

N° d'ordre : 3899



THESE
Présentée à
L'Université Bordeaux 1

Ecole doctorale des sciences de la vie et de la santé

Par monsieur Cédric BRULE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR

Spécialité : Nutrition

**Vieillesse musculaire : impact de la protéolyse
intracellulaire calcium-dépendante**

Thèse dirigée par Sylvie POUSSARD et Elise DARGELOS
Soutenue le 25 novembre 2009

Après avis de Mrs.

Daniel BECHET Directeur de Recherche, INRA de Theix
Bertrand FRIGUET Professeur, Université Paris 6

Devant la commission d'examen formée de Mmes et Mrs

Véronique PALLET Professeur, Université Bordeaux 1
Daniel BECHET Directeur de Recherche, INRA de Theix
Bertrand FRIGUET Professeur, Université Paris 6
Isabelle BOURDEL-MARCHASSON Professeur H-U, Bordeaux 2
Vincent MOULY Directeur de Recherche, CNRS/Université Paris 6
Sylvie POUSSARD Ingénieur de Recherche, Université Bordeaux 1
Elise DARGELOS Maître de conférences, Université Bordeaux 1

Présidente du jury
Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Examineur
Directrice de thèse
Membre invité

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein de l'Unité Protéolyse, Croissance et Développement musculaire dans le cadre d'une allocation de thèse accordée par la région Aquitaine.

Je tiens tout d'abord à exprimer ma gratitude envers Monsieur le Professeur Patrick COTTIN pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et pour m'avoir prodigué une quantité impressionnante de conseils aussi bien pour l'étude des calpaines que pour la vie quotidienne.

J'exprime également ma reconnaissance à Mesdames Sylvie POUSSARD et Elise DARGELOS pour m'avoir encadrée brillamment et soutenue durant ces trois années. Leurs précieux conseils couplés à leurs qualités scientifiques et pédagogiques m'ont permis d'évoluer sereinement lors de l'exercice difficile qu'est une thèse. Sans elles, je ne serais pas arrivé là où j'en suis. De plus, je tiens à signaler que nos rapports ont dépassé le cadre du laboratoire et je me réjouis des contacts humains que j'ai pu entretenir avec elles.

Je tiens à remercier tous les membres du jury, Madame Véronique PALLET pour l'avoir présidé, Monsieur Bertrand FRIGUET pour avoir jugé ce travail, Madame Isabelle BOURDEL-MARCHASSON et Monsieur Vincent MOULY pour avoir examiné mon manuscrit. De plus, je tiens à remercier particulièrement Monsieur Daniel BECHET pour avoir jugé mon travail ainsi que pour m'avoir accueilli un mois entier dans son unité afin de récupérer du matériel biologique ainsi que pour acquérir des nouvelles techniques de laboratoire.

Je tiens également à remercier tous les membres du laboratoire pour m'avoir supporté pendant ma thèse, ainsi que pour leur bonne humeur et leurs conseils scientifiques. Un grand merci plus particulier et une grande amitié à Abdessatar HADJ-SASSI, Pierre LOCHET et Amélie PIRES-ALVES pour leur bonne humeur matinale et leurs conseils scientifiques (ou non) avisés ; un merci pour Cynthia DUBOURG pour sa disponibilité et sa gentillesse lors de mes questions incessantes sur l'administratif ; ainsi qu'à tous les autres membres du laboratoire : Laetitia DAURY-JOUCLA, Jacques RAYMOND, Jean-Jacques BRUSTIS et Philippe VESCHAMBRE avec qui j'ai pris beaucoup de plaisir à travailler et à partager des moments agréables.

Je tiens à remercier les personnes que j'ai pu côtoyer à l'ISTAB, Bruno VARICHON et Julien MONTEL pour les discussions endiablées de pauses déjeuner.

J'adresse mes sincères remerciements à mes compagnons étudiants thésards, Docteur ou bientôt Docteur : Ludovic, Pascal et Hélène pour leur soutien ainsi que pour leur aide diverse et variée. Egalement, un grand merci aux stagiaires et étudiants qui ont eu le malheur de travailler avec moi : Antoine, Audrey, Asmae, Ramata et Laurianne ; je vous souhaite beaucoup de réussite pour l'avenir.

Je tiens à remercier tous mes amis qui ont cru en moi sans même comprendre un traître mot de ce que je racontais quand je leur expliquais mon travail.

Enfin, un grand merci à ma très chère épouse qui a enfin compris dans ces derniers mois le difficile travail de supporter un thésard lors de l'écriture du manuscrit et de la préparation de l'oral. Rien que pour cela, elle mériterait une médaille. De plus, je la remercie pour son soutien sans faille lors des moments difficiles.

Merci à toutes les personnes que j'ai pu oublier (toutes mes excuses) et merci à ceux qui ont lu ou liront ce manuscrit.

Sommaire

Avant propos	1
Introduction	3
1 ^{ère} partie : le système protéolytique neutre calcium-dépendant : les calpaïnes.....	4
I Généralités, structure des calpaïnes	5
I A Les calpaïnes ubiquitaires.....	5
I B Les calpaïnes tissus spécifiques	7
II Localisation des calpaïnes.....	9
III Régulation de l'activité des calpaïnes ubiquitaires	10
III A Le calcium.....	10
III B Les phospholipides et autres activateurs directs	11
III C La calpastatine.....	13
IV Substrats et fonctions physiologiques des calpaïnes.....	16
V Les calpaïnopathies	16
2 ^{ème} partie : Le muscle strié squelettique	19
I Organisation cellulaire	21
I A Le sarcomère.....	22
I B Le sarcolemme	24
I C Le réticulum sarcoplasmique.....	26
II Les différents types de fibres musculaires	27
3 ^{ème} partie : Myogenèse et régénération musculaire.....	29
I La myogenèse	30
I A Les facteurs de transcriptions myogéniques.....	31
I B Implication des calpaïnes au cours de la myogenèse	32
II La régénération musculaire	33
II A Les cellules satellites : activation de la régénération	34
II B Les cellules satellites : régulation de la régénération	36
4 ^{ème} partie : Les atrophies musculaires et le système protéolytique neutre calcium-dépendant.....	39
I La myopathie de Duchenne.....	41
II La LGMD2A.....	43
III La sarcopénie ou vieillissement musculaire	46
III A Apoptose et vieillissement musculaire.....	46
III B Le stress oxydant et son rôle au cours du vieillissement musculaire	49
III B 1 Les bases des ROS	49
III B 2 Stress oxydant et vieillissement	52
III B 3 Conséquences du stress oxydant sur le vieillissement musculaire..	53

III C : Causes et conséquences de la perte d'énergie produite par le métabolisme durant le vieillissement musculaire.....	54
III C 1 Les mutations de l'ADNmt dans le muscle âgée : lien avec la perte d'énergie	54
III C 2 Les conséquences cellulaires de la déplétion en énergie.....	56
 Résultats	 59
Chapitre 1 : article 1 : Evolution du système protéolytique neutre calcium-dépendant durant le vieillissement du muscle squelettique	60
article 2 : Etude protéomique des voies de signalisations calpaïno-dépendantes au cours du vieillissement musculaire	73
Chapitre 2 : article 3 Augmentation de la protéolyse neutre calcium-dépendante chez des myoblastes humains après induction par un stress oxydant.....	111
 Conclusions perspectives	 125
 Références bibliographiques	 134
 Annexes	 166

Table des abréviations

ACBP : Acyl-Coa binding protein
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN : Acide ribonucléique
ATP : Adénosine triphosphate
bHLH : Basic helix-loop-helix
Cdk: Cyclin dependent kinase
CSQ: Calsequestrine
Css1 / Css2 : Calpain small subunit 1 / 2
DGC : Dystrophin-glycoprotein complex
DHPR : Récepteurs dihydropyridine
DMD : Duchenne Muscular Dystrophy
EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique
EGF : Epidermal growth factor
ERK: Extracellular signal-regulated kinase
FGF : Fibroblast growth factor
GAPDH: Glyceraldéhyde 3-phosphate déhydrogénase
G6PD : Glucose 6-phosphate déhydrogénase
GR : Glutathion reductase
GSH : Glutathion
HGF : Hepatocyte growth factor
Hsp: Heat shock protein
IGF : Insulin-like growth factor
IL-6: Interleukine-6
IS1 / IS2 : Insertion sequence 1 / 2
JP: Junctophiline
LGMD-2A : Limb-girdle muscular dystrophy type 2A
MARCKS: Myristoylated alanin-rich C-kinase substrate
MAPK: Mitogen activated protein kinase
MEC : Matrice extracellulaire
MEF-2: Myocytes enhancer factor-2
MG29: Mitsugumine 29
MRF : Myogenic regulatory factor
MyBP: Myosine Binding Proteins
MyHC: Myosine heavy chain
NS: Nuclear sequence
PI : phosphatidylinositol
PKA, C : Protéine kinase A, C
PS: Phosphatidylsérine
ROS: Reactive oxygen species
Ryr 1 : Ryanodin receptor 1
SERCA : Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase
SOD : Superoxyde dismutase
SDS: Sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE : Sodium dodécyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis
SR : Réticulum sarcoplasmique

SRF: Serum-response factor

TGF- β , α : Transforming growth factor- β , α

TNF- α : Tumor necrosis factor- α

VICR: Voltage induced calcium release

Liste des figures

Figure 1 : structure des calpaïnes ubiquitaires	6
Figure 2 : structure schématique de la calpaïne 3	8
Figure 3 : mécanisme d'activation des calpaïnes	11
Figure 4 : structure schématique de la calpastatine humaine	14
Figure 5 : représentation schématique du modèle d'interaction calpastatine/calpaïne	15
Figure 6 : organisation générale de la structure et de la composition du muscle strié squelettique.....	20
Figure 7 : structure du sarcomère	22
Figure 8 : organisation moléculaire du sarcomère	24
Figure 9 : structure des costamères au niveau du sarcolemme	25
Figure 10 : structure schématique de la jonction tubule T/SR	27
Figure 11 : la différenciation myogénique	29
Figure 12 : représentation schématique des cinq étapes de la fusion des myoblastes	32
Figure 13 : les différentes étapes de la régénération musculaire.....	36
Figure 14 : facteurs influençant l'activité des cellules satellites	37
Figure 15 : actions possibles des calpaïnes ubiquitaires durant l'atrophie musculaire	40
Figure 16 : structure schématique de la dystrophine.....	41
Figure 17 : le réseau du complexe dystrophine-glycoprotéines	42
Figure 18 : répartition des mutations identifiées chez les patients LGMD2A	43
Figure 19 : schéma des protéines sarcomériques impliquées dans des dystrophies musculaires et associées ou non à la calpaïne 3	45
Figure 20 : schéma des voies entraînant l'apoptose	49
Figure 21 : voies principales de lutte contre l'oxydation cellulaire	51
Figure 22 : ROS, inflammation et vieillissement	53

Figure 23 : Causes principales de la perte d'énergie dans les fibres musculaires âgées.....	55
Figure 24 : Modèle récapitulatif des différents résultats obtenus durant la thèse	133

Liste des tableaux

Tableaux I : les différentes calpaïnes et leur distribution tissulaire	7
Tableaux II : caractéristiques fonctionnelles, structurales et métaboliques des fibres musculaires chez l'homme	28
Tableaux III : marqueurs de cellules satellites	35

Avant-Propos

Avant-propos

Ce travail s'inscrit dans la thématique générale du laboratoire qui est « Protéolyse, croissance et développement musculaire ». La protéolyse est un évènement cellulaire indispensable au bon fonctionnement et à la survie de la cellule de par son rôle régulateur au niveau de nombreux processus biologiques. Parmi les différentes voies protéolytiques existantes, notre laboratoire s'intéresse à la protéolyse neutre calcium-dépendante impliquant une famille d'enzymes nommées calpaïnes ainsi que leur inhibiteur endogène, la calpastatine.

Ce système protéolytique est constitué de 14 isoformes de calpaïnes, dont les deux principales sont la μ - et la m-calpaïne. Les calpaïnes sont impliquées dans de nombreux processus biologiques tels que le développement embryonnaire, le cycle cellulaire, l'apoptose, la signalisation cellulaire et la myogenèse. De plus, des dérégulations de leur activité peuvent entraîner des pathologies parfois sévères. Parmi ces pathologies, nous retrouvons les dystrophies musculaires, la chorée d'Huntington, les maladies de Parkinson et d'Alzheimer, ainsi que le psoriasis et la cataracte.

Des travaux réalisés au laboratoire ont démontré l'implication des calpaïnes dans la myogenèse, et notamment lors des stades précoces. Ainsi, nous savons que l'activité des calpaïnes est requise au moment de la fusion des myoblastes. Les calpaïnes permettraient aux cellules de fusionner en dégradant des substrats comme la desmine ou la taline, la m-calpaïne serait extériorisée durant ce phénomène et dégraderait la fibronectine. De plus, des travaux récents réalisés au laboratoire montreraient une implication de la calpaïne 3 dans la régulation des cellules satellites. Enfin, les calpaïnes agiraient sur le contrôle du cycle cellulaire *via* le clivage de facteurs de transcription régulant ce dernier.

Dans ce contexte, le nouvel axe de recherche de notre équipe, s'intégrant dans la thématique du laboratoire, s'intéresse plus particulièrement à l'implication de la μ - et la m-calpaïne dans la mise en place du vieillissement musculaire encore appelé sarcopénie. Il a été montré que chez des personnes atteintes de sarcopénie, une augmentation de l'apoptose conduit à une atrophie musculaire et une diminution du nombre et de la taille des fibres musculaires. De plus, nous savons que les personnes atteintes de sarcopénie ont une récupération à l'effort et aux blessures grandement diminuée. Ce déficit de régénération musculaire est en partie causé par la dérégulation des cellules satellites, qui ne se diviseraient plus ou entreraient en apoptose. Enfin, une dérégulation calcique (entraînant des

concentrations calciques cytoplasmiques supérieures à la normale) est observée durant la sarcopénie. Cette « anarchie » calcique entraîne une dérégulation du couple excitation/contraction diminuant la résistance à l'effort et la production de force des sujets sarcopéniques. Toutes ces dérégulations ; *i.e.* l'augmentation de l'apoptose, la dérégulation du cycle cellulaire et l'anarchie calcique ; nous entraînent sur la voie d'une possible implication des calpaïnes au cours du processus sarcopénique.

En nous appuyant sur ces observations, notre objectif a été dans un premier temps d'étudier l'expression et l'activité des acteurs du système protéolytique neutre calcium-dépendant au cours du vieillissement du muscle strié squelettique chez le rat, puis d'identifier d'éventuels partenaires qui seraient soit des cibles soit des partenaires signalétiques des calpaïnes. Une des caractéristiques du vieillissement musculaire est également une augmentation de la concentration en espèces réactives de l'oxygène intracellulaire. Nous avons étudié, dans un deuxième temps, l'expression et l'activité des calpaïnes ubiquitaires sur des myoblastes de lignée humaine après induction d'un stress oxydant.

Introduction

Bibliographique

Introduction bibliographique

1^{ère} partie

Le système protéolytique neutre calcium dépendant : les calpaïnes

La protéolyse ou dégradation des protéines cellulaires est un processus essentiel pour le bon fonctionnement et la survie cellulaire. En effet, elle joue un rôle majeur que se soit au niveau adaptatif quand la cellule met en place un remaniement génétique (suite à un stress, durant le développement ou pendant un processus physiologique), ou durant le catabolisme protéique (nécessaire à la production d'énergie pour la cellule et au renouvellement du stock d'acides aminés).

Ainsi, on peut distinguer deux types de protéolyse : une protéolyse dite « limitée » permettant l'activation/maturation de précurseurs et la protéolyse « totale » permettant de renouveler le stock cellulaire d'acides aminés ou d'éliminer les protéines anormales.

Quatre systèmes protéolytiques intracellulaires majeurs ont été décrits à ce jour :

- le système ATP-ubiquitine dépendant (ou protéasome)
- la voie lysosomale
- les caspases
- le système calcium-dépendant

Seul le système protéolytique neutre calcium-dépendant (ou calpaïnes) sera présenté au cours de cette introduction à travers ses rôles et ses implications dans les processus physiologiques cellulaires.

I. Généralités, structure des calpaïnes

Découvertes il y a quarante cinq ans par Guroff (1964), les calpaïnes sont des cystéine endopeptidases neutres de type papaïne. Leur activité est contrôlée par la concentration en calcium (Croal *et al.*, 1991). A ce jour, il a été identifié quatorze isoenzymes ayant une expression soit ubiquitaire, soit tissu spécifique (Tableau I). On note également la présence ou non de domaines dit EF-hand importants pour l'activité de l'enzyme (ces domaines sont dits « calmodulin like » car ils permettent la liaison du calcium par l'enzyme (Kretsinger *et al.*, 1972)). Les calpaïnes ayant un domaine EF-hand sont dites typiques et les calpaïnes n'en possédant pas sont dites atypiques. L'activité des calpaïnes est régulée également par leur inhibiteur endogène, la calpastatine.

L'activité des calpaïnes se caractérise par une protéolyse limitée (à quelques acides aminés) de leurs substrats entraînant l'initiation de leur dégradation par d'autres systèmes (création de site d'ubiquitination...), leur activation/inactivation ou encore la modification de leurs propriétés d'interactions dans le cas de protéines structurales.

I. A. Les calpaïnes ubiquitaires

Les deux calpaïnes ubiquitaires les plus décrites à ce jour sont la micro-calpaïne ou calpaïne 1 (son activation *in vitro* se fait pour des concentrations en calcium de l'ordre du micromolaire (Goll *et al.*, 2003)) et la milli-calpaïne ou calpaïne 2 (activée par des concentrations calciques de l'ordre du millimolaire) (Elce *et al.*, 1997). Il est à signaler que la milli-calpaïne est, en règle générale, l'isoforme majoritairement exprimée.

La μ - et la m-calpaïne sont structurellement très proches ; en effet elles possèdent deux sous unités, une sous unité catalytique d'environ 80 kDa (codée soit par *capn1* ou *capn2* respectivement pour la μ - et la m-calpaïne) et une sous unité régulatrice de 30 kDa (il en existe deux types : C_{ss1} ou C_{ss2} mais les deux peuvent constituer la μ - et la m-calpaïne (Schad *et al.*, 2002)). La sous unité catalytique se compose de quatre domaines différents : I à IV et la sous unité régulatrice en comporte deux : V et VI (Goll *et al.*, 2003 ; figure 1) :

Les domaines I et V sont impliqués dans l'autolyse de la protéase. Ils ne présentent aucune homologie avec des polypeptides déjà identifiés dans d'autres protéines. Le

domaine V contient une région riche en glycine et serait capable d'interagir avec des phospholipides membranaires.

Le domaine II comprend le site actif de la protéase, structurellement similaire au domaine catalytique d'autres protéases, composé de la triade catalytique (cystéine, histidine et asparagine). Il peut être divisé en deux sous domaines (IIa comprenant la cystéine et IIb portant l'histidine et l'asparagine) formant une clé catalytique. Le domaine II est fortement conservé et de plus, bien qu'il ne possède pas de structure EF-Hand, est capable de fixer un atome de calcium par sous domaine (soit deux au total) (Moldoveanu *et al.*, 2002 et 2004).

Le domaine III, tout comme le domaine I, ne présente aucune homologie de séquence avec d'autres protéines déjà identifiées à ce jour. Son rôle est mal compris. En revanche, il contient une structure EF-Hand au niveau de la jonction avec le domaine II (Andresen *et al.*, 1991) et dans le cas de la m-calpaïne une région de type C2 capable d'interagir avec les phospholipides membranaires (Tompa *et al.*, 2001). Enfin, ce domaine contient un site de fixation à la calpastatine, qui est l'inhibiteur endogène de la μ - et la m-calpaïne (Wendt *et al.*, 2004).

Les domaines IV et VI, situés côté C-terminal de la protéine, présentent une forte homologie avec la calmoduline du fait de la présence de 5 EF-Hand. Ces structures permettent la liaison du calcium afin d'activer la protéine. Il est à noter également que le domaine VI intervient dans l'hétérodimérisation de la protéine.

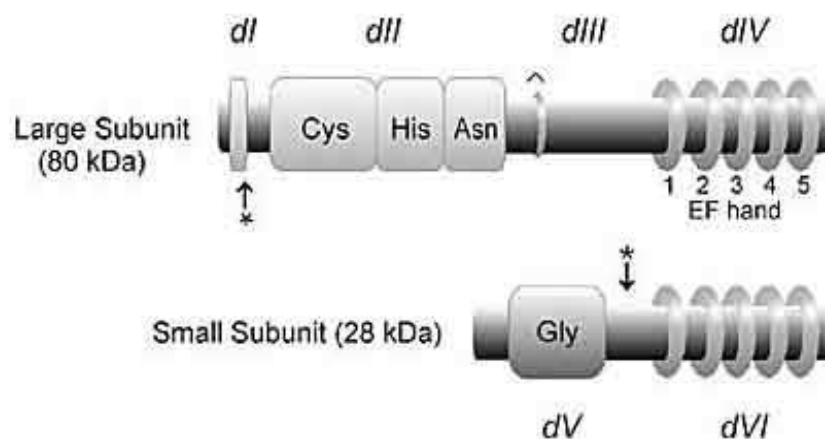


Figure 1 : Structure des calpaines ubiquitaires
(adapté de Sorimachi *et al.*, 1997)

Bien que la μ - et la m-calpaïne soient les deux calpaïnes ubiquitaires les plus étudiées, il existe 6 autres calpaïnes ubiquitaires : les calpaïnes 5, 7, 10, 12, 14 et 15. Cependant peu d'informations sont disponibles sur ces isoformes dont les séquences ADN ont été identifiées et localisées dans le génome humain.

Calpaïne	Gène	Autre nom	EF-Hand	Tissu
Calpaïne 1	<i>capn1</i>	μ -calpaïne, CAPN1	+	Ubiquitaire
Calpaïne 2	<i>capn2</i>	m-calpaïne, CAPN2	+	Ubiquitaire
Calpaïne 3	<i>capn3</i>	nCL-1, p94, Lp82	+	Muscle squelettique cristallin
Calpaïne 5	<i>capn5</i>	nCL-3	-	Ubiquitaire
Calpaïne 6	<i>capn6</i>	CAPNX	-	Placenta
Calpaïne 7	<i>capn7</i>	palBH	-	Ubiquitaire
Calpaïne 8	<i>capn8</i>	nCL-2	+	Estomac
Calpaïne 9	<i>capn9</i>	nCL-4	+	Intestin
Calpaïne 10	<i>capn10</i>	CAPN10	-	Ubiquitaire
Calpaïne 11	<i>capn11</i>	CAPN11	+	Testicules
Calpaïne 12	<i>capn12</i>	CAPN12	+	Ubiquitaire
Calpaïne 13	<i>capn13</i>	CAPN13	+	Testicules, poumons
Calpaïne 14	<i>capn14</i>	CAPN14	-	Ubiquitaire
Calpaïne 15	<i>capn15</i>	Sol H	-	Ubiquitaire
Petite sous-unité	<i>Capn-s1</i>	CAPN4	+	Ubiquitaire

Tableau I : Les différentes calpaïnes et leur distribution tissulaire

I. B. Les calpaïnes tissus spécifiques

Les calpaïnes tissus spécifiques sont au nombre de 6 et sont nommées tissus spécifiques car leurs ARNm n'ont été identifiés que dans certains tissus (la calpaïne 3,6,8,9,11 et 13) (tableau I). De plus, ces dernières se caractérisent par une structure monomérique.

