2B-line region contained clusters enriched in Glu residues conferring strong negative net charges to these clusters, which might be potential calcium binding sites of high affinity [1,19]. Hence, we suggest that, similarly to the Z9–I1 fragment, calcium binds to the N2A- and N2B-line

region of titin through such negatively charge clusters. The calcium precipitate band is much wider than in the N1-line region [9]. This observation suggests the presence of a greater number of clusters susceptible to bind calcium within the N2-line area of the titin molecule.

The implication of the calcium-induced aggregation of titin molecules in the N1- and N2-lines is not clear. However, such aggregation would allow a better coordination of the stretching and shortening of each titin strand and would ensure a better force transmission between A-band and Z-line, and probably between adjacent sarcomeres as well. Self-association of the titin molecules was reported at the level of the end-filaments emerging from the tips of the myosin filaments [4]. The present data would support a calcium-dependent association of titin strands to form the end-filaments package. However end-filaments are supposed to contain the PEVK region but we do not know whether they also contained at least part of the N2-line calcium binding region. The last model proposed for the organization of titin strands [4,5] suggests that two pairs of titin strands span the I-band and bind to actin filaments at the level of the Z-line. The third pair was assumed to bind actin filaments of opposite polarity (from the adjacent sarcomere) at the level of the Z-line (see fig. 3a in [5]). How these titin strands are organized within the I-band would have to be clarified in the light of the present findings.

## References

- [1] Labeit, S. and Kolmerer, B. (1995) *Science* 270, 293–296.
- [2] Maruyama, K. (1997) *FASEB J.* 11, 341–345.
- [3] Furst, D.O., Osborn, M., Nave, R. and Weber, K. (1988) *J. Cell Biol.* 106, 1563–1572.
- [4] Liversage, A.D., Holmes, D., Knight, P.J., Tskhovrebova, L. and Trinick, J.A. (2001) *J. Mol. Biol.* 305, 401–409.
- [5] Knupp, C., Luther, P.K. and Squire, J.M. (2002) *J. Mol. Biol.* 322, 731–739.
- [6] Trinick, J.A. (1981) *J. Mol. Biol.* 151, 309–314.
- [7] Funatsu, T., Kono, E., Higuchi, H., Kimura, S., Ishiwata, S., Yoshioka, T., Maruyama, K. and Tsukita, S. (1993) *J. Cell Biol.* 120, 711–724.
- [8] Yarom, R. and Meiri, U. (1971) *Nat. New Biol.* 234, 254–256.
- [9] Vignon, X., Beaulaton, J. and Ouali, A. (1989) *Histochem. J.* 21, 403–411.
- [10] Tatsumi, R., Maeda, K., Hattori, A. and Takahashi, K. (2001) *J. Muscle Res. Cell Motil.* 22, 149–162.
- [11] Musco, G., Tziatzios, C., Schuck, P. and Pastore, A. (1995) *Biochemistry* 34, 553–561.
- [12] Gautel, M., Goulding, D., Bullard, B., Weber, K. and Furst, D.O. (1996) *J. Cell Sci.* 109, 2747–2754.
- [13] Johnson, J.D. and Tikunova, S.B. (2002) in: *Calcium-Binding Protein Protocols, Vol. 2: Methods and Techniques* (Vogel, H.J., Ed.), pp. 89–102, Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- [14] Bradford, M.M. (1976) *Anal. Biochem.* 254, 126–131.
- [15] Tatsumi, R., Shimada, K. and Hattori, A. (1997) *Anal. Biochem.* 254, 126–131.
- [16] Berridge, M.J., Bootman, M.D. and Roderick, H.L. (2003) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 517–529.
- [17] Wang, K. (1985) in: *Cell and Muscle Motility* (Shay, J.W., Ed.), Vol. 6, pp. 315–369, Plenum Press, New York, London.
- [18] Cohen, C. and Parry, D.A. (1990) *Proteins* 7, 1–15.
- [19] Kolmerer, B., Olivieri, N., Herrmann, B. and Labeit, S. (1996) *Adv. Biophys.* 33, 3–11.
- [20] Mitrovic, B., Milac, R.L., Pihlar, B. and Simonc, P. (1998) *Analisis* 26, 381–388.
- [21] Linse, S. (2002) in: *Calcium-Binding Protein Protocols, Vol. 2: Methods and Techniques* (Vogel, H.J., Ed.), pp. 15–24, Humana Press Inc., Totowa, NJ.