Parmi ces calpaïnes, on retrouve la calpaïne 3 ou p94 qui est majoritairement présente au niveau du muscle squelettique (Poussard *et al.*, 1996 ; pour revue, voir Beckmann & Spencer, 2008). Cette protéine présente de fortes homologies avec les sous-unités catalytiques des calpaïnes ubiquitaires, cependant son poids moléculaire est plus élevé en

raison de l'insertion de trois régions spécifiques (NS, IS1 et IS2 ; figure 2). NS et IS1 joueraient un rôle sur l'activité protéolytique tandis que IS2 serait une séquence d'adressage nucléaire (Sorimachi *et al.*, 1989). Le rôle de la calpaïne 3 reste actuellement peu connu. Il a été montré que des mutations dans le gène de cette protéine sont responsables d'une forme de dystrophie des ceintures (LGMD2A). Ces mutations entraîneraient une incapacité de la p94 à dégrader certains de ses substrats (Ono *et al.*, 1998).

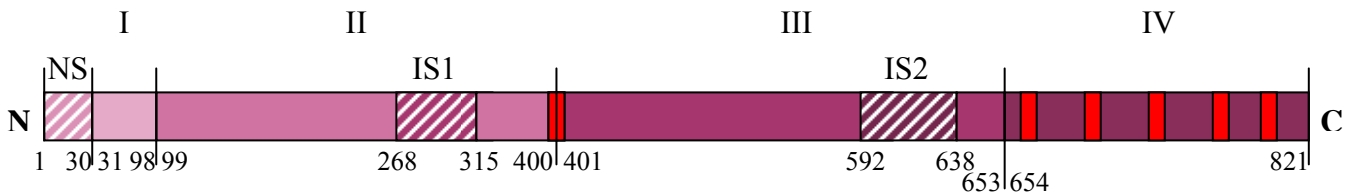


Figure 2 : Structure schématique de la calpaïne 3

La Lp82, spécifique de l'œil et identifiée dans le cristallin (Ma *et al.*, 1998), possède la même séquence en acides aminés que la p94 hormis le domaine I. En effet, elle est issue du même gène que cette dernière, mais a subi un épissage alternatif conduisant à l'absence des séquences d'insertion NS, IS1 et IS2. Des études ont montré une possible implication de la Lp82 dans la cataracte (David *et al.*, 1993).

La calpaïne 6 a été décrite pour la première fois en 1997 par Dear *et al.* Elle est très homologue à la calpaïne 5 et n'est exprimée que dans le placenta, les muscles, les poumons et les reins de l'embryon (Dear & Boehm., 1999). Son expression disparaît rapidement après la naissance. Cette protéine possède diverses particularités qui en font une calpaïne atypique. En effet, son domaine IV est remplacé par un autre domaine de structure différente appelé domaine T. De plus, elle ne semble pas présenter d'activité cystéine-protéase du fait que la cystéine de son site actif est remplacée par une lysine et l'histidine est remplacée par une tyrosine. Il est intéressant de noter que la calpaïne 6 est la seule calpaïne à avoir une triade catalytique différente.

La calpaïne 8 (que l'on nomme également nCL-2) a été décrite en 1993 par Sorimachi *et al.* Elle est exprimée exclusivement au niveau des muqueuses de l'estomac et de l'intestin. Elle est connue sous deux formes : nCL-2, qui comporte un domaine « calmodulin-like » et nCL-2', qui résulte de l'épissage alternatif du gène *capn8* (perte totale du domaine IV et partielle du domaine III). Les fonctions physiologiques de l'une ou l'autre de ces deux formes

restent inconnues, cependant une étude récente a montré que la calpaïne 8 serait impliquée dans le trafic membranaire des cellules de la muqueuse de l'estomac et du duodénum (Hata *et al.*, 2006).

La calpaïne 9 (ou nCL-4) spécifique du tube digestif a été isolée dans l'intestin (Lee *et al.*, 1998). Une diminution importante de l'expression de cette protéase a été observée dans les cellules cancéreuses de l'estomac (Yoshikawa *et al.*, 2000) et une stratégie antisens visant à diminuer son expression a montré une cancérogenèse des cellules transformées (Liu *et al.*, 2000).

Chez l'homme, il a été montré par des techniques de clonage positionnel que le gène *capn10* codant pour la calpaïne 10 pourrait être un gène de susceptibilité au diabète de type 2 (Turner *et al.*, 2005).

La calpaïne 11, qui est une calpaïne typique, est spécifique des testicules et plus particulièrement des spermatoocytes (Dear & Boehm, 1999) et la calpaïne 13, qui elle est dite atypique, se retrouve exprimée dans les poumons et les testicules (Dear & Boehm, 2001).

II. Localisation des calpaïnes

La localisation des calpaïnes demeure imprécise et controversée. Des études de localisation en immunohistochimie ont montré que les calpaïnes ainsi que la calpastatine (leur inhibiteur endogène) avaient une localisation intracellulaire (Kumamoto *et al.*, 1992). Cependant, des études menées au laboratoire par Dourdin et ses collaborateurs en 1997 ont montré une extériorisation de la m-calpaïne lors de la fusion des myoblastes.

La μ - et la m-calpaïne sont principalement localisées dans le cytosol, mais ces dernières peuvent être transloquées vers d'autres compartiments cellulaires. Cette translocation est rendue possible par la liaison d'ions calcium sur les motifs EF-hand des calpaïnes. Ainsi, des études ont montré une association des complexes calpaïnes/calpastatine avec le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (Hood, 2004).

Des études récentes ont montré une localisation de la m-calpaïne au niveau de rafts membranaires dans les cellules lymphoblastoïdes T humaines (Morford *et al.*, 2002), au

niveau des *caveolae* dans les cellules parathyroïdes (Kifor *et al.*, 2003) ou dans des myotubes (Goudenège *et al.*, 2005).

La distribution subcellulaire des calpaïnes est bien distincte d'une isoforme à l'autre et elle est également spécifique du type cellulaire

III. Régulation de l'activité des calpaïnes ubiquitaires

Comme la plupart des enzymes, les calpaïnes sont synthétisées au niveau cellulaire sous forme inactive (proenzyme) afin d'éviter une protéolyse anarchique dommageable voire délétère pour la cellule. Une activation de ces dernières est donc nécessaire. Deux mécanismes d'activation des calpaïnes sont possibles et se sont longtemps opposés : d'une part l'autolyse puis la dissociation des deux sous-unités et d'autre part la dissociation sans l'autolyse. Dans ces deux cas, un élément entre en jeu et est indispensable à leur activation : le calcium.

III. A. Le calcium

Le calcium interagit avec les calpaïnes afin de modifier leur conformation en se fixant aux structures EF-Hand des domaines IV et VI. De plus, il permettrait de rapprocher les domaines IIa et IIb, ce qui rendrait le site actif de l'enzyme opérationnel. Cette liaison entraînerait leur autoprotéolyse. Ce phénomène serait soit intermoléculaire soit intramoléculaire et provoquerait la diminution de la concentration en calcium nécessaire à l'activation de la protéine (Cottin *et al.*, 2001).

Les calpaïnes ayant fixé le calcium opèrent une migration vers la membrane plasmique tout en exposant à leur surface leurs régions hydrophobes. Ces dernières interagiraient de ce fait avec les phospholipides membranaires (cf. chapitre Phospholipides), entraînant une diminution des exigences en calcium des protéases et une dissociation des deux sous unités (figure 3). De ce fait, deux phénomènes peuvent être envisageables : une dissociation directe des deux sous unités ou une auto-protéolyse des deux sous unités suivie d'une dissociation de ces dernières. Dans les deux cas, la sous unité catalytique active va pouvoir hydrolyser ses substrats soit au niveau membranaire soit après sa libération dans le cytosol. Cette théorie d'activation fait intervenir le domaine IV' de la sous unité de 30 kDa,

qui est un domaine riche en glycine/hydrophobe permettant l'interaction avec les membranes (Imajoh *et al.*, 1986). Enfin, il est à signaler que pour Garret *et al.* (1998), cette liaison aux membranes peut se faire en absence de calcium.

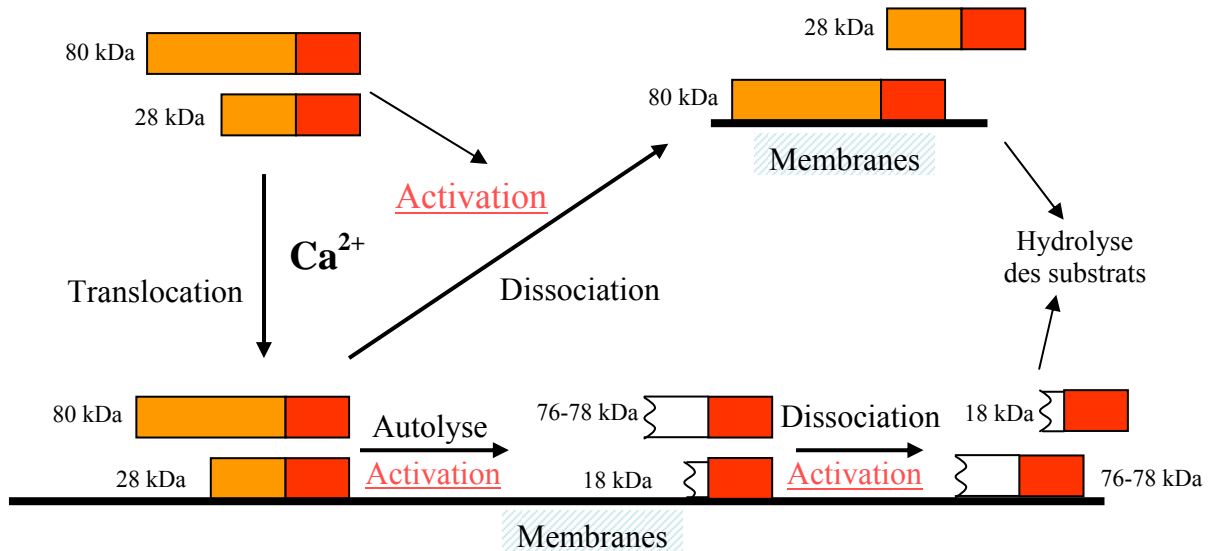


Figure 3 : Mécanismes d'activation des calpaïnes (d'après Suzuki *et al.*, 1998)

III. B. Les phospholipides et autres activateurs directs

Un problème majeur dans la compréhension de l'activation des calpaïnes reste la concentration en calcium intracellulaire qui est de loin inférieure aux concentrations déterminées *in vitro* pour leur activation (pour rappel, les concentrations en calcium nécessaires pour activer la μ -calpaïne sont de l'ordre du micromolaire et du millimolaire pour la m -calpaïne). Ainsi, d'autres régulateurs moléculaires pourraient intervenir.

Dans l'optique de déterminer des interactants susceptibles de diminuer la concentration en calcium nécessaire à l'activation des calpaïnes, Coolican et Hataway mettent en évidence en 1984 que certains phospholipides acides tels que la phosphatidylsérine (PS) et le phosphatidylinositol (PI) sont capables de diminuer de 25 fois la concentration en calcium nécessaire à l'autolyse de ces dernières. Il a même été suggéré que des phospholipides intracellulaires pourraient se lier à des protéines spécifiques pour permettre leur protéolyse par les calpaïnes (Fukami *et al.*, 1992). Le fait que les phospholipides puissent intervenir dans les mécanismes d'action des calpaïnes a donné lieu à un modèle d'activation au niveau des membranes (Kuboki *et al.*, 1987 ; Mellgren *et al.*, 1987). Il a même été décrit une activation

des calpaïnes pour des valeurs de concentration calcique proches du niveau physiologique suivant certaines concentrations en phospholipides (Chakrabarti *et al.*; 1996).

De plus, on sait que les calpaïnes possèdent en leur sein plusieurs sites de phosphorylation qui pourraient participer à la régulation de leur activité (la μ -calpaïne en possède 9 et la milli-calpaïne n'en possède que 8). Glading *et al.* ont montré en 2000 et en 2001 qu'une stimulation de cellules fibroblastiques par l'EGF (epidermal growth factor) entraîne l'activation de la voie ERK/MAP kinase. L'activation de cette voie conduirait à la phosphorylation de la m-calpaïne associée à une augmentation de son activité protéolytique. En revanche, certaines phosphorylations par la protéine kinase A (PKA) réduiraient fortement l'activité de la m-calpaïne (notamment sur la sérine 369 et la thréonine 370). Ces phosphorylations rigidifieraient la structure de la protéase, laissant le site actif en position fermé et donc inactif (Shiraha *et al.*, 1999, 2002).

Il a également été mis en évidence par Pontremoli *et al.* (1990) un activateur de la μ -calpaïne similaire à des « heat shock protein » (hsp) dans le cerveau de bœuf. Cet activateur se complexerait au calcium avant d'interagir avec la calpaïne.

Un autre activateur connu est l'ACBP (« acyl-CoA binding protein »). En effet, cette protéine, mise en évidence par Melloni *et al.* en 2000 comme activateur potentiel de la milli-calpaïne, formerait un complexe membranaire avec cette dernière dans le muscle squelettique de rat. Ce complexe permettrait de diviser par 50 la concentration en calcium nécessaire à son activation. L'ACBP est un homodimère de 20 kDa qui agirait sur la liaison calpaïne/calpastatine. Il a été également démontré récemment que l'ACBP activerait également la μ -calpaïne lors de la mort cellulaire (Shulga & Pastorino, 2006).

Certaines autres protéines membranaires telles que la phospholipase C, seraient susceptibles de participer à l'activation des calpaïnes (Inomata *et al.*, 1990, 1995).

Enfin, l'ADN permettrait l'activation de la m-calpaïne à de faibles concentrations en calcium entraînant la dégradation des protéines nucléaires (Mellgren *et al.*; 1993).

III. C. La calpastatine

Afin d'éviter une protéolyse anarchique qui serait délétère pour la cellule, l'activité et l'expression des calpaïnes sont fortement régulées. Ainsi, un des facteurs impliqué dans la régulation négative des calpaïnes est la calpastatine (l'inhibiteur endogène des calpaïnes).

La calpastatine a été découverte lors des premières expériences de purification de la m-calpaïne (Dayton *et al.*, 1976). Elle a très vite été décrite comme une protéine résistante à la chaleur (jusqu'à 100 °C), à l'urée et au SDS. La calpastatine (CAST) est codée par un gène unique *cast*, situé sur le chromosome 5 chez l'homme. Malgré son unique gène, la calpastatine possède huit isoformes identifiées dans différents tissus et il n'est pas rare de trouver plusieurs de ces isoformes dans le même tissu (Geesink *et al.*; 1998). L'utilisation de quatre promoteurs différents (Raynaud *et al.*; 2005) et des mécanismes d'épissage alternatif (Lee *et al.* ; 1992 , Takano *et al.*. 1999) entraînent la synthèse de ces différentes isoformes.

En raison de sa structure non globulaire, la calpastatine migre de façon anormale sur SDS-PAGE. Ce problème, ainsi que l'existence des huit isoformes de tailles différentes, a entraîné un grand nombre d'erreurs sur la détermination de sa masse moléculaire. Ainsi, des études rapportent une masse moléculaire comprise entre 34 kDa et 200 kDa. La forme la plus fréquemment exprimée dans le muscle squelettique humain (type III) migre aux alentours de 135 kDa alors que sa masse moléculaire réelle est de 77 à 78 kDa.

La séquence protéique de la calpastatine n'est homologue à aucune autre séquence protéique connue (même si on inclut la cystatine qui est un inhibiteur de nombreuses protéases à cystéine). Elle se compose de 4 domaines répétés (domaine I à IV) précédés d'un domaine N-terminal, le domaine L (voir figure 4). De plus, certaines isoformes comprennent un domaine appelé XL, placé en N-terminal du domaine L.

Le domaine L comprend de nombreux résidus basiques, ce qui permettrait à la calpastatine de se lier à la membrane, lieu privilégié de l'activation des calpaïnes (Mellgren, 1988). Ce sont les domaines I à IV qui possèdent l'activité inhibitrice. Des études ont montré que chacun de ces domaines peut inhiber une molécule de calpaïne. Ainsi, la calpastatine serait capable d'inhiber 4 molécules de calpaïnes (Emori *et al.*, 1988). Mais en réalité, les domaines I à IV n'ont pas la même efficacité dans l'inhibition des calpaïnes ubiquitaires ; le domaine I serait le plus efficace suivi du domaine IV, puis III et enfin II (Kawasaki *et al.*, 1989).

Chacun des quatre domaines inhibiteurs de la calpastatine est composé de trois sous-domaines A, B et C (figure 4). Les domaines A et C ne possèdent pas d'activité inhibitrice (Ma *et al.*, 1994) ils permettraient la liaison aux calpaïnes au niveau des domaines IV et VI (Todd *et al.*, 2003 et figure 5). Le sous-domaine B serait responsable de l'activité inhibitrice de la calpastatine (sa délétion entraîne la perte d'activité de cette dernière). Le mécanisme d'inhibition des calpaïnes par ce sous-domaine reste assez mal connu mais une séquence

protéique hautement conservée a été identifiée (TIPPXYR) ; en revanche, cette séquence seule ne permet pas l'inhibition des calpaïnes.

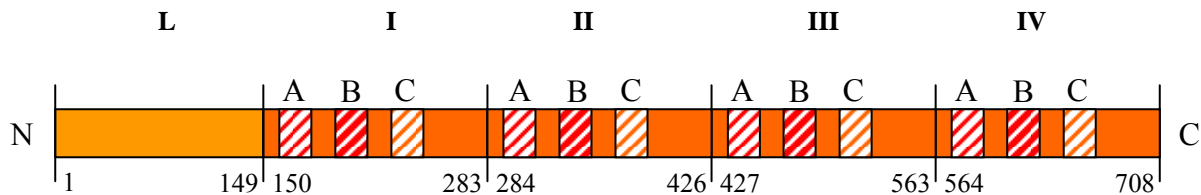


Figure 4 : Structure schématique de la calpastatine humaine (adapté de Wendt *et al.*, 2004)

L'inhibition des calpaïnes par la calpastatine est un phénomène dépendant du calcium (Cottin *et al.*, 2000) et réversible. En effet, l'ajout d'EDTA (agent chélateur des ions divalents) entraîne la dissociation du complexe calpaïne/calpastatine (Kapprell & Goll, 1989 ; Otsuka & Goll, 1987). Les concentrations en calcium nécessaires à l'interaction calpaïne/calpastatine sont inférieures à celles nécessaires pour l'activation des calpaïnes (40 μM pour la μ - et entre 250 et 500 μM pour la m-calpaïne). Il n'y a aucune évidence montrant que la calpastatine est capable de lier le calcium, ce dernier étant requis pour opérer un changement conformationnel des calpaïnes (figure 5).

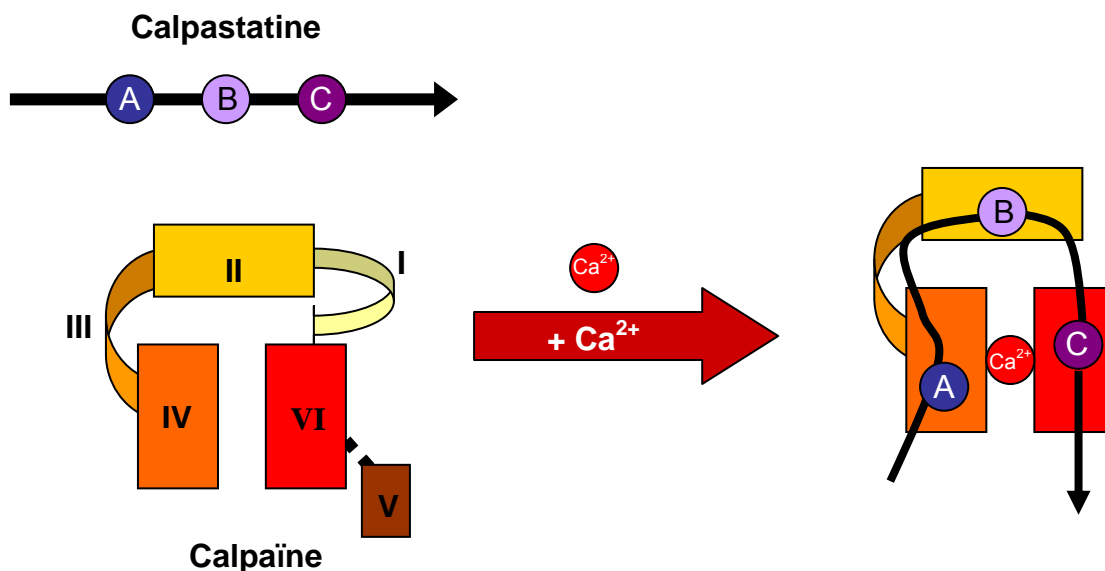


Figure 5 : Représentation schématique du modèle d'interaction calpastatine/calpaïne (d'après Todd *et al.*, 2003)

Malgré ces données, le mode d'inhibition exact des calpaïnes par la calpastatine est mal connu *in vivo*. Deux théories s'opposent : certains auteurs proposent une inhibition non compétitive (Cottin *et al.*, 1983), d'autres auteurs privilégient plutôt une inhibition compétitive (Maki *et al.*, 1988). Des données récentes ont montré que la calpastatine bloquerait la clé catalytique des dimères de calpaïnes afin de supprimer leur activité protéolytique (Moldoveanu *et al.*, 2008).

La calpastatine et les calpaïnes ne sont pas colocalisées au niveau cellulaire et la quantité de calpastatine n'est pas en excès par rapport à celle des calpaïnes. Ceci suggère plus une atténuation de l'activité des calpaïnes par la calpastatine plutôt qu'une inhibition permanente. En effet, la mobilisation du calcium intracellulaire provoque aussi la déphosphorylation, puis la délocalisation de la calpastatine favorisant l'interaction calpaïne/calpastatine (Averna *et al.*; 1999, 2001, 2003).

IV. Substrats et fonctions physiologiques des calpaïnes ubiquitaires

Il a été identifié *in vitro* plus d'une centaine de protéines substrats des calpaïnes ubiquitaires. Nous pouvons classer ces diverses protéines en quatre catégories : des protéines cytosquelettiques (myosine, titine, desmine, tubuline...), des enzymes (protéine kinase C, phospholipase C, caspases...), des protéines membranaires (cavéoline 3, MARCKS, intégrine $\beta 3$...) et des facteurs de transcriptions (myogénine, p53, c-Jun...).

Au vue de cette grande diversité de substrats, les calpaïnes ubiquitaires seraient impliquées dans de nombreux processus biologiques comme le contrôle du cycle cellulaire (Raynaud *et al.*, 2004), la différenciation cellulaire (Cottin *et al.*, 1994, Moyen *et al.* 2004), la régulation de l'expression génique, l'apoptose et/ou la nécrose cellulaire. En outre, une des fonctions la mieux caractérisée des calpaïnes ubiquitaires est leur implication dans la régulation du cytosquelette et des adhésions focales au cours de la fusion des myoblastes et de la migration cellulaire (Glading *et al.*; 2002, Mazères *et al.*; 2006, Leloup *et al.*; 2006,2007).

Toutefois, les mécanismes d'action des calpaïnes lors de tous ces processus restent encore mal connus.