## *Communications*

**Coulis G**, Ouali A. Calpain 3-titin interactions using recombinant domains: calcium implication (2006). Journées de l'école doctorale, Clermont-Ferrand (France).

**Coulis G**, Aubry L, Herrera Mendez CH, Ouali A. (2006) Tightly bound calcium within I-band : possible function in titin agregation and calpain 1 biding to titin. 52<sup>th</sup> International Congress Of Meat Science and Technology. Dublin (Irlande).



---

Les calpaïnes sont des protéases à cystéine de type papaine identifiées depuis plusieurs décennies. Parce que leur expression est cytosolique et parce que leur activité est contrôlée par la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$ , il est maintenant admis qu'elles jouent un rôle essentiel dans la signalisation intracellulaire. Elles participent ainsi au contrôle de l'apoptose, de la prolifération, de l'adhérence à la matrice extracellulaire et de la mobilité cellulaire. Il n'est donc pas étonnant qu'elles soient impliquées dans des pathologies lourdes (dystrophies musculaires, ischémies, dégénérescences neuronales, mobilité cellulaire invasive). L'objectif de nos recherches est d'élucider les mécanismes d'activation de différentes calpaïnes (Capn1, Capn2 et Capn3) et les voies de signalisation qu'elles mettent en jeu. En effet, l'association de la calpaïne 3 avec la titine est un élément essentiel dans la régulation et l'activation de la protéase. Dans ce cadre, ce travail visait à caractériser les interactions moléculaires des calpaïnes 1 et 3 avec la région N1 de la titine humaine. Nous avons pu montrer que cette région pouvait fixer très fortement du calcium permettant la polymérisation des molécules de titine. Cette structuration calcium dépendante conditionne la fixation de la  $\mu$ -calpaïne sur le domaine I4 de la titine. La seconde partie du travail a permis de caractériser la colocalisation de la calpaïne 3 avec la calpaïne 1 au niveau du domaine I5. A l'inverse de la  $\mu$ -calpaïne, l'association de la calpaïne 3 ne semble pas dépendre de la structuration de la titine mais plutôt des changements structuraux pouvant intervenir sur la protéase elle-même quand elle fixe du calcium. A la lumière de ces résultats, la titine apparaît comme un régulateur de l'action calpainolytique.

---

### **Calpains 1 and 3: Molecular interactions with N1 line region of human titin**

---

Calpains are papain-like cysteine protease first identified several years ago. Because they are present in the cytosol of mammalian cells and because they are activated in response to  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization, they are thought to be involved mainly in cell signalling pathways. They could participate in cellular responses such as apoptosis, proliferation, extracellular matrix adhesion and motility, that have relevance to pathophysiological issues in dystrophies, ischemia, neuronal diseases, tumor progression. The objective of our investigations is to elucidate activation mechanisms of calpains since association between calpain 3 and titin was shown to be essential to regulate activity of the protease. Here we consider molecular interactions between calpains (1 and 3) and the N1 line region of human titin. We first showed that calcium binding in this region induced a spontaneous aggregation. These structural changes could affect the amount of calpain 1 bound to the immunoglobulin-like domain I4 of titin. We further defined the immunoglobulin-like I5 as the calpain 3 binding site that sized in the extreme vicinity of the calpain 1 binding site. Nevertheless, it sounds that calcium dependant changes on titin have no effects on calpain 3 binding. Only structural changes on calpain 3 itself could influence its association with the N1 line region of titin. In light of these results, titin appears to be a strong modulator of calpainolytic activity.

---

**Mots clés** : Titine, Calpaïnes, Calcium, Polymérisation, Protéolyse, Régulation, Muscle

---

Laboratoire de Biochimie des Protéines  
Qualité des Produits Animaux - QuaPA. INRA-Clermont-Theix