V. Pathologies liées aux calpaïnes : les calpaïnoopathies

Les calpaïnes étant impliquées dans de nombreux phénomènes physiologiques, il n'est pas surprenant qu'elles soient également associées à de nombreuses pathologies parfois très sévères. Parmi ces pathologies, seules trois d'entre elles sont liées à une mutation d'un gène des calpaïnes : la LGMD2A (calpaïne 3, voir chapitre 4), le cancer de l'estomac (calpaïne 9 ; Liu *et al.*, 2000) et le diabète de type II (calpaïne 10 ; Orho-Melander *et al.*, 2002). Les autres calpaïnoopathies sont associées à un dérèglement de l'homéostasie calcique entraînant une dérégulation de l'activité des calpaïnes (suractivation en général). De plus, une modification du ratio calpastatine/calpaïnes peut entraîner un phénomène similaire. L'implication des calpaïnes a été observée dans de nombreuses pathologies qui atteignent différents tissus et organes. Ainsi, les dystrophies musculaires (voir chapitre 4) ; la maladie d'Alzheimer (Grynspan *et al.*, 1997), de Parkinson (Mouatt-Prigent *et al.*, 2000) et de Huntington (Gafni & Ellerby, 2002) ; la cataracte (Huang & Wang, 2001) ; les ischémies cérébrales et cardiaques (Neumar *et al.*, 1996) ; les cancers et invasions tumorales (Mamoune *et al.*, 2003 ; Carragher *et al.*, 2002) sont des exemples de maladies où les calpaïnes présentent une activité anormalement élevée. Une protéolyse calcium-dépendante élevée est donc impliquée dans de nombreux états pathologiques, toutefois, elle semble être la conséquence de dérégulations induites par différents facteurs plutôt que la cause directe de la pathologie.

Des études électrophysiologiques et comportementales ont permis de mettre en évidence des altérations dans les phénomènes de plasticité chez les souris âgées qui seraient à l'origine de troubles de certaines fonctions cognitives. Ces déficits mnésiques observés au cours du vieillissement normal sont exacerbés dans la maladie d'Alzheimer. Deux événements majeurs intervenant lors de la maladie d'Alzheimer ont pu être identifiés. Tout d'abord la production anormale de peptides β -amyloïde à partir de la protéine précurseur β -amyloïde (APP), leur accumulation au sein de plaques séniles au niveau des lésions et leur libération hors de la cellule induisent des altérations de l'homéostasie calcique. D'autre part, une hyperphosphorylation de la protéine tau empêche son association avec les microtubules et conduit à son accumulation dans la cellule sous forme d'agrégats. Il a été mis en évidence qu'une sur-activation des calpaïnes serait à l'origine de l'activation de la kinase qui phosphoryle tau, la cdk5 (cyclin dependent kinase 5), en induisant une conversion de son

propre activateur, la protéine p35 (p35 devient p25). L'activation de la cdk5 dépendante de la protéine p25 et l'hyperphosphorylation de tau qui en résulte conduiraient à l'accumulation anormale de neurofilaments et à la mort cellulaire qui s'en suit (Vanderklis & Bahr, 2000).

Lors du vieillissement, la lentille cristalline subit de nombreuses altérations, dues essentiellement aux agressions extérieures comme les rayonnements ultra-violet, les toxines environnementales, les radicaux libres mais aussi une concentration élevée en sucre (diabète). Il en résulte une perte d'intégrité des membranes avec une augmentation de la perméabilité aux ions dont le calcium. Les calpaïnes activées seraient responsables de la fragmentation puis de la précipitation des protéines du cristallin conduisant à l'opacité de la lentille (Shearer *et al.*, 2000). Chez les rongeurs, les variants de la p94 spécifiques du cristallin (Lp82 et Lp85) sont activés lors de cataractes expérimentales, toutefois ces variants n'étant pas présents chez l'homme d'autres isoformes contribueraient à la formation de cette maladie chez l'homme.

Parmi les substrats des calpaïnes un nombre important est impliqué dans le développement de cancers, ils incluent des produits d'oncogène, et des suppresseurs de tumeurs tels c-fos, c-jun, p53, pp60src mais aussi comme nous l'avons déjà souligné, des molécules d'adhésion comme les intégrines. En plus de l'implication des calpaïnes dans les processus généraux que sont le déroulement du cycle cellulaire, la différenciation et l'apoptose, de nombreuses études corrélient leur activation anormale au développement de tumeurs dans divers tissus. En outre, une étude récente associe une diminution d'expression de la calpaïne 9 dans des tissus et des lignées de cellules provenant de tumeurs gastriques (Yoshikawa *et al.*, 2000). La protéase pourrait alors être considérée comme un nouveau type de suppresseur de tumeurs probablement *via* son action sur des oncogènes spécifiques du tractus digestif.

Le diabète de type II affecte une large population (5% environ). Une étude portant sur des sujets mexicains a révélé une corrélation entre la variabilité génétique du gène de la calpaïne 10 et la susceptibilité à développer un tel diabète (Horikawa *et al.*, 2000). Le polymorphisme observé dans l'intron 3 du gène de la calpaïne 10 est associé à une diminution des ARNm de la protéase dans les muscles et à une diminution du renouvellement du taux de sucre par la voie de l'insuline (Liu *et al.*, 2000). Une perte de fonction de la calpaïne 10 serait par conséquent associée à cette pathologie.

2^{ème} partie

Le muscle strié squelettique et les protéines associées

Le tissu musculaire est un des tissus les plus abondants chez les mammifères. Sa masse correspond à environ 40% de la masse totale corporelle. On peut distinguer trois types de muscles :

- Le muscles strié squelettique: représentant 30 à 35% du poids du corps d'un animal vivant. Il assure le maintien de la posture ainsi que les mouvements du corps grâce à son insertion sur les os *via* les tendons. Leurs contractions sont volontaires et répondent à un influx nerveux.

- Le muscle cardiaque : muscle strié, commandé par le système nerveux autonome, fonctionne en permanence pour assurer la circulation du sang et l'apport continu des nutriments et de l'oxygène aux tissus.

- Les muscles lisses : composés de cellules mononuclées, présents dans de nombreux organes comme les artères, les veines, l'utérus et les viscères. Ils ont des fonctions diverses mais toujours axées sur le maintien des structures et de l'élasticité.

Le muscle strié squelettique est un organe bien délimité et marqué par une très forte hétérogénéité structurale. Il est constitué par la juxtaposition de cellules, les fibres musculaires, enveloppées dans une gaine de pérysium, chaque fibre étant entourée par l'endomysium. L'ensemble du tissu est recouvert d'une trame conjonctive externe ou épimysium (figure 6). La principale protéine constitutive de ce tissu conjonctif est le collagène. Ces enveloppes de tissu conjonctif contiennent des neurofibres, nécessaires à l'excitation électrique permettant la contraction, des adipocytes constituant les réserves en lipides intramusculaires et des réseaux de vaisseaux sanguins et capillaires nécessaires à l'irrigation du muscle.

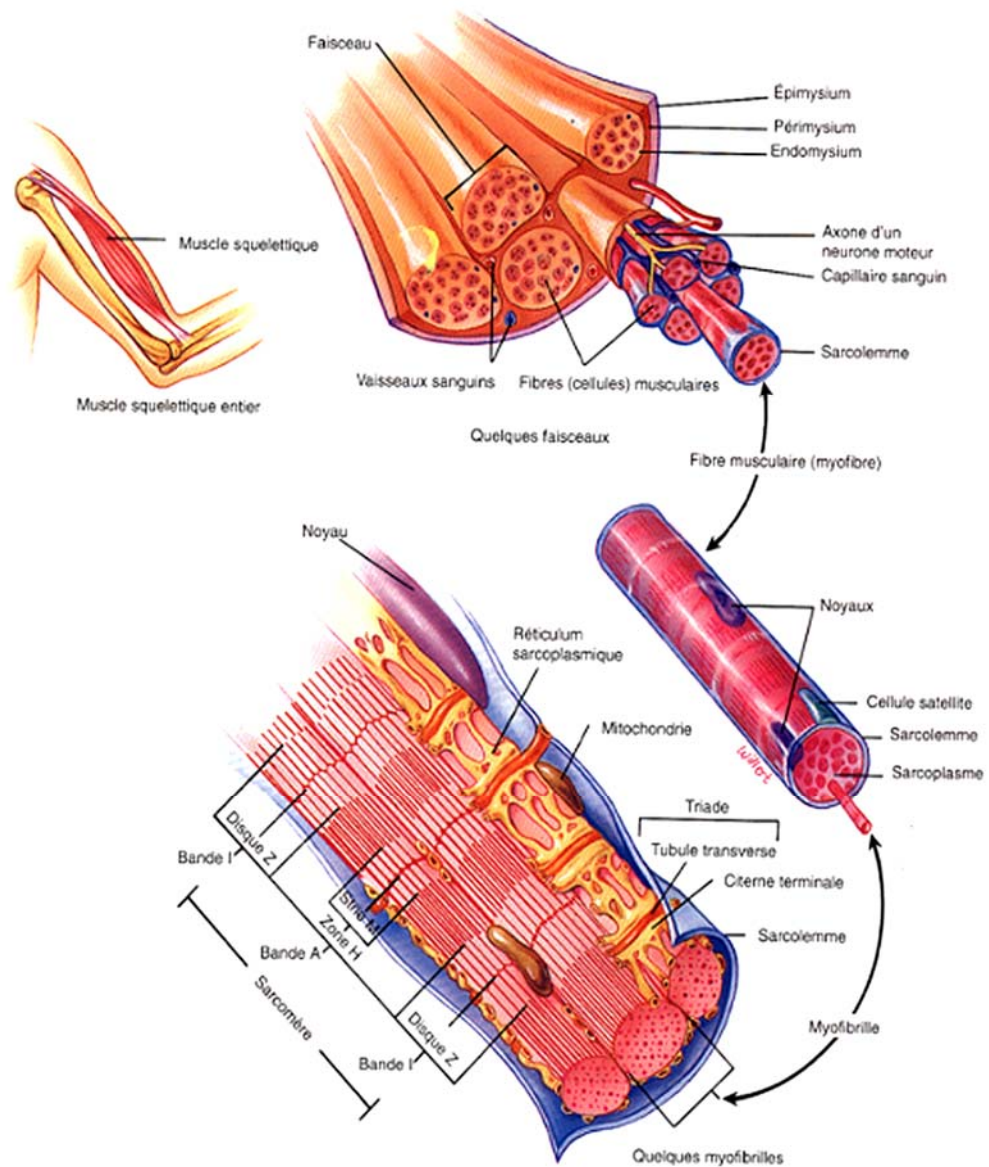


Figure 6 : Organisation générale de la structure et de la composition du muscle strié squelettique (adapté de Tortora *et al.*, 1994)

I Organisation cellulaire

La fibre musculaire est l'unité structurale essentielle de tous les muscles striés squelettiques. Elle présente une forme allongée pouvant mesurer jusqu'à une trentaine de centimètres. Chaque fibre musculaire est entourée, comme toute cellule, d'une membrane plasmique (appelée sarcolemme), qui abrite le sarcoplasme contenant les nombreux noyaux cellulaires, les mitochondries, le réticulum sarcoplasmique ainsi que d'autres organites plus ou moins spécialisés (figure 6) (Tortora *et al.*, 1994).

La fibre musculaire est plurinucléée et une grande partie de l'espace intracellulaire est occupée par les myofibrilles. Elles ont un diamètre d'environ 1-2 μm et peuvent s'étendre sur toute la longueur de la fibre musculaire. Elles occupent 80% du volume cellulaire (les 20% restant sont occupés par les mitochondries, le réticulum sarcoplasmique, les noyaux et autres organites du sarcoplasme). Les myofibrilles représentent les éléments contractiles des cellules du muscle squelettique, elles sont constituées de petites sous unités : les myofilaments qui sont parallèles au grand axe de la myofibrille (figure 6). En microscopie photonique, les myofibrilles apparaissent formées d'une succession de bandes claires et sombres (figure 7). Ces bandes sont situées au même niveau pour l'ensemble des myofibrilles d'une même fibre, si bien que la cellule possède un aspect strié caractéristique. En lumière polarisée, les bandes sombres sont fortement biréfringentes, d'où leur nom de bandes anisotropes (polarisant la lumière visible) ou bandes A, riches en filaments de myosine; les bandes claires ne sont que très faiblement biréfringentes, ce sont les bandes isotropes (non polarisantes) ou bandes I, riches en filaments d'actine. Chaque zone est divisée en deux par une ligne sombre, la ligne M. Au milieu des bandes I, on remarque également une zone plus foncée que l'on nomme strie Z (figure 7). La portion de myofibrille comprise entre deux stries Z est appelée sarcomère. En plus de l'actine et de la myosine, ce dernier contient deux autres réseaux de filaments : la titine et la nébuline.

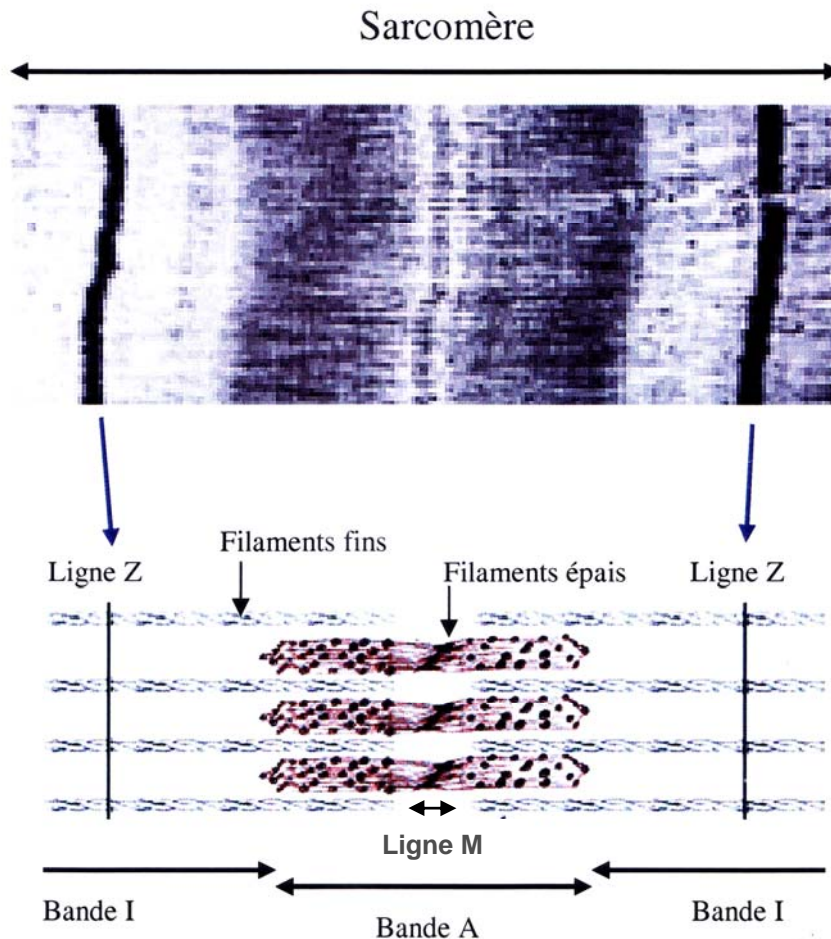


Figure 7 : Structure du sarcomère

I.A. Le sarcomère, unité de base de la fibre musculaire :

La bande I comprend les filaments d'actine, ancrés au niveau du disque Z grâce à l' α -actinine 2 et 3 (North & Beggs, 1996). Ces filaments s'étendent jusque dans la bande A où ils se lient aux filaments de myosine (figure 8). Les filaments d'actine sont constitués de deux hélices alpha enroulées, issues de la polymérisation de monomères d' α -actine. Les filaments d'actine sont associés aux protéines régulatrices de tropomyosine (Wegner, 1979) et de troponines I, C et T (Ebashi et al., 1966a,b) et ont pour protéines chaperonnes la tropomoduline et CapZ (Babcock et al., 1994).

La bande A comprend les molécules de myosine (figure 8). Celles-ci sont composées de deux chaînes lourdes et de quatre chaînes légères. Classiquement, la myosine est décrite comme possédant une tête et une queue. La tête, qui est constituée de l'extrémité N-terminale de la chaîne lourde et les chaînes légères, interagit avec l'actine et constitue le domaine moteur. L'extrémité C-terminale des chaînes lourdes s'ancre au niveau de la bande M. Il existe de nombreuses isoformes des chaînes lourdes et légères, dont l'expression varie suivant

le type de muscle. Les filaments de myosine sont associés aux protéines MyBP (Myosine Binding Proteins) C et H (Okagaki *et al.*, 1993). Elles mêmes possèdent différentes isoformes variant suivant le type de muscle (Takano-Ohmuro *et al.*, 1989). Elles ont une forte affinité pour la myosine et participent au bon déroulement de sa polymérisation. Un deuxième partenaire de la myosine est l'AMP-déaminase qui est impliquée dans la régulation du métabolisme de l'adénosine, et est activée au cours de la contraction musculaire (Rundell *et al.*, 1992).

La titine (Maruyama *et al.*, 1977) est une protéine filamenteuse élastique géante de 3000 kDa qui s'étend du disque Z (par son extrémité N-terminale) dans sa totalité (Gregorio *et al.*, 1998) à la ligne M (par son extrémité C-terminale) (figure 8). C'est la troisième protéine la plus abondante dans le muscle squelettique et elle représente 10 % de la masse myofibrillaire. On trouve à son extrémité N-terminale un domaine composé de plusieurs répétitions de 45 acides aminés correspondant à des sites de fixation de l' α -actinine (Ohtsuka *et al.*, 1997). Les myofibrilles possèdent, en plus de leur aptitude à générer des forces actives, une force passive. En condition d'étirement ou de raccourcissement non lié à une activité mécanique, les positions relatives des filaments épais et fins sont maintenues. Il est admis que cette propriété est due à la structure particulière de la titine dans la bande I. Dans la bande A, la titine joue un rôle de régulateur de l'activité mécanique en influençant la fixation des têtes de myosine sur l'actine (Muhle-Goll *et al.*, 2001). Enfin, dans la ligne M, la titine comprend un domaine actif de type sérine/thréonine kinase (Labeit & Kolmerer, 1995). L'activation de ce domaine est dépendante de la phosphorylation d'un résidu tyrosine et de la fixation de la calmoduline (Mayans *et al.*, 1998). L'activité kinase de la titine serait impliquée dans la myofibrillogénèse. La protéine p94 (ou calpaïne 3) est également un partenaire de la titine au niveau de la ligne M et de la ligne Z. Cette interaction permettrait la stabilisation de la calpaïne 3 en évitant son autolyse (Ono *et al.*, 2006) et rapprocherait la calpaïne 3 de ses substrats potentiels.

La nébuline est également une protéine géante du sarcomère d'un poids moléculaire allant de 600 à 900 kDa (figure 8). Son extrémité C-terminale se fixe au niveau du disque Z et la molécule de nébuline s'étend jusqu'à l'extrémité des filaments d'actine (McElhinny *et al.*, 2001). Elle n'a pas de propriété élastique contrairement à la titine, ce qui lui confère une structure inextensible. Elle jouerait un rôle de matrice pour la mise en place de la bande I et sa longueur dicterait la longueur des filaments d'actine (Kruger *et al.*, 1991). Elle est capable de lier la myosine, l'actine et la calmoduline.

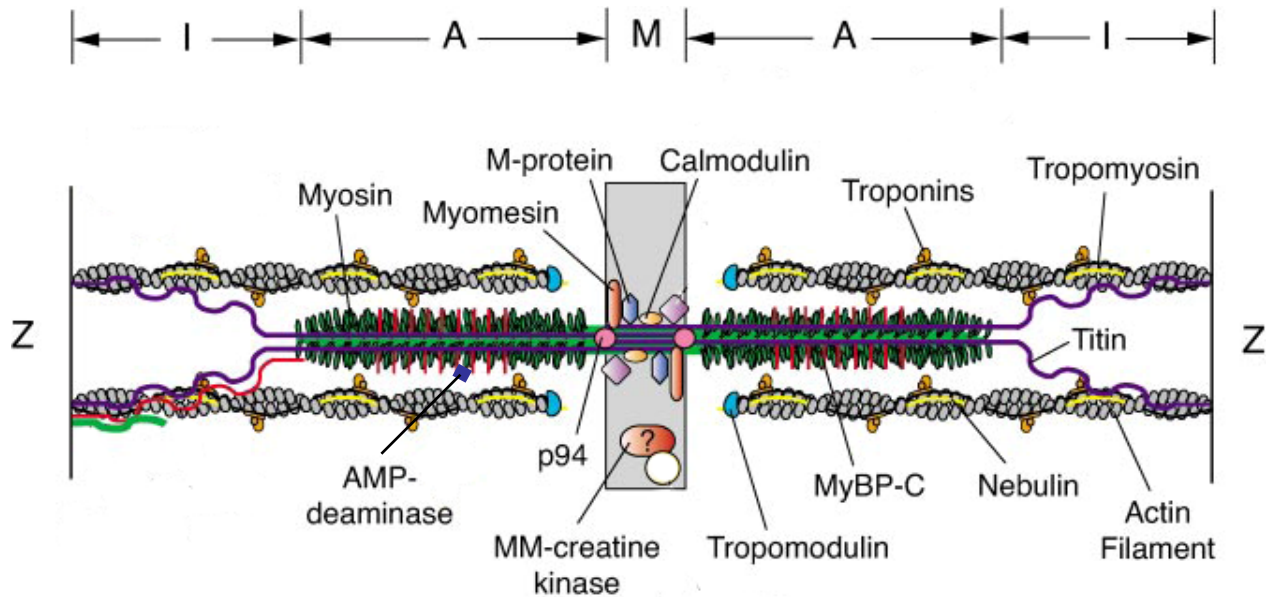


Figure 8 : Organisation moléculaire du sarcomère
(adapté de Clark *et al.*, 2002)

I.B. Le sarcolemme

Le sarcolemme est une structure continue qui parcourt la fibre musculaire et contribue à l'intégrité mécanique du muscle. La force de contraction qui est transmise par les myofibrilles traverse le sarcolemme en direction de la matrice extracellulaire, le sarcolemme est donc exposé à un stress mécanique intense nécessitant une structure très forte. Au niveau de la membrane, la connexion entre les compartiments intracellulaires et extracellulaires se fait grâce à un complexe transmembranaire associant la dystrophine et plusieurs protéines situées à l'intérieur de la cellule à divers protéoglycanes transmembranaires. Ces régions de jonctions situées le long de la surface du sarcolemme sont nommées costamères et/ou jonctions myotendineuses (figure 9).

Les costamères, analogues aux contacts focaux, permettent l'attachement des filaments d'actine intracellulaires aux protéines de la matrice extracellulaire (MEC), en particulier à la fibronectine, dont les intégrines de la membrane plasmique constituent les récepteurs. Ils constituent des structures organisées périodiquement au niveau des disques Z et des lignes M. Ils se situent latéralement en périphérie des fibres musculaires et sont composés de trois réseaux distincts mais liés entre eux : le système intégrine, le complexe dystroglycane et le système spectrine (figure 9).

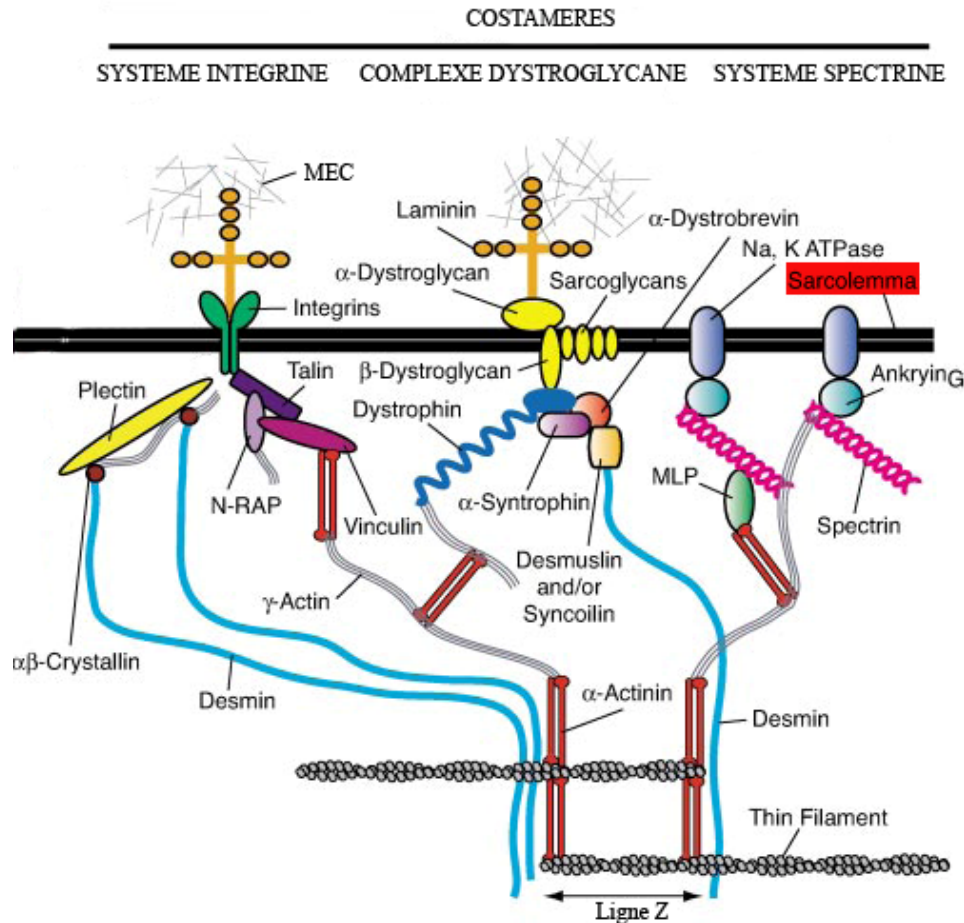


Figure 9 : Structure des costamères au niveau du sarcolemme
(adapté de Clark *et al.*, 2002)

Le sarcolemme présente une particularité unique dans le tissu musculaire puisqu'il se prolonge vers l'intérieur de la cellule et fusionne avec le réticulum sarcoplasmique pour former un réseau de tubules transversaux, appelés tubules transverses ou tubules T (figure 10). La fonction des tubules T est de conduire les impulsions électriques délivrées par la plaque motrice de la surface de la fibre vers l'intérieur de la cellule musculaire.

I.C. Le réticulum sarcoplasmique (SR) : homéostasie calcique et contraction musculaire

Le réticulum sarcoplasmique est une extension du réticulum endoplasmique du muscle qui forme un réseau de tubules et de citernes. Sa fonction principale dans les myofibrilles est de stocker et de relarguer le Ca^{2+} , ce qui correspond respectivement à la relaxation et la

contraction du muscle. Le transport du calcium est assuré par des canaux calciques présents dans sa membrane tel que le récepteur à la ryanodine 1 (Ryr1) (Martonosi & Pikula, 2003). Une impulsion nerveuse cause une dépolarisation du sarcolemme qui est relayée à l'intérieur de la cellule par les tubules T. Ce sont les récepteurs dihydropyridine (DHPR), capables de se lier à Ryr1, qui contrôlent et permettent le relargage du Ca^{2+} dans le sarcoplasme (figure 10). Ce processus se nomme VICR (voltage induced calcium release) dans le muscle strié squelettique (Schneider, 1994). Le Ca^{2+} ainsi relargué dans le sarcoplasme se lie à la troponine C, ce qui permet aux filaments d'actine et de myosine de glisser l'un à la surface de l'autre et de provoquer un raccourcissement du sarcomère à l'origine de la contraction musculaire et la génération de force (Catterall, 1991). Des pompes à Ca^{2+} du réticulum endo/sarcoplasmique (SERCA) recaptent le Ca^{2+} sarcoplasmique qui est alors pris en charge par la calsequestrine (CSQ) dans la lumière du réticulum sarcoplasmique. Ce processus permet de réguler la concentration en Ca^{2+} et également de contrôler l'activité de Ryr1 (Ikemoto *et al.*, 1989). On note également la présence de la mitsugumine29 (MG29) (Takeshima *et al.*, 1998) et de la junctophyline (JP), protéines permettant le maintien de l'intégrité des membranes à la jonction sarcolemme/réticulum sarcoplasmique (Takeshima *et al.*, 2000 ; figure 10).

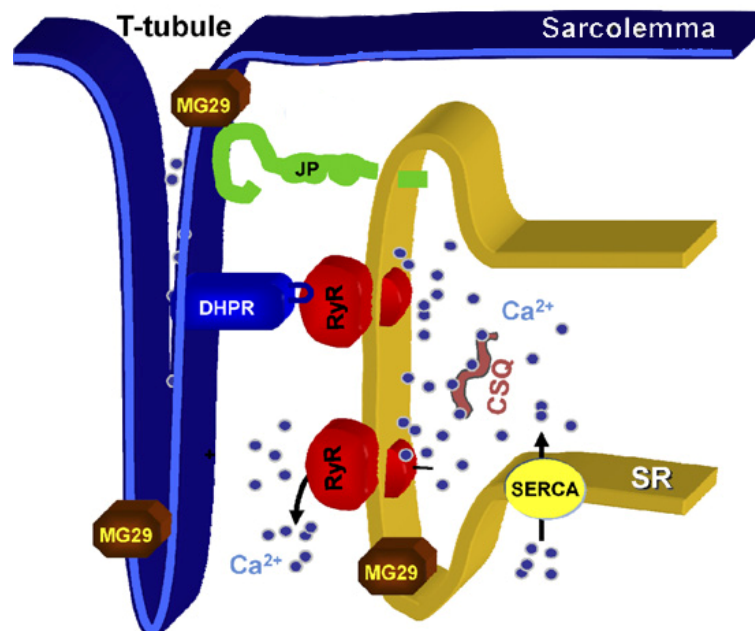


Figure 10 : Structure schématique de la jonction tubule T/SR
(adapté de Weisleder & Ma, 2008)

II Les différents types de fibres musculaires

Les fibres musculaires peuvent être classées selon leur couleur, leurs propriétés métaboliques ou leurs propriétés contractiles (tableau II). Les études sur le muscle squelettique ont révélé l'existence de deux types majeurs de fibres musculaires : d'un côté les fibres oxydatives, rouges à contraction lente de type I et de l'autre les fibres glycolytiques, blanches de type II à contraction rapide.

Les muscles entiers sont constitués d'un grand nombre de fibres musculaires organisées en unités motrices. Une unité motrice représente l'ensemble des fibres innervées par un même motoneurone. Ces fibres ne sont pas forcément voisines les unes des autres, bien qu'appartenant au même muscle. Toutes les fibres d'une même unité motrice appartiennent au même type de fibres musculaires. En revanche, un muscle est constitué la plupart du temps de l'association de deux ou trois types de fibres. C'est le type de fibre prédominant qui confère alors les caractéristiques essentielles du muscle. Les fibres rouges sont retrouvées dans les muscles qui ont une activité répétitive et de longue durée et les fibres blanches sont associées à des activités puissantes, brèves et intenses. Il a été rapporté dans les fibres de type I que l'activité phosphorylase et l'activité de l'ATPase myofibrillaire sont basses et qu'il existe une teneur élevée en enzymes mitochondriales; le contraire est observé dans les fibres de type II. A l'évidence, l'activité ATPase myofibrillaire dépend des propriétés mécaniques des fibres, particulièrement la vitesse de contraction.

Les fibres musculaires peuvent être encore analysées sur leur capacité métabolique oxydative. Sur ce critère, trois types de fibres sont mis à jour : des fibres à contraction lente et à métabolisme oxydatif (SO), des fibres à contraction rapide et à métabolisme oxydatif et glycolytique (FOG) et des fibres à contraction rapide et à métabolisme glycolytique (FG) (Picard *et al.*, 2002).

Une troisième manière de classer les fibres musculaires est d'isoler les isoformes de la chaîne lourde de la myosine (MyHC) par électrophorèse. Les fibres de types I, IIa et IIb expriment respectivement les isoformes MyHC-I, MyHC-IIa et MyHC-IIb (Schiaffino *et al.*, 1989). Il est à noter que l'utilisation d'anticorps spécifiques de MyHC a permis de révéler qu'il existait également des fibres hybrides qui renferment plusieurs isoformes de MyHC simultanément (Picard *et al.*, 2002).

Caractéristiques	Fibres de type I	Fibres de type IIa	Fibres de type IIb
<i>Caractéristiques fonctionnelles</i>			
Vitesse de contraction	Lente	Rapide	Rapide
Force de contraction	Faible	Elevée	Elevée
<i>Caractéristiques structurales</i>			
Isoforme de MyHC	MyHC I	MyHC IIa	MyHC IIb
Réticulum sarcoplasmique	Petit	Grand	Grand
Mitochondrie	Nombreuses	Nombreuses	Peu nombreuses
Vascularisation	Forte	Forte	Faible
<i>Caractéristiques métaboliques</i>			
Contenu en myoglobine	Elevé	Elevé	Faible
Métabolisme oxydatif	Elevé	Elevé	Faible
Réserve de glycogène	Faible	Elevée	Elevée
Activité glycolitique	Faible	Elevée	Elevée
Résistance à la fatigue	Elevée	Intermédiaire	Faible

Tableau II : Caractéristiques fonctionnelles, structurales et métaboliques des fibres musculaires chez l'homme

3^{ème} partie**Myogenèse et régénération musculaire**

La myogenèse se définit comme l'ensemble des étapes requises à la formation et au développement du système musculaire ainsi qu'à sa régénération. Comme le montre la figure 11, les principales étapes de la différenciation musculaire au cours du développement ou de la régénération sont contrôlées par des MRF (Myogenic Regulatory Factor). Ces MRF couplés à de nombreux cofacteurs, contrôlent l'expression de gènes nécessaires à l'établissement des propriétés contractiles propres aux cellules musculaires squelettiques matures. Il en existe une forme chez tous les invertébrés (comme la drosophile ou les nématodes) ; en revanche, les vertébrés en possèdent quatre formes (Atchley *et al.*, 1994) qui sont : MyoD, Myf5, Myogénine et Mrf4.

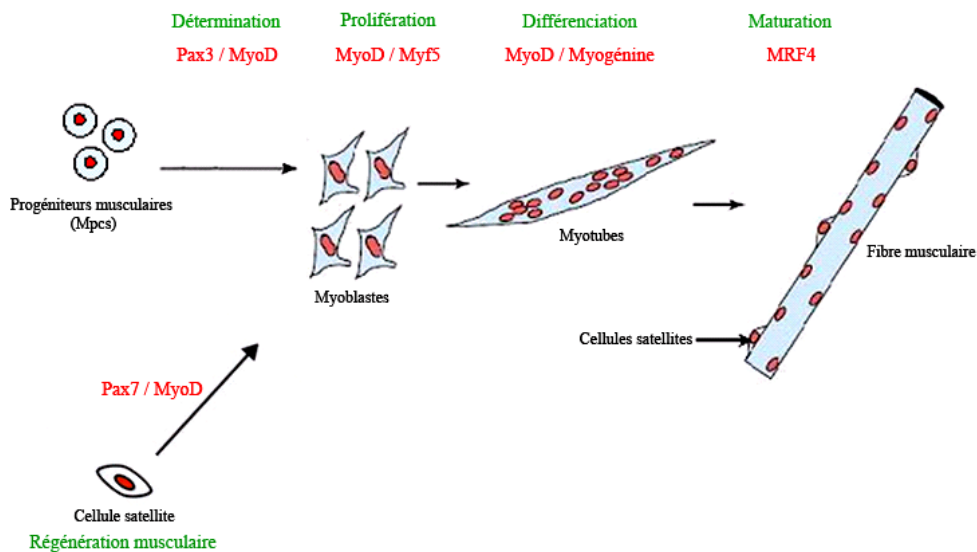


Figure 11 : La différenciation myogénique

I La myogenèse

Le phénomène de différenciation myogénique est le mécanisme par lequel les myoblastes (cellules fusiformes mononuclées) fusionnent pour donner naissance à des myotubes multinuclées formant plus tard les fibres musculaires (figure 11). La myogenèse a lieu au cours du développement embryonnaire à la suite de la somitogénèse, par spécification des cellules du myotome. Les différentes étapes constituant cette différenciation myogénique ont été caractérisées *in vitro* il y a plus de cinquante ans par Holtzer et ses collaborateurs en 1957. Ces différentes étapes sont identiques quelque soit la provenance des myoblastes du moins dans les stades précoces de la myogenèse (figure 11 ; Ludolph & Konieczny, 1995 ; Walsh & Perlman, 1997).

C'est l'expression des facteurs myogéniques Myf5 et MyoD qui va marquer l'acquisition du phénotype musculaire et la différenciation en myoblastes (les précurseurs somitiques ne sont pas considérés comme étant déterminés avant d'exprimer Myf5 (Perry & Rudnick, 2000). Les myoblastes sont des cellules qui ont une forte activité mitotique. Cette phase de prolifération est contrôlée par des facteurs de transcription (c-Fos et c-Jun) et par des facteurs de croissance (FGF pour fibroblast growth factor et TGF- β pour transforming growth factor β). Après cette phase de prolifération, le facteur myogénique MyoD va induire l'expression de la protéine p21, inhibiteur des cyclin-dépendent kinases (Cdk), responsable de l'activation de la protéine Rb et de l'arrêt du cycle cellulaire en phase G0 (Halevy et al., 1995 ; Olson & Perry, 1992). On remarquera également une diminution de l'expression des facteurs de croissance. Les myoblastes vont alors migrer, s'aligner et fusionner pour donner des myotubes (Wakelam, 1985).

A l'intérieur des myotubes, les myofibrilles vont s'organiser (myofibrillogenèse), leur agencement en sarcomères est observé dans les fibres musculaires matures. Cette maturation est rendue possible grâce à des réarrangements du cytosquelette, à la relocalisation des noyaux à la périphérie et à la mise en place d'une nouvelle architecture cellulaire. Il est à noter la présence de cellules souches myogéniques qui sont associées aux fibres musculaires et qui participent à la régénération musculaire lors d'une blessure, ce sont les cellules satellites (voir II de ce chapitre).

I.A. Les facteurs de transcriptions myogéniques (MRF)

Les MRF possèdent un domaine de type bHLH servant à la dimérisation avec les facteurs de transcription de type E et un domaine basique permettant la fixation à l'ADN. Cet hétérodimère MRF-E (Berkes & Tapscott, 2005) va se fixer à une séquence consensus (CANNTG) appelée E-box, et que l'on retrouve dans beaucoup de promoteurs de gènes spécifiques du muscle. Les MRF sont au nombre de 4 : MyoD, myogénine, Myf5 et MRF4.

Certaines protéines sont capables d'amplifier l'action des MRF. On trouve notamment des facteurs de transcription tels que SRF (serum-response factor, Treisman, 1992), Sp1 (Biesiada *et al.*, 1999), p300 (Eckner *et al.*, 1994) ou le complexe TFIID (Heller & Bengal, 1998). Parmi ces facteurs de transcription, on trouve la famille des MEF-2 (myocyte enhancer factor-2), comprenant quatre facteurs qui assistent les MRF dans la régulation de l'expression de certains gènes spécifiques du muscle (Black *et al.*, 1998). Le site de fixation de MEF-2 sur l'ADN est souvent proche des E-box, ce qui permettrait l'interaction avec les complexes MRF/protéines E et d'augmenter la transactivation des MRF (Wasserman & Fickett, 1998). D'autres activateurs assisteraient les MRF lors de la différenciation musculaire tels que MLP (muscle LIM protein, Arber *et al.*, 1994), Sp1 (Biesiada *et al.*, 1999) et AP1 (Kong *et al.*, 1997).

Les facteurs de croissance influencent également l'expression et/ou l'activité des MRF. L'IGF1 (insulin-like growth factor) stimule la myogenèse en augmentant l'expression de la myogénine et de MyoD (Tiffin *et al.*, 2004) et TGF- β 1 inhibe la différenciation musculaire en s'opposant à l'activité des MRF (Liu *et al.*, 2001).

La cellule possède également des facteurs de régulation négatifs de la myogenèse. C'est le cas notamment des protéines Id (Inhibitor of DNA binding) qui, grâce à leur structure HLH s'associent avec les produits de la famille E2 (Lassar *et al.*, 1991). Cette compétition pour la formation d'hétérodimères avec les MRF réduit la quantité de ces facteurs capables de se fixer à l'ADN. L'activité des MRF peut aussi être régulée négativement par phosphorylation, c'est le cas de la myogénine qui après phosphorylation par la PKC perd sa capacité de fixation à l'ADN (Li *et al.*, 1992).

On distingue plusieurs catégories de gènes cibles activés par les MRF : des gènes codant pour des facteurs de transcription (MEF-2, Six...), des régulateurs du cycle cellulaire (p21...) et des protéines structurales du muscle (Myosine...). Certains MRF peuvent également réguler l'expression d'autres MRF : c'est le cas de MyoD qui régule l'expression de la myogénine.

I.B. Implication des calpaïnes dans la myogénèse

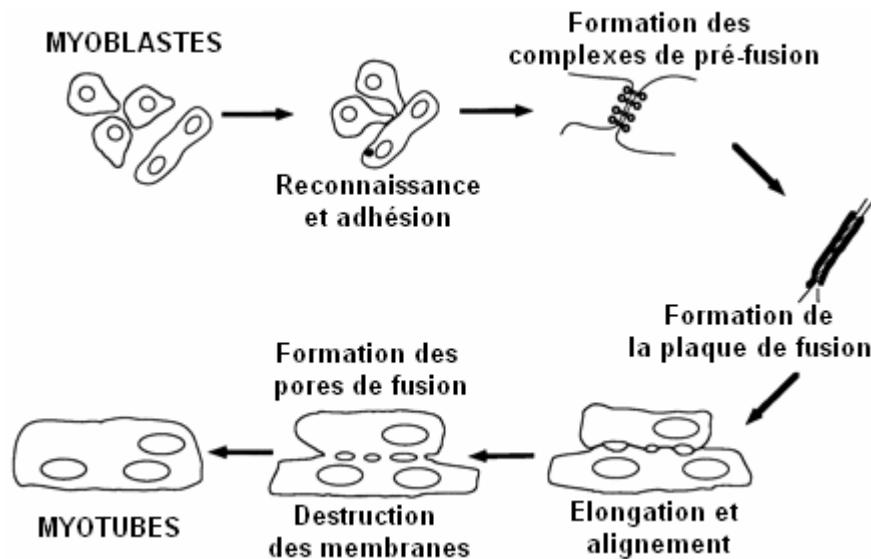


Figure 12 : Représentation schématique des 5 étapes de la fusion des myoblastes (adapté de Doberstein *et al.*, 1997)

La fusion des myoblastes est une étape cruciale de la myogénèse. Elle conduit à la formation d'un syncytium, le myotube. *In vitro*, le déclenchement de la fusion des myoblastes est dépendant de plusieurs facteurs, tels que la densité cellulaire, la composition du milieu et l'alignement des cellules myogéniques (Linkhart *et al.*, 1981). La fusion se déroule en cinq étapes successives (figure 12) : la reconnaissance et l'adhésion des myoblastes, la formation des complexes de préfusion, la formation d'une plaque entre les deux myoblastes, l'élongation et l'alignement des cellules puis la formation de pores de fusion et leur agrandissement jusqu'à disparition totale de la membrane (Doberstein *et al.*, 1997). L'implication des calpaïnes au cours de la fusion des myoblastes a été observée pour la première fois par Schollmeyer en 1986 (a,b). Depuis, des travaux réalisés au laboratoire se sont intéressés à ce phénomène. L'utilisation d'anti-sens dirigés contre la μ - et la m-calpaïne a permis de montrer que l'inhibition de l'expression de la m-calpaïne empêchait la fusion des myoblastes (Balcerzak *et al.*, 1995). Ainsi, la m-calpaïne aurait une dualité d'action en clivant, au niveau intracellulaire, la taline et la desmine et en clivant le complexe fibronectine/intégrine à l'extérieur (Brustis *et al.*, 1994 ; Dourdin *et al.*, 1997 et 1999). Le clivage de la protéine MARCKS, substrat cytosquelettique de la PKC, par les calpaïnes serait également nécessaire à la fusion des myoblastes (Dulong *et al.*, 2004 ; Goudenège *et al.*,

2005). Il semblerait également que la calpastatine soit impliquée dans le phénomène de fusion. Sa surexpression dans les myoblastes bloque la fusion (Barnoy *et al.*, 2005). De plus, il a été montré que la caspase-1 dégraderait la calpastatine juste avant la fusion afin de permettre l'activation des calpaïnes (Barnoy & Kosower, 2003).

II La régénération musculaire :

Le muscle squelettique des mammifères est un tissu stable dont le turnover des noyaux est faible (Decary *et al.*, 1997). Il a été estimé que chez un rat adulte normal, seulement 1 à 2% des noyaux musculaires sont remplacés chaque semaine (Schmalbruch & Lewis, 2000). Malgré cela, le tissu musculaire squelettique des mammifères est capable d'induire des modifications structurales et métaboliques (plasticité musculaire) et de réaliser une régénération rapide et étendue en réponse à des dommages sévères.

La régénération musculaire est toujours précédée par une phase dégénérative permettant à la phase régénérative de pouvoir s'initier. Une nécrose des fibres lésées du muscle est l'évènement initial du processus et est déclenchée la plupart du temps par une rupture du sarcolemme. Cette phase de dégénération repose en partie sur l'activation de systèmes protéolytiques comme le protéasome (Attaix *et al.*, 2005) ou les calpaïnes (Huang & Forsberg, 1998). Le site de lésion est envahi par des cellules inflammatoires (tels que neutrophiles et macrophages) qui vont activer le processus de régénération.

Cette régénération est rendue possible grâce à la présence de cellules myogéniques localisées en périphérie de la fibre musculaire entre le sarcolemme et la lame basale : les cellules satellites.

II.A Les cellules satellite : activation de la régénération musculaire

Les cellules satellites sont une population de cellules myogéniques mononuclées non différenciées que l'on trouve dans les muscles squelettiques des mammifères (Campion *et al.*, 1981), des oiseaux (Hartley *et al.*, 1992), des reptiles (Kahn & Simpson, 1974) et des amphibiens (Popiela, 1976). A l'âge adulte, on estime de 1 à 4% les noyaux correspondant aux cellules satellites associées aux fibres musculaires (Morgan & Partridge, 2003).

Dans un muscle adulte normal, les cellules satellites sont à l'état de quiescence, ou phase G0 du cycle cellulaire (Snow, 1983). Leur noyau hétérochromatique est peu actif transcriptionnellement comparé à un noyau euchromatique de fibre musculaire, ce qui conduit à un cytoplasme très réduit (Schalbruch & Hellhammer, 1977, 1978) contenant peu d'organites et pas de myofilament (Campion, 1984). En plus de leur rôle lors de la régénération, elles participent également au phénomène de plasticité musculaire ainsi qu'à la croissance des fibres musculaires durant la période post-natale du développement pendant laquelle elles sont plus nombreuses et prolifèrent activement (Moss & Leblond, 1970 ; Schultz, 1996).

Un certain nombre de marqueurs présents dans les cellules satellites ont été décrits (tableau III ; Cornelison & Wold, 1997 ; Beauchamp *et al.*, 2000 ; Hawke & Garry, 2001 ; Fukada *et al.*, 2007 ; Kuang & Rudniski, 2008 ; Kuang *et al.*, 2008 a,b). Du fait que ces marqueurs ne soient pas toujours présents dans toutes les cellules satellites, elles constituent donc une population hétérogène. Parmi ces nombreux marqueurs, on trouve les facteurs de transcriptions Pax7 et Myf5. Pax7 est présent dans toutes les cellules satellites et Myf5 est exprimé dans la majorité de celles-ci (Kuang *et al.*, 2007). Ces observations indiquent la présence de deux types principaux de cellules satellites quiescentes : des cellules Pax7⁺/Myf5⁻ apparentés à des cellules souches naïves et des cellules Pax7⁺/Myf5⁺ déjà engagées vers la voie myogénique.

Marqueurs moléculaires	Expression des cellules satellites	
	Quiescentes	Prolifératives
<u>Surface cellulaire</u>		
M-cadhérine	+/-	+/-
Syndecane-3	+	+
Syndecane-4	+	+
c-met	+	+
VCAM	+	+
NCAM	+	+
Glycoprotéine Leu-19	+	+
CD34	+/-	+/-
<u>Cytosquelettique</u>		
Desmine	-	+
<u>Facteurs de transcriptions</u>		
Pax7	+	+
Myf5	+/-	+
MyoD	-	+
MNF	+	+
Myostatine	+	+/-
IRF-2	+	+
Msx1	+	-

Tableau III : marqueurs de cellules satellites
(adapté de Chargé & Rudnicki, 2004)

Au cours de la régénération, les cellules satellites sortent de leur état de quiescence et commencent à proliférer, elles sont d'ailleurs considérées comme des myoblastes à ce stade. Au niveau moléculaire, c'est à ce même moment que l'on observe l'apparition des premiers MRF (Cornelison & Wold, 1997). Après plusieurs cycles de prolifération, la majorité d'entre elles se différencie et fusionne pour former de nouvelles myofibres ou pour réparer les myofibres endommagées. Les nouvelles fibres sont caractérisées par la localisation centrale des noyaux qui migreront à la périphérie en fin de processus. Les mécanismes et les différents acteurs mis en jeu lors de la régénération musculaire sont décrits dans la figure 13. Parallèlement à leur engagement dans la différenciation myogénique, une des propriétés importantes des cellules satellites est leur capacité d'autorenouvellement (Collins *et al.*, 2006). Ceci permet le maintien d'un pool de cellules satellites en fin de processus afin de se prémunir pour de futures régénérations (figure 13).

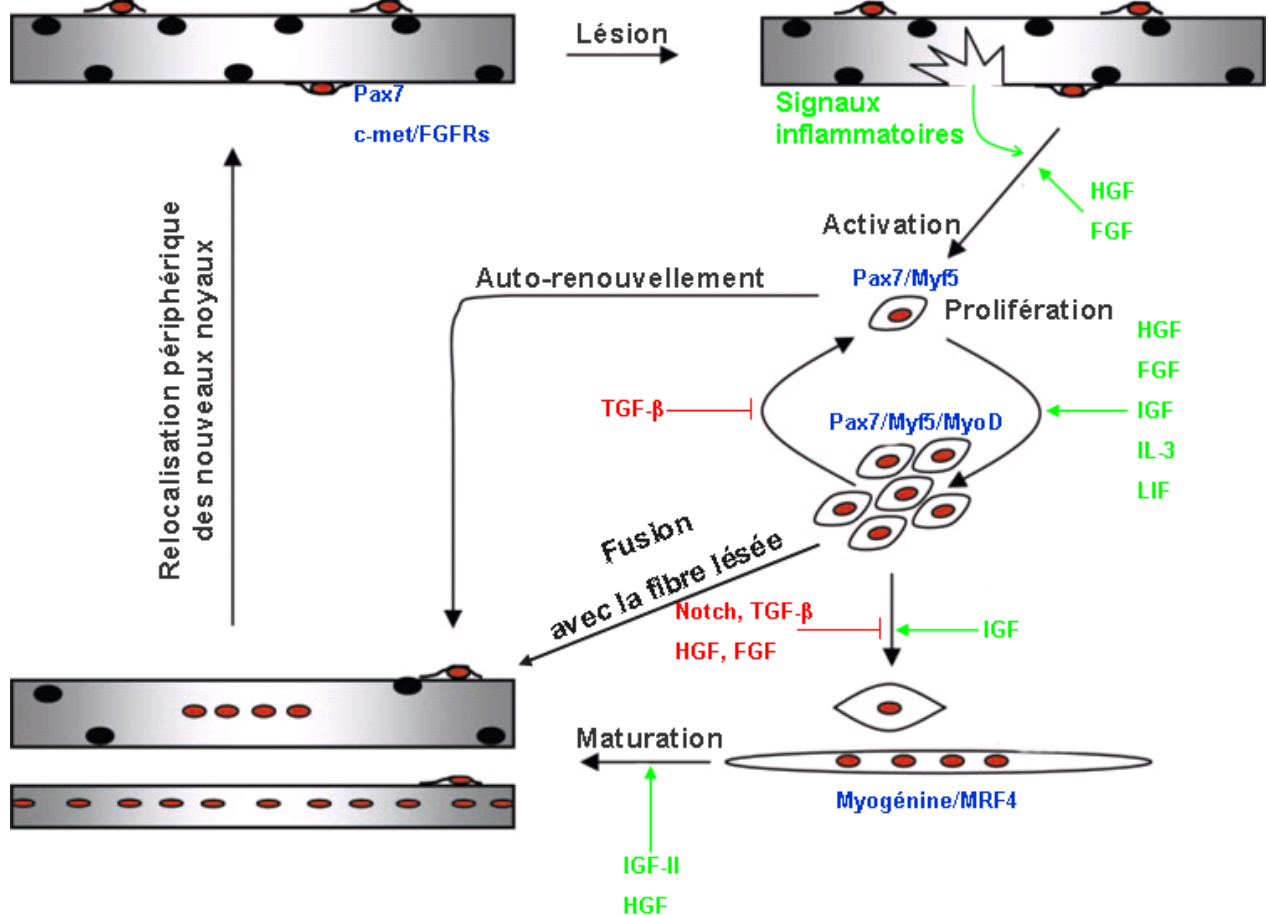


Figure 13 : Les différentes étapes de la régénération musculaire
(adapté de Chargé & Rudnicki, 2004)

II.B Les cellules satellites : régulation de la régénération musculaire

Le maintien des cellules satellites à l'état de cellules souches ainsi que la régulation de leur activité lors de la régénération musculaire sont dirigés par un ensemble de mécanismes liés à leur microenvironnement (on parle d'ailleurs de niche cellulaire). Cette niche anatomique se situe entre le sarcolemme et la lame basale. Ainsi, les signaux mécaniques, électriques et chimiques influencent directement l'activité des cellules satellites (Molgo *et al.*, 2004). Les cellules environnantes (macrophages, fibroblastes) et la microvascularisation jouent également un rôle dans cette régulation. En effet, on retrouve très souvent les cellules satellites proches des capillaires, d'ailleurs Christov *et al.* ont montré en 2007 que des signaux provenant des cellules endothéliales vasculaires et transitant via la lame basale influenceraient l'activité des cellules satellites. Enfin, les cellules satellites elles mêmes ainsi que leur descendance peuvent agir sur leurs voisins. En résumé, de nombreux signaux extracellulaires, des contacts cellule-cellule ou cellule-matrice peuvent réguler la quiescence,

l'activation, la prolifération et la différenciation des cellules satellites (Kuang *et al.*, 2008a,b ; figure 14).

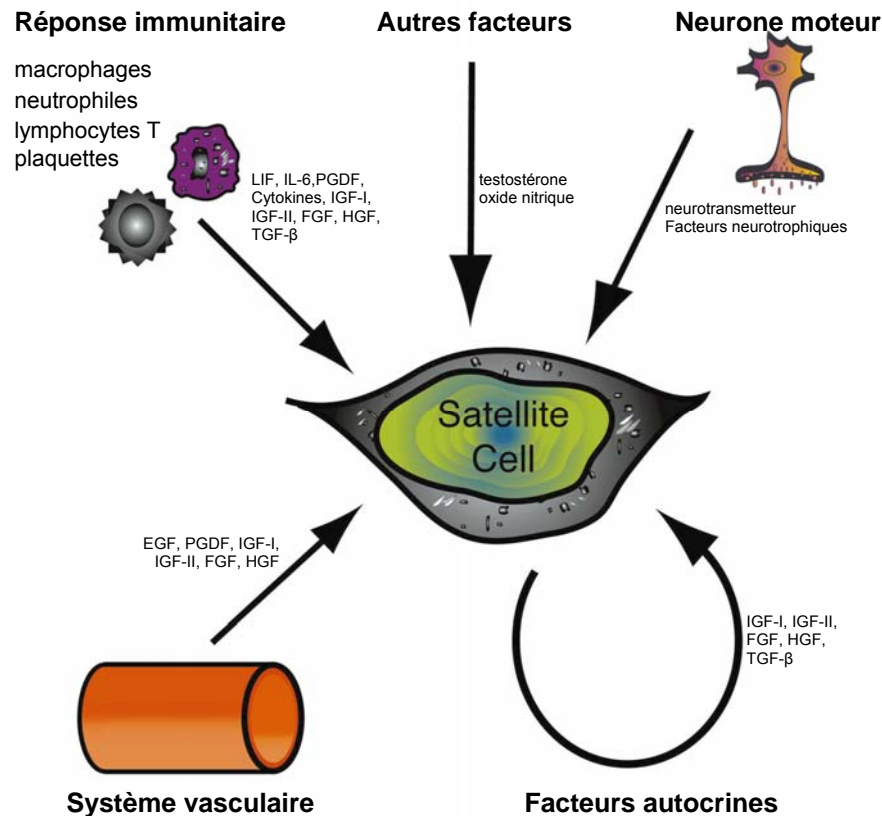


Figure 14 : Facteurs influençant l'activité des cellules satellites
(adapté de Hawke & Garry, 2001)

De plus, parmi l'ensemble des facteurs impliqués, beaucoup appartiennent à des voies de signalisation que l'on retrouve également dans la régulation de la myogenèse embryonnaire.

On trouve par exemple de nombreux facteurs de croissance (FGF, HGF) qui activeraient la prolifération des cellules satellites ou des cytokines (TNF α) qui agiraient plus sur la prolifération des myoblastes en inhibant leur différenciation (Tatsumi *et al.*, 1998 ; Sheehan & Allen, 1999 ; Langen *et al.*, 2001).

La voie Wnt (voie de signalisation inductrice de la différenciation musculaire au cours de l'embryogenèse) semble également jouer un rôle dans le contrôle des cellules satellites. Son rôle est peu connu mais l'expression de ses différents acteurs est augmentée

lors de la régénération musculaire (Polesskaya *et al.*, 2003). Elle favoriserait la différenciation des cellules satellites (Brack *et al.*, 2007).

La voie Notch représente probablement une voie de régulation essentielle pour l'activation et la mise en place des cellules satellites durant l'embryogenèse et chez l'adulte (Conboy & Rando, 2002 ; Vasyutina *et al.*, 2007). L'activation de cette voie de signalisation participe au maintien de l'état prolifératif des myoblastes, au maintien de la quiescence des cellules satellites ainsi qu'à l'activation de ces dernières en cas de traumatisme musculaire (Kitzmann *et al.*, 2006 ; Carlson, Conboy, 2007). De plus, un lien entre la voie notch et la voie Wnt (Brack *et al.*, 2008), et d'autres voies intervenant dans la régénération musculaire a été montré. Ces autres voies sont : BMP4 (facteur inhibant la différenciation myogénique durant l'embryogenèse) (Dahlqvist *et al.*, 2003) ou TGF- β (Blokzijl *et al.*, 2003).

La myostatine (appartenant à la famille des TGF- β) limiterait l'activation des cellules satellites, leur prolifération, leur autorenouvellement et leur différenciation (Siriatt *et al.*, 2006, 2007; McCroskery *et al.*, 2003). Elle agirait en partie via le facteur Pax7 (McFarlane *et al.*, 2008).

4^{ème} partie

Les atrophies musculaires et le système protéolytique
neutre calcium-dépendant

Les atrophies du muscle squelettique correspondent à des pertes de tissu musculaire incluant une diminution de la taille et/ou du nombre de fibres musculaires. L'atrophie musculaire peut être causée par diverses conditions telles que le jeûn, l'inactivité, le vieillissement et des conditions pathologiques sévères : blessures, septicémie, diabète, sida et cancer par exemple (Childs *et al.*, 2003). L'atrophie musculaire est également rencontrée dans les neuropathies et dans les myopathies d'origine génétique (Stubgen, 1994; Walling, 1999). Différents signaux peuvent être initiateurs de l'atrophie musculaire. Parmi ces signaux, nous pouvons retrouver des facteurs circulatoires tels que des cytokines: TNF- α (tumor necrosis factor- α) et IL-6 (interleukine 6), une hormone catabolique comme la myostatine, des glucocorticoïdes ou des concentrations faibles d'hormones anaboliques telles que l'insuline ou l'IGF-1 (insulin-like growth factor-1); pour revue, voir Jackman & Kandarian, 2004. Dans ce cas, le signal d'atrophie s'étend vers tous les muscles du corps. L'atrophie peut également être due à un signal mécanique (défaut de la contraction du sarcomère) provoqué par l'inactivité ou la dénervation et, dans ce cas, le phénomène n'agit que localement (Baldwin & Haddad, 2002).

Les calpaïnes sont largement impliquées dans différents types d'atrophies musculaires (Bartoli & Richard, 2005). En effet, il a été montré que les niveaux d'expression (Haddad *et al.*, 2003 ; Hong & Forsberg, 1995 ; Tang *et al.*, 2000 ; Voisin *et al.*, 1996 ; Williams *et al.*, 1999) et l'activité (Alderton & Steinhardt, 2000 ; Purintrapiban *et al.*, 2003 ; Huang & Forsberg, 1998) des calpaïnes sont élevés dans des conditions d'atrophies tels que l'inactivité, la dénervation, des traitements aux glucocorticoïdes et la septicémie. Après que les calpaïnes soient activées par un signal qui la plupart du temps conduit à une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire, elles sont capables d'initier la dégradation des protéines sarcomériques (Xiao *et al.*, 2003), de contrôler l'expression de gènes en clivant des protéines de signalisation ou des facteurs de transcription (Hirai *et al.*, 1991 ; Watt & Molloy, 1993) et de participer à la nécrose des fibres (figure 15). Dans les cellules satellites,

progéniteurs musculaires, les calpaïnes peuvent contrôler le cycle cellulaire, la migration et la fusion des myoblastes (Dedieu *et al.*, 2003 ; Zhang *et al.*, 1997 ; Balcerzak *et al.*, 1998)(figure 15).

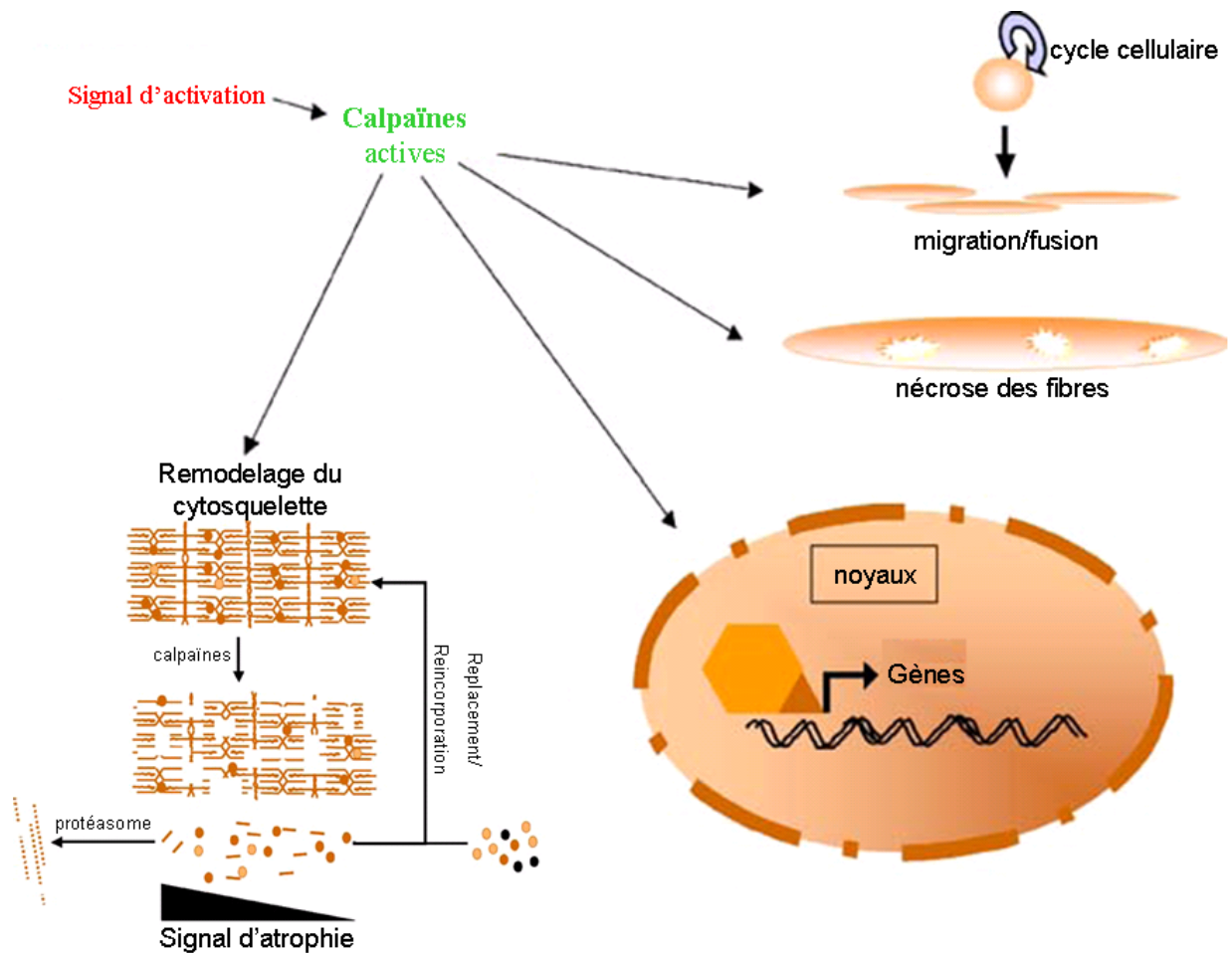


Figure 15 : Actions possibles des calpaïnes ubiquitaires durant l'atrophie musculaire (adapté de Bartoli & Richard 2005)

I La myopathie de Duchenne (DMD : Duchenne Muscular Dystrophy)

La DMD (dont le modèle murin est la souris *mdx*) est une dystrophie due à des mutations dans le gène de la dystrophine (Hoffman *et al.*, 1987). Cette protéine de 427 kDa est une protéine qui possède quatre domaines (Koenig *et al.*, 1988) : trois de ces domaines sont homologues à des domaines présents dans les protéines se liant à l'actine comme l' α -actinine ou la β -spectrine (ABD1, ABD2 et SR) ; le domaine C-terminal contient un domaine riche en cystéine (CR) important pour la liaison au β -dystroglycane et un domaine C-terminal (CT) pour la liaison aux syntrophines et α -dystrobrevine (figure 16).

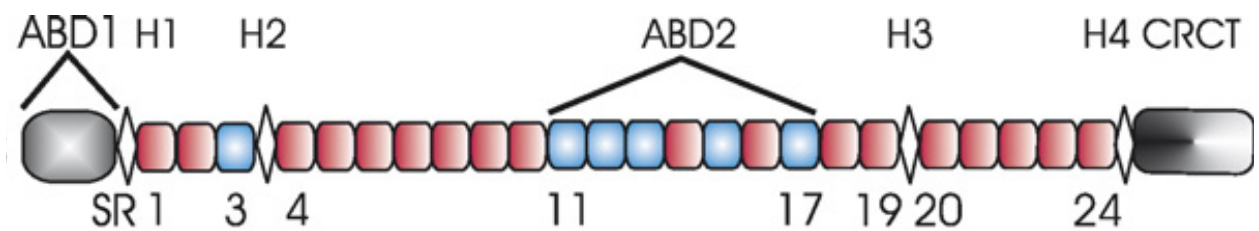
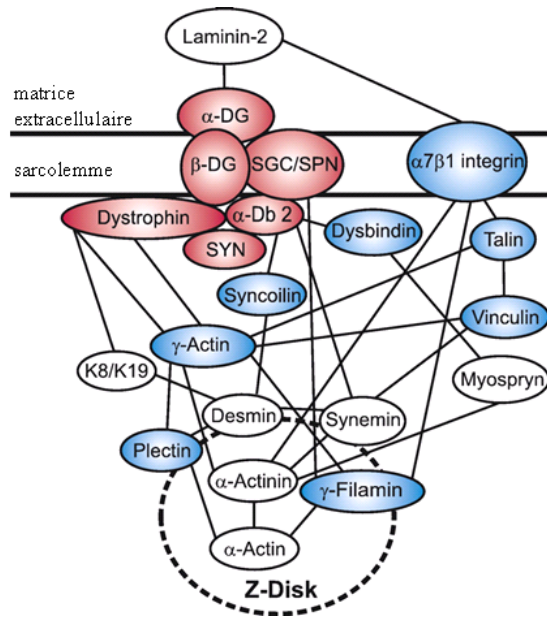


Figure 16 : Structure schématique de la dystrophine
(adapté de Ervasti, 2007)

La dystrophine est capable de lier l'actine à des protéines sarcoglycanes pour former un complexe appelé : complexe dystrophine-glycoprotéines (DGC) (figure 17 ; Campbell & Kahl, 1989). Ce complexe sert au maintien de l'intégrité structurale du sarcolemme.



**Figure 17 : Le réseau du complexe dystrophine-glycoprotéines
(adapté de Ervasti, 2007)**

Ainsi, lorsque la dystrophine subit une mutation, le sarcolemme n'est plus maintenu, ce qui conduit à l'augmentation de l'afflux de calcium dans le sarcoplasme (Spencer & Mellgren, 1995). Cette augmentation du calcium intracellulaire a pour conséquence une augmentation de l'expression et de l'activité des calpaïnes, d'où une protéolyse cellulaire plus importante (Alderton & Steinhardt, 2000 ; Combaret *et al.*, 1996 ; Turner *et al.*, 1988). Spencer *et al.* en 2002 ont mené une étude sur des souris *mdx* qui a consisté à surexprimer la calpastatine ; dans ces conditions, ils ont observé une réduction du phénotype dystrophique et confirment le rôle central des calpaïnes dans l'étiologie de cette maladie. Cependant, plusieurs hypothèses ont été formulées quant aux rôles des calpaïnes dans l'établissement des dystrophies musculaires (voir figure 15). Ainsi, leur suractivation pourraient entraîner une protéolyse anarchique conduisant à une nécrose des fibres ; de plus elles seraient capables de cliver des canaux calciques, ce qui entraînerait une augmentation de l'influx de calcium conduisant à un « feedback » positif de leur activité ; enfin, *via* une induction de l'apoptose (voir chapitre III.A., l'activité des calpaïnes pourrait réduire le nombre de cellules satellites (Luz *et al.*, 2002).

II La dystrophie musculaire des ceintures de type 2A (LGMD2A)

La majorité des dystrophies musculaires des ceintures sont des myopathies causées par des mutations de gènes touchant des protéines structurales. Cependant, la LGMD2A est due à des mutations affectant le gène *capn3* qui code pour l'isoforme des calpaïnes spécifique du muscle, la calpaïne 3 (Richard *et al.*, 1995). Ainsi, plus de 200 mutations ont été identifiées sur ce gène (figure 18), et pour la plupart elles conduisent à la perte de son activité protéolytique (Ono *et al.*, 1998 ; Fanin *et al.*, 2003).

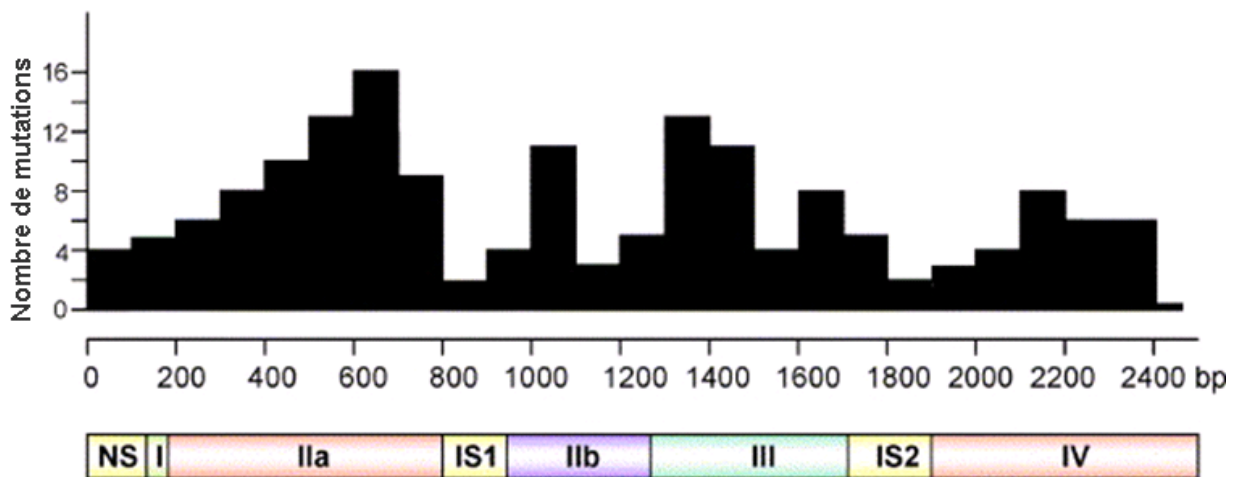


Figure 18 : Répartition des mutations identifiées chez les patients LGMD2A (adapté de Beckmann & Spencer 2008)

D'un point de vue cellulaire, des biopsies de patients atteints de la LGMD2A sont caractérisées par des fibres en nécrose/régénération, une désorganisation des myofibrilles et une altération des mitochondries (Chae *et al.*, 2001).

Comme les calpaïnes ubiquitaires, la calpaïne 3 est impliquée dans de nombreux processus intracellulaires. Ainsi, une des fonctions principales proposée de la calpaïne 3 est le remodelage du sarcomère. L'inhibition partielle de l'expression de la calpaïne 3 par des oligonucléotides antisens entraîne la désorganisation du sarcomère (Poussard *et al.*, 1996). Des résultats similaires ont été observés sur des myotubes provenant de muscles de souris KO

pour la calpaïne 3 (Kramerova *et al.*, 2004). La calpaïne 3 est fortement associée à une protéine sarcomérique géante, la titine (figure 19), qui joue un rôle important dans le maintien et la fonction du sarcomère (voir 2^{ème} partie ; Gregorio *et al.*, 1999). Il semblerait que sa liaison à la titine lui permette de se stabiliser *in vivo* (Garvey *et al.*, 2002), ce qui empêcherait son autoprotéolyse rapide. L'hypothèse prédominante dans le cas de la LGMD2A serait que des mutations gêneraient cette liaison, ce qui conduirait à une augmentation de l'activité protéolytique de la calpaïne 3. De plus, la calpaïne 3 est capable de cliver plusieurs protéines cytosquelettiques, suggérant son intervention dans la régulation du cytosquelette (particulièrement durant la réponse adaptative à l'exercice ou la régénération après une blessure). Parmi ces protéines, nous retrouvons la gamma-filamine (figure 19), une protéine liée au sarcomère au niveau de la strie Z, qui serait une cible privilégiée de la calpaïne 3 pendant la LGMD2A. Ainsi, des mutations dans le gène de la filamine conduisent à un phénotype très proche des LGMD (Van Der Ven *et al.*, 2000). De plus, durant le remodelage du sarcomère, la calpaïne 3 pourrait cliver de nombreuses protéines myofibrillaires, engendrant l'initiation de leur dégradation par le système protéasome-ubiquitine dépendant. Ainsi, une perte de son activité entraînerait l'altération du turnover myofibrillaire conduisant à la LGMD2A (Kramerova *et al.*, 2005).

Une autre protéine associée à la calpaïne 3 est la dysferline (Huang *et al.*, 2005). La dysferline est une protéine de la famille des ferlines transmembranaires impliquée dans le trafic vésiculaire et la réparation de la membrane (Bansal & Campbell, 2004). Des mutations dans le gène de la dysferline causent trois maladies musculaires distinctes : la myopathie de Miyoshi (Liu *et al.*, 1998), la myopathie des compartiments distaux antérieurs (Illa *et al.*, 2001) et la LGMD2B (Bashir *et al.*, 1998). Il a d'ailleurs été montré qu'une réduction de l'expression de calpaïne 3 apparaissait dans cette myopathie (Anderson *et al.*, 2000). Malgré cela, l'implication de la calpaïne 3 dans les processus médiés par la dysferline reste peu connue.

Enfin, un substrat connu de la calpaïne 3 est I κ B α . Cette protéine est impliquée dans la séquestration de la protéine NF κ B dans le cytoplasme, ce qui empêcherait l'expression de gènes impliqués dans la survie cellulaire. Ainsi, dans le cas de la LGMD2A, le complexe I κ B α -NF κ B serait stabilisé, ce qui conduirait à une augmentation des événements apoptotiques (Richard *et al.*, 2000).

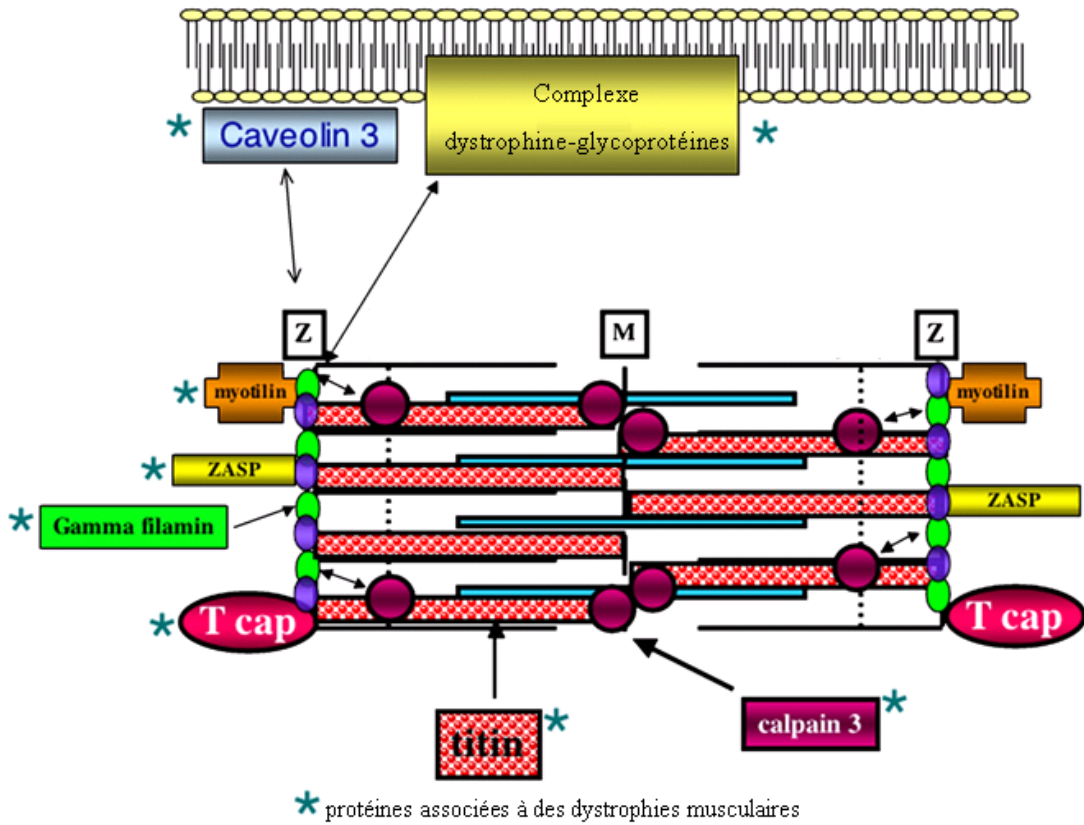


Figure 19 : Schéma des protéines sarcomériques impliquées dans des dystrophies musculaires et associées ou non à la calpaïne 3 (adapté de Kramerova *et al.*, 2006)

III La Sarcopénie ou vieillissement musculaire

Le vieillissement est associé à une perte progressive et involontaire de la masse musculaire appelée sarcopénie (Baumgartner *et al.*, 1998). La sarcopénie est caractérisée par la perte de la masse du muscle squelettique, due à la diminution du nombre et de la taille des fibres musculaires, mais également par le déclin graduel de la fonction musculaire ; incluant la baisse de production de force et un ralentissement général de la contraction/relaxation. La sarcopénie affecte toutes les personnes âgées indépendamment de leur état de santé (Marzetti & Leeuwenburgh, 2006). Une dérégulation métabolique du muscle est également observée, elle inclue une réduction de la sensibilité à l'insuline, une détérioration des défenses oxydatives et une diminution des fonctions mitochondriales (Giresi *et al.*, 2005 ; Dela & Kjaer 2006). Des études épidémiologiques ont suggéré plusieurs facteurs conduisant à la sarcopénie : des changements neuronaux (Vandervoort, 2002) et hormonaux (Szulc *et al.*, 2004), une nutrition inadaptée (Dreyer & Volpi, 2005), des inflammations chroniques (Visser *et al.*, 2002) et une inactivité physique (Szulc *et al.*, 2004). D'un point de vue cellulaire, la sarcopénie est caractérisée par deux modifications majeures: une accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et une réduction de l'ATP cellulaire (Dirks *et al.*, 2006), ces modifications entraînent une perte cellulaire via l'apoptose et/ou la nécrose (Dupont-Versteegden, 2005).

III.A Apoptose et vieillissement musculaire

L'apoptose est un programme de suicide cellulaire conservé au cours de l'évolution et hautement régulé. Dans les organismes multicellulaires, l'apoptose est essentielle pour l'embryogenèse, pour le développement et pour le maintien de l'homéostasie des tissus chez l'adulte (*i.e.* turnover cellulaire, l'élimination de cellules infectées par un virus, des cellules immunitaires auto-immunes...) (Alison & Sarraf, 1992). De plus, il a été proposé que l'accélération de l'apoptose de cellules « irremplaçables » tels que les neurones, les fibres musculaires et les myocytes cardiaques pourrait contribuer à la perte de fonctions associée à l'âge (Pollack *et al.*, 2002). L'apoptose est exécutée *via* des voies de signalisation spécifiques conduisant à la fragmentation de l'ADN, la condensation du noyau, une augmentation de la protéolyse intracellulaire et une fragilisation de la membrane. Tous ces événements vont

« transformer » la cellule en corps apoptotique qui sera englouti par les macrophages ou des cellules avoisinantes afin d'être recyclée.

Deux voies distinctes d'apoptose ont été décrites : la voie caspase-indépendante et la voie caspase-dépendante.

La voie caspase-dépendante est réalisée par l'intermédiaire de protéases cystéine-dépendante et aspartate spécifiques, qui sont des endoprotéases intégrales, nommées les caspases (Danial & Korsmeyer, 2004). Elles existent normalement dans le cytoplasme à l'état de précurseurs inactifs (procaspases) et peuvent être activées soit par dimérisation, soit par un clivage protéolytique. Ainsi, dès l'apparition d'un stress, l'initiation de l'apoptose commence par une cascade d'activation des caspases. Tout d'abord, les caspases initiatrices vont être activées (caspases 8, 9 et 12) pour à leur tour activer les caspases effectrices (caspases 3, 6 et 7) (figure 20). Il est à noter que l'activation d'une DNase par les caspases conduira à la fragmentation de l'ADN. Bien que la majeure partie des études définisse les caspases comme étant les enzymes clés dans le processus d'initiation et d'exécution de l'apoptose, il est maintenant admis que les calpaïnes jouent également un rôle prépondérant dans les mécanismes protéolytiques aboutissant à la mort cellulaire programmée. En effet, au cours du programme apoptotique des membres des deux familles de protéases sont activés et catalysent la dégradation protéolytique sélective d'un large panel de protéines. Parmi ces substrats, beaucoup sont communs, en effet caspases et calpaïnes ont la capacité de cliver une même protéine au niveau de sites différents. Un autre lien entre ces deux familles de protéases repose sur la calpastatine. L'inhibiteur endogène des calpaïnes peut être dégradé par les caspases (Kato *et al.*, 2000). Enfin, il existe également des interactions directes entre calpaïnes et caspases puisque les calpaïnes peuvent protéolyser certaines pro-caspases conduisant à leur activation (les pro-caspases 3, 7 et 12) ou au contraire à leur inactivation (les 8 et 9).

La voie caspase-indépendante est exécutée via le relargage par la mitochondrie de médiateurs *i.e.* AIF (apoptosis inducing factor) et l'endonuclease G qui sont capables à eux seuls de dégrader l'ADN (figure 20). Cette voie est particulièrement représentée dans l'atrophie musculaire au cours du vieillissement afin d'éviter la destruction complète des fibres par les voies caspases-dépendantes et plutôt favoriser la destruction des noyaux superflus. En effet, des études ont montré une augmentation de l'induction d'AIF dans des muscles gastrocnémiens (Siu *et al.*, 2005), plantaris (Dirks & Leeuwenburgh, 2004) et soleus (Leeuwenburgh *et al.*, 2005) de rats au cours du vieillissement.

La mitochondrie est considérée comme un organite clé de contrôle de l'apoptose que ce soit de manière caspase-indépendante : relargage d'AIF ou d'endonucléase G ou de manière caspase-dépendante : relargage du cytochrome C qui se lie à l'ATP et à Apaf-1 (apoptosis protease activating factor 1) pour former l'apoptosome responsable de l'activation de la caspase 9. Ces mécanismes sont hautement régulés grâce à une réponse adaptative médiée par des protéines de la famille des Bcl-2. Cette famille de protéines est capable de réguler l'apoptose soit en inhibant la sécrétion par la mitochondrie des médiateurs apoptotiques (par Bcl-2 et Bcl-X_L), soit en favorisant ce largage (par Bax, Bak et Bid) (Beere, 2004 ; Danial & Korsmeyer, 2004). Le réticulum endo/sarcoplasmique joue également un rôle important dans l'induction de l'apoptose. En effet, lors d'un stress, l'augmentation de la concentration en calcium et l'activation consécutive des calpaïnes va induire l'apoptose soit à travers l'activation de la caspase 12 (Bitko & Barik, 2001) et de Bax (Primeau *et al.*, 2002) soit de manière caspase-indépendante. De plus, l'anarchie calcique, la production de ROS et la baisse d'énergie observées au cours du vieillissement vont entraîner l'ouverture du mitoPTP (mitochondrial permeability transition pore) (Halestrap, 2009). Cette ouverture va entraîner la perte du Ca²⁺ mitochondrial et un déséquilibre ionique, ce qui va entraîner le largage des facteurs apoptotiques (AIF, endoG, Cytochrome C...) par la mitochondrie et l'activation des calpaïnes (Oka *et al.*, 2008). Ces dernières vont alors activer les caspases, conduisant à la mort cellulaire. Bax est un substrat des calpaïnes et son clivage par ses dernières induit l'apoptose, d'ailleurs l'hydrolyse par les calpaïnes de Bcl 2, la caspases 3, d'AIF et de Bid entraîne les mêmes effets (Polster *et al.*, 2005). En revanche, le clivage des caspases 3, 7, 8 et 9 par les calpaïnes ont des conséquences anti-apoptotiques (Chua *et al.*, 2000). Enfin, un état de stress peut entraîner des lésions des lysosomes et des péroxisomes, entraînant un relargage de cathepsines participant à la protéolyse myofibrillaire et à l'activation des caspases (Bechet *et al.*, 2005) et une libération de ROS.

Enfin, comme il a été dit précédemment, des inflammations chroniques sont observées lors du vieillissement musculaire. Ainsi, une haute concentration de marqueurs inflammatoires tels que le TNF- α (tumor necrosis factor α), l'interleukine-6 et la protéine réactive C est associée à des pertes de force et de masse musculaires, des performances physiques diminuées et une baisse de la mobilité des sujets âgés (Ferrucci *et al.*, 1999 ; Cesari *et al.*, 2004). D'un point de vue moléculaire, TNF- α est capable d'entraîner l'activation de la caspase 8 lorsqu'il se lie à son récepteur membranaire, ceci déclenchant la cascade des caspases (figure 20).

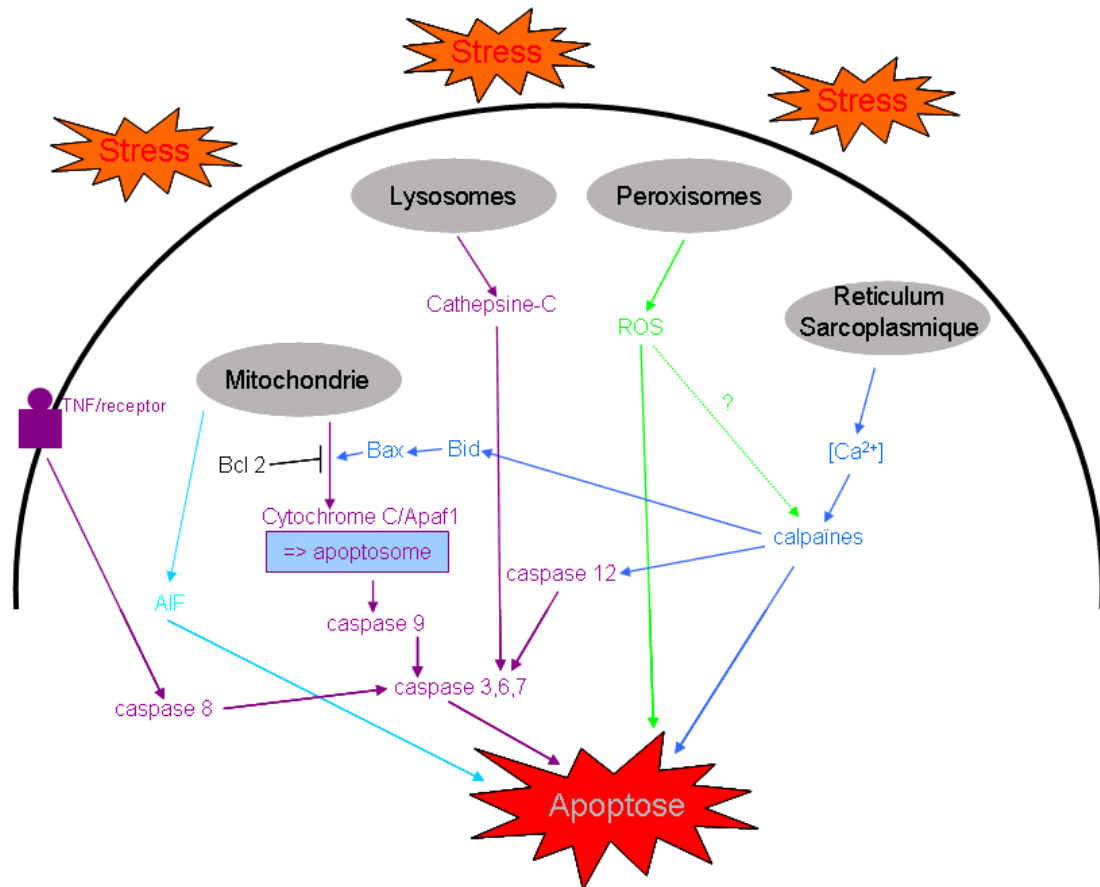


Figure 20 : Schéma des voies entraînant l'apoptose

III.B Le stress oxydant et son rôle au cours du vieillissement musculaire

III.B.1 les ROS (reactive oxygen species)

Les ROS sont des métabolites de l'oxygène moléculaire ayant une forte réactivité. On distingue dans les ROS des radicaux de l'oxygène instables tels que l'ion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et le radical hydroxyl (HO^{\cdot}) et des molécules non radicalaires tel que le peroxyde d'hydrogène (ou eau oxygénée : H_2O_2). Ces molécules, qui sont générées en continu par les organismes ayant un métabolisme aérobie, voient leur concentration augmenter lors d'un stress ou d'une maladie (à savoir soit l'augmentation de leur anabolisme ou la diminution de leur catabolisme). L'un des premiers sites cellulaires de production de ROS est la mitochondrie au niveau de la chaîne respiratoire (phosphorylation oxydative) (Bayne *et al.*, 2005). Les ROS sont également produites par la peroxydase oxydase (Schrader & Fahimi, 2004), le cytochrome *P*-450 (Zangar *et al.*, 2004), la NAD(P)H oxydase (Li & Shah, 2001) et la xanthine-xanthine oxydase (Rieger *et al.*, 2002). De plus, une variété de stimuli exogènes

conduit à la production de ROS : les radiations (Riley, 1994), l'infection par des pathogènes (Schwarz, 1996) et l'exposition à des xenobiotiques (Pagano, 2002).

Une haute concentration de ROS intracellulaire inflige des dommages aux macromolécules telles que les lipides, les acides nucléiques et les protéines (Bokov *et al.*, 2004). A cause de leur structure bis-allylique d'acides gras poly-insaturés, les lipides sont une des cibles les plus sensibles des ROS. Ainsi, l'oxydation des lipides conduit à des altérations membranaires (Schafer & Buettner, 2001). Les oxydations des bases nucléiques peuvent causer des mutations et des délétions dans l'ADN nucléaire ou mitochondrial. Ces mutations ont pour effet d'induire une baisse de la production d'enzymes antioxydante, une prolifération cellulaire incontrôlée ou une accélération de la mort cellulaire (Evans *et al.*, 2004). Les oxydations des acides aminés conduisent à la formation de ponts di-sulfures sur les résidus cystéine, des dérivés carbonyles et tout autre résidu oxydé tel que la méthionine sulfoxyde. Ces différentes modifications opérées sur les protéines altèrent leur fonction : perte d'activité (enzyme) ou agrégation (dans le cas de protéines structurales ou chaperonnes). De plus, des oxydations sur des facteurs de transcription entraînent une augmentation ou une diminution de leur capacité de liaison à l'ADN, entraînant des changements dans l'expression de leurs gènes cibles. Les protéines p53, AP-1 et NF- κ B sont des exemples de facteurs de transcription régulés par les ROS. Pour rappel, p53 est une protéine contrôlant l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose et la sénescence (Harris & Levine, 2005). AP-1 et NF- κ B sont deux facteurs de transcription connus pour réprimer l'apoptose et induire la transformation cellulaire, la résistance au stress et l'inflammation (Karin *et al.*, 1997 ; Piette *et al.*, 1997).

Pour se prémunir des effets délétères induit par les ROS, la cellule dispose de moyens de défense sophistiqués communs à tous les organismes aérobies. Les défenses endogènes incluent un réseau d'enzymes antioxydantes qui sont distribuées dans tout le cytoplasme ainsi que dans certains organites de la cellule. Il existe aussi une variété de molécules non enzymatiques capables de se coupler aux ROS afin de favoriser leur élimination (les antioxydants stoechiométrique ou « scavengers »). Chez les eucaryotes, les enzymes ubiquitaires primaires qui permettent le contrôle des ROS sont la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et les peroxydases (figure 21) ; elles peuvent convertir les radicaux oxygénés en molécules plus stables telles que l' O_2 ou l'eau. De plus, il existe un grand nombre d'enzymes secondaires qui agissent de concert avec des petites molécules antioxydantes pour réaliser des cycles redox et fournir des cofacteurs aux enzymes antioxydantes primaires (figure 21). Ces petites molécules (par exemple GSH, NADPH, la

thioredoxine, la vitamine E et C et des métaux tels que le sélénium) peuvent également agir directement pour éliminer les ROS. Tous ces mécanismes sont nécessaires afin de maintenir la balance redox intracellulaire et de prévenir des dommages cellulaires causés par les ROS (Willcox *et al.*, 2004).

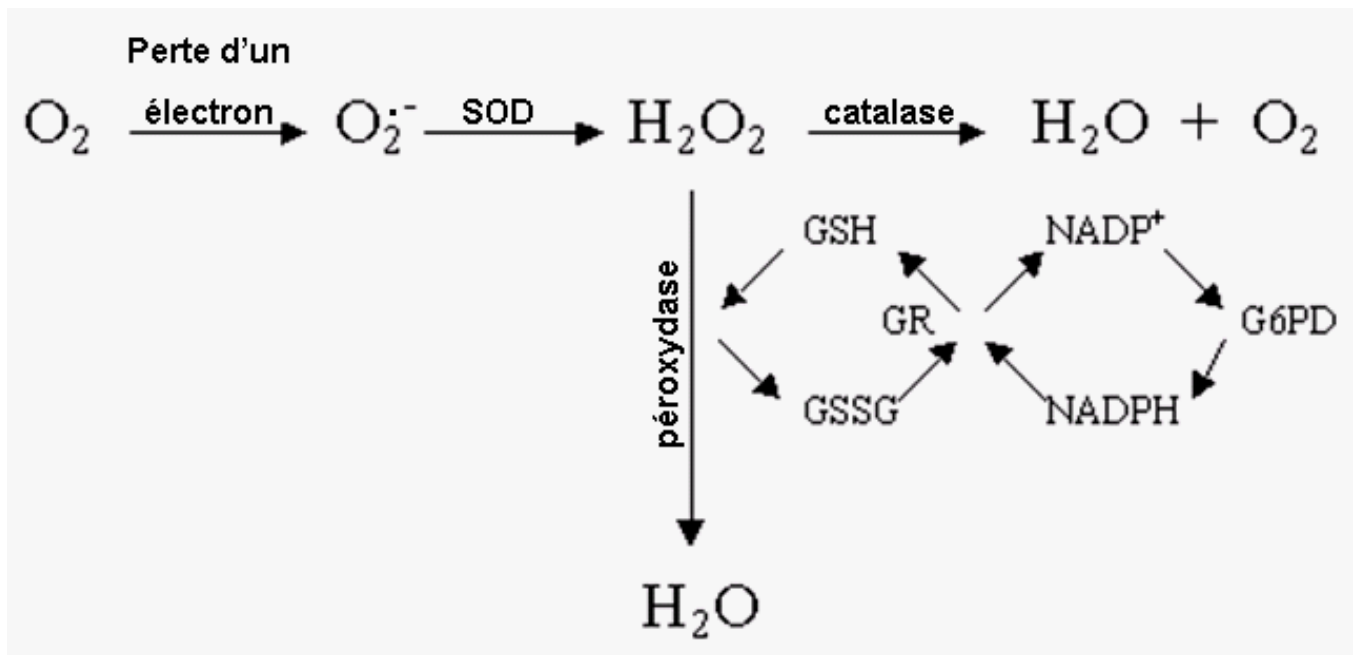


Figure 21 : Voies principales de lutte contre l'oxydation cellulaire

III.B.2 Stress oxydant et vieillissement

Les ROS sont les premières responsables du déclin des fonctions physiologiques associé au vieillissement. Il a été démontré dans les vingt dernières années une relation positive entre l'augmentation *in vivo* de la concentration en ROS et le vieillissement biologique. Ces observations ont été réalisées sur divers organismes allant de *C.elegans* à l'homme (Beausejour *et al.*, 2003 ; Bokov *et al.*, 2004 ; Navarro & Boveris, 2004 ; Navarro *et al.*, 2002 ; Sohal & Weindruch, 1996). Les dommages occasionnés aux macromolécules telles que l'ADN, les lipides et les protéines ont fait l'objet de nombreuses études. Par exemple, les dommages oxydatifs subis par l'ADN nucléaire ou mitochondrial sont augmentés au cours du vieillissement, que se soit chez la souris (Hamilton *et al.*, 2001), le hamster (Takabayashi *et al.*, 2004) ou l'homme (Gianni *et al.*, 2004). De plus, des niveaux élevés de peroxydation des lipides ont été observés sur des tissus tels que les reins (Oxenkrug & Requintina, 2003), le cerveau (Brocardo *et al.*, 2005), le foie (Ward *et al.*, 2005), les poumons (Lee *et al.*, 1999) et le muscle squelettique (Pansarasa *et al.*, 1999). En outre, des oxydations sur une large variété de protéines, incluant des protéines de structures (Grune *et al.*, 2005), des enzymes et des protéines impliquées dans des voies de signalisation (Bigelow & Squier, 2005 ; figure 26) ont été rapportées dans la littérature. En général, l'accumulation de ces protéines oxydées est la résultante de l'augmentation de la concentration en ROS intracellulaire et de la diminution de l'efficacité des systèmes de « turnover » protéiques au cours du vieillissement (Farout & Friguet, 2006 ; Friguet, 2006). En général, les protéines oxydées sont détruites par des systèmes de protéolyse tels que le protéasome, les lysosomes ou les protéases mitochondriales, mais ces différents systèmes voient leurs fonctions grandement diminuées durant le vieillissement (Friguet, 2002).

L'augmentation des ROS lors du vieillissement permet aussi d'expliquer les nombreuses maladies associées au vieillissement telles que l'artériosclérose, les maladies cardiovasculaires, la démence, l'arthrite et l'ostéoporose (Beckman & Ames, 1998). En effet, une augmentation des ROS intracellulaires au cours de l'âge entraînerait un état d'inflammation chronique (figure 28 ; Chung *et al.*, 2006). Cet état d'inflammation serait un des mécanismes déclencheur du vieillissement (Chung *et al.*, 2001). En effet, au cours de l'âge, nous avons vu que la balance redox est touchée. De ce fait, la cellule perd de sa capacité à combattre les ROS, ce qui va entraîner l'activation de facteurs de transcription sensibles à l'oxydation et la libération de médiateurs pro-inflammatoires (tels que les cytokines, chimiokines et la NO synthase). Ces molécules vont alors agir de manière systémique pour

atteindre le tissu entier, entraînant une nouvelle synthèse de ROS et d'espèces actives de l'azote (RNS) (Pryor *et al.*, 2006 ; Willcox *et al.*, 2004). Du fait de ce rétrocontrôle positif, l'état inflammatoire des cellules et du tissu concerné est augmenté (figure 22).

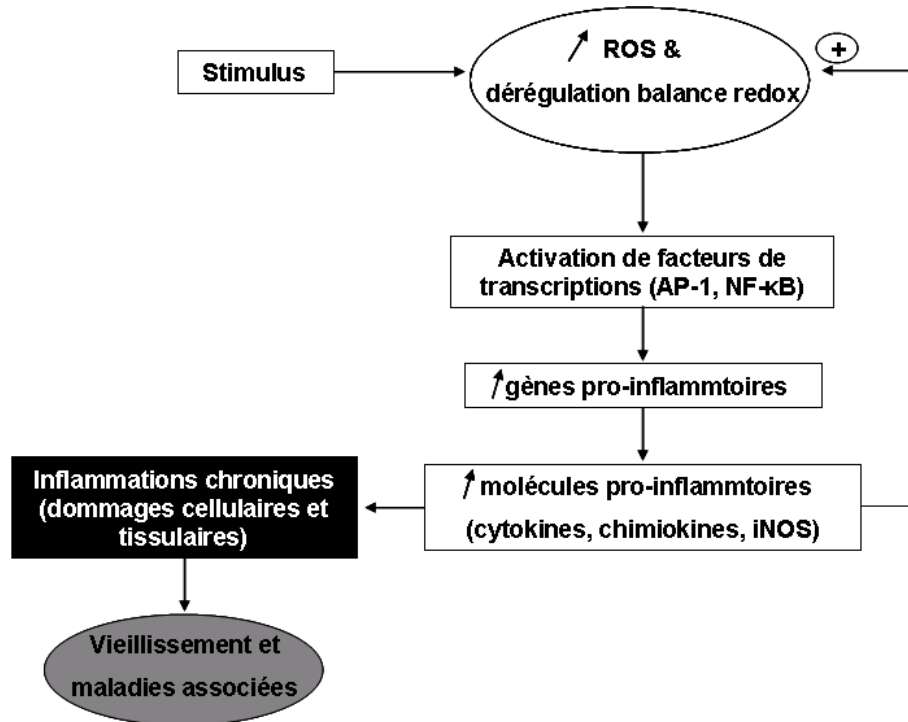


Figure 22 : ROS, inflammation et vieillissement

III.B.3 Conséquences du stress oxydant sur le vieillissement musculaire

Dans le muscle, cet état d'inflammation chronique amenant à l'apoptose va conduire à un défaut de contraction musculaire (impliquant une baisse de force du muscle) et même à un défaut de régénération dû à une diminution du nombre de cellules satellites.

Les ROS seraient capables de jouer sur la production de force sans altérer la régulation du calcium (Andrade *et al.*, 2001) par l'oxydation de protéines indépendamment du signal calcique telles que l'actine, la myosine, la troponine ou d'autres protéines myofibrillaires (Bejma & Li, 1999). *A contrario*, au niveau du réticulum sarcoplasmique, l'oxydation des protéines impliquées dans le transport du calcium telle que Serca entraînerait un défaut du couplage excitation/contraction responsable de la baisse de production de force (Schoneich *et al.*, 1999).

De plus, des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire sont également affectées par l'accumulation de ROS. Dans les cellules satellites, le stress oxydant induirait l'augmentation de la quantité de p53, ce qui entraînerait la régulation positive de p21, p27 et FOXO1, facteurs de transcription impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire (Machida & Both, 2004). Ceci entraînerait alors un défaut de régénération musculaire au cours du vieillissement.

Nous avons vu dans la première partie de cette introduction que les calpaïnes sont impliquées dans la prolifération, la migration et la différenciation des cellules myogéniques. De plus, tous les facteurs de transcription cités ci-dessus sont des substrats connus des calpaïnes (Pariat *et al.*, 1997 ; Delmas *et al.*, 2003). Ainsi, les calpaïnes pourraient participer à ces mécanismes médiés par les ROS. L'accumulation de ROS joue également un rôle dans la mort cellulaire et l'apoptose *via* l'oxydation de MAP kinases (ERK et p38 MAPK) et de Bax (Kefaloyianni *et al.*, 2006 ; Chaudhari *et al.*, 2007). L'activité des calpaïnes est également régulée par des MAP Kinases (Glading *et al.*, 2004), en revanche on ne sait pas si les calpaïnes sont régulées par les ROS.

III. C : Causes et conséquences de la baisse de production d'énergie durant le vieillissement musculaire

III.C.1 Les mutations de l'ADNmt dans le muscle âgé : lien avec la perte d'énergie

Chaque fibre musculaire contient des centaines de milliers de mitochondries qui représentent le producteur principal de l'énergie cellulaire sous forme d'ATP. Les ROS proviennent pour la plupart de la respiration mitochondriale, 0,1% de l'O₂ consommé est réduit en ions superoxydes qui sont à leur tour transformés en eau oxygénée (Fridovich, 2004). Les fibres musculaires sont des cellules de types post-mitotiques et de ce fait accumulent des dommages causés par ces ROS, notamment des mutations de l'ADNmt.

Un déclin fonctionnel de la chaîne respiratoire mitochondriale est observé durant le vieillissement musculaire (Short *et al.*, 2005), ce qui entraîne une baisse de la capacité de phosphorylation oxydative mitochondriale. Des délétions et des mutations ponctuelles dans l'ADNmt sont les principales causes de cette réduction d'activité (Cao *et al.*, 2001 ; Lezza *et al.*, 2001). L'ADNmt humain est une molécule circulaire double brin de 16569 paires de bases, sans histones et organisé de façon compacte (sans introns). Il code

pour 37 gènes qui sont tous impliqués dans la production d'ATP (Cormio *et al.*, 2005). Plus spécifiquement, l'ADNmt code pour 13 polypeptides participant à la chaîne respiratoire (ETC pour Electron Transfer Chain), 22 ARNt et 2 ARNr. En revanche, le marquage de l'importation des protéines et la biogenèse mitochondriale sont gouvernés par le noyau (Larsen *et al.*, 2005). De plus, le manque d'histones protectrices et de systèmes de réparations avancés font que l'ADNmt est plus sensible aux mutations/délétions que l'ADN nucléaire ; les ARNr et ARNt mitochondriaux localisés dans la matrice accumulent également des dommages susceptibles de gêner la traduction des protéines.

L'augmentation des mutations/délétions de l'ADNmt entraîne donc de façon inéluctable la réduction de la production d'ATP (figure 23). Il a été montré que la production d'ATP mitochondriale dans le gastrocnémien de rats âgés baisse d'environ 50% (Drew *et al.*, 2003). Des résultats similaires ont été observés chez l'homme (Short *et al.*, 2005).

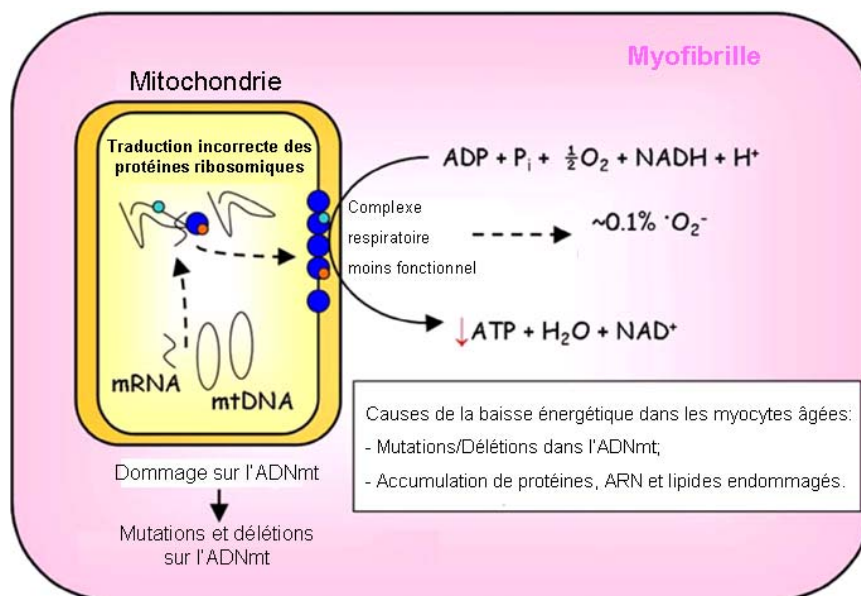


Figure 23 : Causes principales de la perte énergétique dans les fibres musculaires âgées (adapté de Dirks *et al.*, 2006)

III.C.2 Les conséquences cellulaires de la déplétion en énergie

Nous venons de voir que le statut énergétique diminue dans les tissus âgés comme le muscle squelettique. La kinase activée par l'AMP (AMPK) apparaît comme un senseur central du signal de perte d'énergie. Son activité dépend du ratio AMP/ATP et elle joue un rôle essentiel dans la survie cellulaire et/ou l'apoptose (suivant le membre de la famille impliqué) en réponse à la perte d'énergie du tissu âgé. La formation d'AMP dans la cellule entraîne l'activation d'AMPK. De ce fait, cette activation entraîne un shift métabolique de l'anabolisme vers le catabolisme afin de diminuer l'utilisation de l'ATP. Plus spécifiquement, l'AMPK inhibe les processus de synthèse protéique, de croissance et de division cellulaire et active les processus tels que la capture du glucose, la glycolyse, la respiration aérobie et la biogenèse mitochondriale (Hardie, 2004). De plus, des résultats récents ont montré que l'activation d'ARK5 (un membre de la famille de la sous-unité catalytique d'AMPK) dans plusieurs types de cancer protège de l'apoptose *via* la phosphorylation de la caspase 6. Cette dernière est capable de cliver et d'inactiver FLIP (protéine anti-apoptotique) *in vitro* (Suzuki *et al.*, 2004) et de favoriser la formation de corps apoptotiques en clivant la lamine A (Ruchaud *et al.*, 2002). Un autre rôle d'AMPK serait donc d'inactiver la caspase 6 et ainsi de protéger la cellule de l'apoptose lorsqu'il y aurait un déficit en énergie.

Le déficit en énergie peut aussi entraîner la nécrose ou l'apoptose. L'apoptose est un processus dépendant de l'énergie et de ce fait, si le déficit en énergie dépasse un certain seuil critique, la nécrose sera favorisée (Yaglom *et al.*, 2003). En revanche, si ce seuil critique n'est pas atteint, ce sera l'apoptose qui sera favorisée (Izyumov *et al.*, 2004). Des études *in vitro* ont montré que la réponse au déficit d'énergie est induite par la translocation de Bax et du cytochrome C conduisant à l'activation de la caspase 3 (voir chapitre apoptose). En revanche, les mécanismes par lesquels le déficit en énergie entraîne la translocation de Bax restent peu connus.

Les données présentées dans cette partie introductive mettent en évidence l'intervention des calpaïnes dans des processus physiologiques tels que la myogenèse, la prolifération cellulaire, l'apoptose et dans des pathologies comme les atrophies musculaires. L'importance de ces phénomènes durant le vieillissement musculaire nous a permis d'émettre l'hypothèse selon laquelle les calpaïnes pourraient contribuer aux mécanismes cellulaires mis en jeu lors de la sarcopénie. C'est à partir de cette hypothèse que nous nous sommes posés différentes questions :

√ Est-ce que les calpaïnes sont activées ou à contrario inhibées au cours du vieillissement musculaire ? Quels sont les mécanismes dirigeant leur régulation ? Ont-elles de nouveaux partenaires/substrats durant la sarcopénie ?

√ Est-ce qu'un stress oxydant peut modifier l'activité des calpaïnes ? Est-il possible de réverser les effets cellulaires des calpaïnes ?

Les résultats obtenus lors de nos investigations nous ont permis de répondre en partie à ces différentes questions. Ces données sont présentées dans la partie suivante sous forme de publications.

Résultats

Résultats

Chapitre 1

Evolution du système protéolytique neutre calcium-dépendant et de ses partenaires durant le vieillissement du muscle squelettique

Article 1: Involvement of the calcium-dependent proteolytic system in skeletal muscle aging.

Elise Dargelos, Cédric Brulé, Lydie Combaret, Abdessatar Hadj-Sassi, Sandrine Dulong, Sylvie Poussard, Patrick Cottin.

Experimental Gerontology, 42 : 1088–1098 (2007)

Le vieillissement est associé à une perte progressive et involontaire de la masse musculaire qui est nommée sarcopénie (Evans, 1995). Même si la sarcopénie commence à être bien définie, l'aetiology de cette maladie reste peu connue et pourrait être d'origine multifactorielle :

- _ une diminution de la capacité régénérative des cellules satellites contribuant en partie à une récupération musculaire plus lente .
- _ une dérégulation de l'activité protéolytique intracellulaire (une activité dérégulée des calpaïnes dans d'autres tissus a été montrée) (Nixon, 2003).
- _ une augmentation de la concentration en espèces réactives de l'oxygène (ROS) et en calcium intracellulaire.
- _ des dérégulations dans de nombreuses voies signalétiques.

Tous ces mécanismes sont décrits dans une revue que nous avons publiée dans le journal à comité de lecture Biochimie en 2008 (Dargelos *et al.*, 2008).

La fonte musculaire caractéristique du vieillissement résulte d'un déséquilibre entre la régénération musculaire et la mort cellulaire, phénomène largement influencé par l'activité protéolytique intracellulaire. L'intervention des calpaïnes, protéases neutres calcium-dépendantes, dans les processus associés au développement, à la régénération et à l'intégrité du tissu musculaire est incontestable. Les calpaïnes apparaissent, en effet, comme des acteurs clés des voies de transduction liées à la myogenèse, la prolifération, la survie cellulaire et le stress oxydant. De plus, l'augmentation de la concentration intracellulaire en Ca²⁺ durant

certaines maladies telles que les dystrophies et atrophies musculaires aboutie généralement à l'augmentation de l'activité des calpaïnes. Toutefois aucune étude permettant d'établir la relation vieillissement du tissu musculaire- activité calpaïne n'a été entreprise à ce jour.

Le but de ce travail a donc consisté à appréhender les variations d'activité et d'expression des acteurs du système protéolytique neutre calcium-dépendant au cours de l'âge dans des muscles des pattes arrières de rat Wistar de trois et vingt-quatre mois. Ainsi, nous avons quantifié les niveaux d'expression de la μ -, m-calpaïne, de la calpastatine et de la petite sous unité régulatrice. Afin de compléter ces résultats, des mesures de l'activité de la μ -, m-calpaïne et calpastatine ont été réalisées après purification partielle de ces enzymes. Ces dosages *in vitro* ont ensuite été complétés par l'étude d'un substrat connu des calpaïnes et généralement utilisé comme marqueur de leur activité *in situ*: l' α -fodrine.

Résultats principaux :

La localisation intracellulaire des calpaïnes joue un rôle important dans le contrôle de leur activité. En effet, elle leur permet soit d'être localisées à un endroit propice pour leur activation ou même d'être à proximité de leurs substrats. Ainsi, la distribution subcellulaire des calpaïnes ubiquitaires met en évidence une localisation majoritairement cytoplasmique comparée à la fraction membranaire. Celle de la calpastatine est uniquement cytosolique. En revanche, aucune différence n'a été observée entre les rats de trois et vingt-quatre mois.

L'étude du niveau des ARNm et des protéines a montré une influence de l'âge sur l'expression des calpaïnes. En effet, l'ARNm codant pour la μ -calpaïne augmente d'un rapport 1,7 dans les muscles de rats de 24 mois ; en revanche, il n'y a aucune différence pour les ARNm spécifiques de la m-calpaïne. Similairement, le niveau d'expression protéique de la μ -calpaïne augmente de 38% dans le muscle de rats vieux alors que nous n'avons détecté aucune différence pour la m-calpaïne. De plus, le niveau d'expression de la calpastatine diminue de 28% dans les muscles de rats vieux.

La purification partielle des deux calpaïnes ubiquitaires par une série de deux chromatographies a ensuite été réalisée: une colonne hydrophobe pour les séparer de la calpastatine suivie d'une colonne échangeuse d'anions pour séparer les deux isoenzymes. Les tests d'activité des fractions éluées, ont montré dans le cas des deux enzymes une forte

augmentation de leur activité au cours de l'âge. D'autre part, une diminution significative de 40% de la forme native de l' α -fodrine (240 kDa) couplée à une augmentation de 20% de son fragment de dégradation à 150 kDa (caractéristique de l'activité calpaïne) a pu être mise en évidence et corrobore les résultats précédents. Pour compléter ces résultats, l'activité inhibitrice de la calpastatine, partiellement purifiée (incubation des extraits durant dix minutes à 100°C) et testée sur la m-calpaïne, a montré une diminution significative au cours de l'âge. Aucune différence d'inhibition n'a été observée sur l'activité de la μ -calpaïne.

Il est maintenant admis que les calpaïnes agissent de concert avec les caspases dans la régulation de la mort cellulaire. De ce fait, l'activité de la caspase 3, caspase effectrice dans la cascade des caspases, a été étudiée chez les rats jeunes et vieux. L'utilisation d'un substrat ainsi que d'un inhibiteur spécifique de la caspase 3 permet de quantifier cette activité. Il n'a été observé aucune différence de l'activité de la caspase 3 dans le muscle des rats de trois et vingt-quatre mois.

Les résultats obtenus montrent clairement une augmentation de l'expression et surtout de l'activité des calpaïnes ubiquitaires au cours de l'âge dans le muscle de rat Wistar. De plus l'inhibiteur endogène, la calpastatine, perd également de son potentiel inhibiteur sur la m-calpaïne. Enfin nous avons mis en évidence que cette augmentation d'activité dans le muscle âgé n'était pas associée à une augmentation de l'activité caspase 3. L'action potentielle des calpaïnes dans un éventuel déclenchement de l'apoptose dans les muscles âgés serait donc indépendante de cette voie. Ces résultats restent toutefois préliminaires car ils ne donnent pas d'indication sur l'état du système calpaïne à l'âge adulte.

Involvement of the calcium-dependent proteolytic system in skeletal muscle aging

Elise Dargelos^{a,*}, Cédric Brulé^a, Lydie Combaret^b, Abdessatar Hadj-Sassi^a,
Sandrine Dulong^c, Sylvie Poussard^a, Patrick Cottin^a

^a *Université Bordeaux I, INRA USC 2009, Unité Protéolyse Croissance et Développement Musculaire, ISTAB, avenue des facultés, 33405 Talence Cedex, France*

^b *Unité de Nutrition Humaine, Equipe Protéolyse, Centre de Recherche INRA de Clermont-Ferrand-THEIX, 63122 CEYRAT, France*

^c *UMR 6548, Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Moléculaire des Epithéliums, 28, avenue de Valrose, 06108 Nice Cedex 2, France*

Received 5 February 2007; received in revised form 28 August 2007; accepted 30 August 2007

Available online 14 September 2007

Abstract

Aging is associated with a progressive and involuntary loss of muscle mass also known as sarcopenia. This condition represents a major public health concern with high socio-economics implications. Although sarcopenia is well documented, the aetiology of this condition still remains poorly understood. Calpains are ubiquitous proteases regulated in part by a specific inhibitor, calpastatin. They are well known to have major implications in muscle growth and differentiation. The aim of the present study was to determine if this proteolytic system could be involved in the phenotype associated with sarcopenia. Calpains and calpastatin levels, subcellular distributions and activities were compared between muscles from 3 and 24 months old rats. Altogether, the results we obtained showed an overall increase in calpain activities associated with muscle aging. These findings suggest that the calcium-dependent proteolytic system is indeed involved in sarcopenia.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Calpains; Proteolysis; Muscle; Aging; Sarcopenia

1. Introduction

Aging is associated with a progressive and involuntary loss of muscle mass also known as sarcopenia. This condition is characterised by impaired muscle strength and function that affects 25% of person under the age of 70 years and 40% of those aged 80 years or more (Baumgartner et al., 1998). Sarcopenia has been reported even among healthy, physically active subjects (Hugues et al., 2002), and is becoming one of the major public health problems of our aging populations.

Because of the impairment of muscle mass and strength, sarcopenia has a very negative impact on old

people's quality of life, with an increased incidence of falls and bone fractures (Szulc et al., 2005). Muscle is also the major reservoir of proteins in the body. After an injury or a stress, amino acids are released from this compartment to help tissue repair and maintain energetic balance (Griffiths et al., 2000). For old persons however, muscle atrophy leads to a very slow recover after a disease or trauma. All these situations require social and health care and consequently represent a massive cost for our society.

Although sarcopenia is now well documented, the aetiology of this condition still remains poorly understood and could well be a multifactorial disorder.

From an histological point of view, sarcopenia is characterised by a decrease in the number and the size of muscle fibres. Several different components have been proposed to contribute to this phenotype such as hormonal changes,

* Corresponding author. Tel.: +33 5 40 00 87 57; fax: +33 5 40 00 84 96.
E-mail address: e.dargelos@istab.u-bordeaux1.fr (E. Dargelos).

malnutrition, changes in neuronal stimulation, lack of exercise or chronic inflammation (Carmeli and Reznick, 1994; Evans, 2004; Lamberts et al., 1997; Morley and Baumgartner, 2004; Visser et al., 2002). The reduction in the number of fibres occurring during muscle aging could be partly due to apoptosis activation (Dirks and Leeuwenburgh, 2005). If caspase-dependent pathways have been well characterised in apoptotic process, calpains could also play a role in cell death associated with sarcopenia (Dirks and Leeuwenburgh, 2004). According to some authors an imbalance between the rates of protein synthesis and proteolysis could also account for the loss of muscle mass (Attaix et al., 2005; Yarasheski, 2003). For example, subunits of the proteasome as well as ubiquitin protein levels were found to increase in old rat muscle (Cai et al., 2004; Husom et al., 2004).

Calpains belong to a large family of calcium-dependent cystein proteases. Fourteen isoforms have been identified so far. They are ubiquitous or tissue-specific enzymes (Goll et al., 2003). The two best characterised isozymes are the ubiquitously expressed μ - and m -calpains. Both are heterodimeric proteins consisting of a distinct large catalytic subunit (80 kDa) and a common small regulatory subunit (30 kDa). Besides its regulation by calcium, calpain activity is tightly controlled by calpastatin, the specific endogenous inhibitor, binding to phospholipids, autoproteolysis and phosphorylation (Cottin et al., 2001; Glading et al., 2004; Saito et al., 1992). Although a great deal of informations has been gathered for the last decades in the calpain field, the physiological function of the enzymes still remains poorly understood. Calpains are however believed to be involved in a variety of cellular processes such as cytoskeletal remodelling, cell spreading and motility, signal transduction, cell cycle regulation, apoptosis and myogenesis (Aragon et al., 2002; Dedieu et al., 2004; Del Bello et al., 2006; Lebart and Benyamin, 2006; Mazeris et al., 2006; Raynaud et al., 2004). A main role played by calpains during muscle development and differentiation has been partly established in our laboratory (Cottin et al., 2000; Dedieu et al., 2004; Dulong et al., 2004; Leloup et al., 2006). Calpains are also involved in several diseases. Among them, some are directly linked to the disruption of a calpain gene like LGMD2A, associated with mutations in the calpain 3 gene (Richard et al., 1995), and others are a consequence of a loss of calcium homeostasis. For instance, calpain activity has been shown to be involved in cataract formation, Alzheimer's disease or muscular dystrophies (Biswas et al., 2004; Raynaud and Marcilhac, 2006; Tidball and Spencer, 2000).

Because calcium homeostasis is frequently altered during aging, it could explain why unregulated calpain activities are often associated with degenerative diseases. An increase in calpain activity has been indeed reported, as well as an elevation of the calcium influx in several aging tissues (Manya et al., 2002; Ouanounou et al., 1999; Romero et al., 2002; Sloane et al., 2003). The most striking example being the Alzheimer's disease where increased cal-

pain activity has been correlated with impaired calcium homeostasis (Nixon, 2003).

Calcium plays a critical role in muscle function. Several studies have recently shown that an impaired calcium homeostasis could be involved in the loss of muscle mass occurring with aging (Delbono, 2002; Fraysse et al., 2006). Among other deleterious effects, high calcium level could trigger apoptosis via calpain activation and subsequent caspase 12-mediated pathway (Tan et al., 2006). Still, little information is available today concerning the link between calpains and sarcopenia.

In the present study, we thus characterised the effects of muscle aging on the calcium-dependent proteolytic system. The levels of calpains and calpastatin were quantified, the specific activities were measured and all data accordingly show a significant tendency of calpain activities to rise with muscle aging.

2. Materials and methods

2.1. Materials

NBT (nitrobluetetrazolium) and BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indoyl-1-phosphate) were purchased from Promega. Immobilon P transfer membrane was obtained from Millipore. The Coomassie Protein Assay Reagent was purchased from Interchim. The M-MLV reverse transcriptase was from Invitrogen and random primers from Promega. The Hitrap Phenyl FF and HiTrap DEAE FF columns were obtained from GE Healthcare. Ac-DEVD-AMC and Ac-DMQD-CHO were purchased from Calbiochem. Anti-calpastatin and anti-calpain small subunit were from TEBU Santa Cruz Biotechnology. The m -calpain antibodies were raised in sheep as described by Cottin et al. (1994). The antibodies for fodrin were purchased from AbCys. Anti- μ -calpain antibodies, all secondary antibodies and other chemicals were from Sigma. Molecular weight markers were obtained from Biorad.

2.2. Animals

The study was conducted in accordance with the European Communities Council Directives (861609/EEC). All the experiments conformed to the Guidelines on the Handling and Training of Laboratory Animals. Male Wistar rats, purchased from Charles Rivers, were maintained in a room with a constant airflow system, controlled temperature (21–23 °C) and a 12 h light/dark cycle. The rats were allowed ad libitum access to food and tap water. They were divided into two groups (6 animals per group) designated as young and old. Young rats were studied at 3 months of age and old rats at 24 months. The animals were killed by decapitation and all hindlimb muscles from both legs were rapidly removed, quick frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C. Frozen muscle was then carefully collected from each individual in the same group and pooled for further experiments.

2.3. Electrophoresis and immunoblotting procedures

The samples were run on a 10% SDS-PAGE, as described by Laemmli (1970). The proteins were then transferred onto Immobilon P membrane. The membranes were blocked at room temperature for 2 h using TBS (tris-buffered saline: 50 mM tris-buffer pH 8, 138 mM NaCl, 2.7 mM KCl) containing 5% (w/v) skim milk. The membranes were washed with TBS and incubated with the primary antibodies in TBS containing 1% skim milk for 2 h at room temperature. The following antibody dilutions were used: 1/1000 for m-calpain, 1/5000 for μ -calpain, 1/250 for calpastatin, 1/300 for calpain small subunit, 1/1000 for fodrin. The membranes were washed with TBS and incubated with the secondary antibodies (alkaline phosphatase conjugated antibodies, 1/10000) in TBS containing 1% skim milk for 1 h at room temperature. After washing with TBS, the NBT/BCIP was used as detection substrates.

2.4. Extraction of total RNA and reverse transcription

Total RNA was extracted using the Promega SV total RNA isolation system. The integrity of the RNA extracted was verified by electrophoresis. The purity and concentration of total RNA were estimated by measuring the 260 nm/280 nm absorbance ratio. Then, 300 ng RNA was reverse transcribed to cDNA using random primers and M-MLV reverse transcriptase. The obtained cDNA were conserved at -20°C and used in q-PCR.

2.5. Quantitative PCR

Quantitative PCR was performed using Roche LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I kit according to manufacturer's instructions. The PCR reactions were performed in capillary tubes in a final volume of 20 μl containing 1 \times LC-DNA Master SYBR Green I mix, 4 mM MgCl_2 , 0.5 μM of each primer and 2 μl cDNA. Forward and reverse primer sequences for μ - and m-calpain amplification are: agtcgtgccgacgatggtga, actgtccagggtcaactccg and gccatcaagtacatcaaccagg, gtccttggcagatgtctgtg, respectively. After a denaturation step (10 min at 95°C), amplification was carried out for 40 cycles of 10 s at 95°C , 5 s at 58°C , and 10 s at 72°C . At the end of the run, the specificity of the reaction was confirmed by analysing the melting curves. Crossing points were calculated using the second derivative maximum method in the LightCycler® software. Standard curves were done by plotting crossing points versus log concentration of serial dilutions of plasmids containing μ - and m-calpain cDNA. Transcript concentration of both isoforms was determined from the standard curve and compared between young and old samples.

2.6. Cell fractionation

Frozen muscle (100 mg) was homogenized in PBS (137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 4 mM Na_2HPO_4 , 1.76 mM

KH_2PO_4 , pH 7.5) containing 1 mM NaN_3 , 5 mM EGTA, 0.5 mM DTT and protease inhibitor cocktail (Roche). The homogenates were sonicated and centrifuged 1 h, 100000g at 4°C . Supernatants were kept and designated as the cytosolic fractions. Pellets were further homogenized in PBS containing 1 mM NaN_3 , 5 mM EGTA, 1 mM DTT, protease inhibitor cocktail and 0.1 % Triton X-100, left on ice for 15 min and centrifuged 10 min, 1000g at 4°C . Supernatants were kept and designated as the particulate fractions.

2.7. Calpain activities

Calpain activities were assayed using fluorescein isothiocyanate-labeled casein (FITC-casein) as a substrate and by measuring the fluorescence of a 2.5% trichloroacetic acid supernatant (Wolfe et al., 1989). Briefly, 50 μl of sample were mixed with 50 μl of FITC-casein (250 mM Tris-acetate pH 7.5, 250 mM KCl, 6.75 mg/ml casein-FITC, 85 mM DTT) and 25 μl of CaCl_2 (25 mM) to start the reaction. As a reference, EGTA (10 mM) was added instead of CaCl_2 . After a 30 min incubation at 37°C , 125 μl of stop solution (5% TCA, 0.01% Triton X-100) was added and the samples were centrifuged 10 min, 3500 g at 4°C . The 200 μl supernatants were diluted in 800 μl phosphate buffer (0.3 M Na_2HPO_4) and fluorescence was measured. The results are expressed in fluorescence unit (FU)/mg of protein. One FU corresponds to the amount of enzyme able to increase the fluorescence intensity ($\lambda_{\text{exc}} = 495 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 518 \text{ nm}$) of the supernatant by 1 unit for 30 min at 37°C compared to the reference without calcium (EGTA).

2.8. Calpain purification

Frozen muscle (600 mg) was homogenized in buffer A (20 mM Tris-buffer pH 7.5, 2 mM EGTA, 2 mM EDTA, 1 mM NaN_3 , 1 mM DTT). Homogenates were sonicated and centrifuged 15 min, 5000g at 4°C . Supernatants ionic strength was adjusted to 1 M NaCl and pH to 7.5. After filtration through a 0.45 μm filter and protein quantification, samples were applied to a 1 ml hydrophobic interaction column (HiTrap Phenyl FF) first equilibrated with buffer A containing 1 M NaCl. Elution was carried out with buffer A (0 M NaCl) containing 1% ethyleneglycol. Both calpains were recovered in the elution peak whereas calpastatin did not bind to the column (Cottin et al., 1994). Calpain activities were measured and positive fractions were pooled and loaded onto a 1 ml anion exchange column (HiTrap DEAE FF) first equilibrated with buffer A (0 M NaCl). Elution was realised with a two step ionic strength method. First, buffer A containing 0.2 M NaCl gave a peak containing μ -calpain. Then, buffer A containing 0.35 M NaCl allowed to recover m-calpain.

2.9. In vitro digestion of α -fodrin

Frozen muscle (100 mg) from 3 months old rats was homogenised in 50 mM Tris-buffer pH 7.5. After a quick

centrifugation (1000g 5 min at 4 °C), supernatant (100 µg of proteins) was incubated with µ-calpain purified from rabbit muscle (Cottin et al., 1994). CaCl₂ or EGTA (5 mM) was added to the reaction and tubes were left 10 min at room temperature. The reaction was stopped by addition of sample buffer (50 mM Tris–HCl pH 6.8, 1% SDS, 0.01% bromophenol blue, 30% glycerol, 2% β-mercaptoethanol).

2.10. Calpastatin activity

Frozen muscle (600 mg) was homogenized in buffer A (20 mM Tris-buffer pH 7.5, 2 mM EGTA, 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM NaN₃). Homogenates were sonicated and centrifuged 15 min, 5000g at 4 °C. Supernatants were heated for 10 min at 90 °C, cooled on ice for 5 min and centrifuged for 10 min 12000g at 4 °C. Supernatants were then used in a calpain activity assay, using calpains previously purified from rabbit (Cottin et al., 1994).

The assays were carried out like described in paragraph 7. The 50 µl samples contained 10 µl of purified enzyme (2 µg) and 40 µl of heated supernatant (10 µg proteins). The results are expressed in percentage of calpain activity.

2.11. Caspase 3 activity

Frozen muscles (400 mg) were homogenized in ice-cold buffer (pH 7.5) containing 20 mM HEPES, 20% glycerol, 10 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100 and 1 mM DTT. The homogenates were centrifuged at 1500g (5 min, 4 °C). Cytosolic proteins from the resulting supernatant were extracted by three successive centrifugations (6000g, 5 min, 4 °C). The last supernatant was stored at –80 °C until caspase 3 activity measurement.

Caspase 3 activity was determined by measuring the hydrolysis of the fluorogenic substrate Ac-DEVD-AMC in the presence or absence of the specific inhibitor Ac-DMQD-CHO. To measure caspase 3 activity, 50 µl containing 50 µg of cytosolic proteins were incubated with 50 µl of reaction buffer (100 mM PIPES, 0.2 mM EDTA, 20% Glycerol, 0.1 mM DTT, 0.1 mM Ac-DEVD-AMC) containing or not 0.1 mM of the caspase 3 inhibitor IV, Ac-DMQD-CHO. Caspase 3 activity was determined by measuring the accumulation of the fluorogenic cleavage product (AMC) at 37 °C during 1 h using a luminescence spectrometer FLX800 (Biotek). Fluorescence was recorded continuously at 380 nm excitation wavelength and 440 nm emission wavelength. The difference between the rates of substrate hydrolysis recorded with or without the caspase inhibitor in the reaction medium was calculated, and the final data were corrected by the amount of protein in the reaction.

2.12. Protein quantification

Protein concentrations were determined using a Coomassie Protein assay reagent with BSA as standard.

2.13. Densitometric analysis

The apparent densities of bands on the membranes were estimated after scanning with a video-densitometer (Gel-Doc 2000, Biorad). The linearity response and the reproducibility of densitometric analysis were controlled by duplicate calibration curves.

2.14. Statistical analysis

All data are expressed as means ± SEM and are representative of an average of at least three separate experiments. Each single experiment was conducted with frozen muscle pooled from 6 rats of each group of age. The statistical significance of the difference between multiple groups was determined using ANOVA followed by a Student's *t*-test. A value of *P* < 0.05 was considered significant.

3. Results

3.1. Muscle aging and calpain subcellular distribution

Many cytoskeletal and membrane bound proteins belong to calpain substrates, and a membrane activation model has already been proposed by several authors (Suzuki and Sorimachi, 1998). In that context, changes in subcellular localisation of calpains could be linked to a change of activity during aging. Subcellular distribution of the enzymes and their inhibitor was compared after a 100000g centrifugation of muscle extracts from 3 or 24 months old rats followed by Western blot detection (Aragon et al., 2002). Results shown in Fig. 1a first indicated a major cytosolic representation of both ubiquitous calpains and an exclusive cytosolic localisation of calpastatin. After signal quantification, the lower proportion of µ- and m-calpains in the particulate fraction was depicted in Fig. 1b. However, no significant change in the subcellular distribution of the proteases could be noticed between young and old muscle extracts.

3.2. Muscle aging and calpain/calpastatin expression levels

In order to study changes in ubiquitous calpains and calpastatin expression level during aging, Western blots were carried out using muscle extracts from 3 and 24 months old rats. As shown in Fig. 2a and b, the calcium-dependent proteolytic system underwent significant changes during muscle aging. µ-calpain expression increased by 38% between 3 and 24 months. Calpastatin, the endogenous calpain inhibitor, showed a 28% decrease of its expression level between young and old specimen. m-calpain level didn't change with muscle aging. At last, the expression of the small subunit was quantified. Although its level increased by 16% between 3 and 24 months, this difference was not significant.

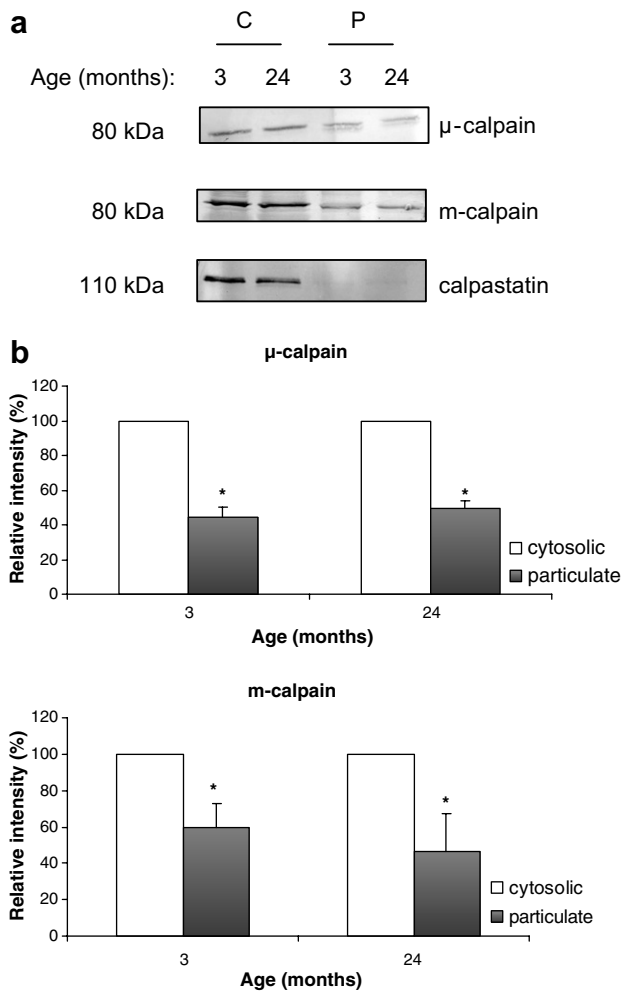


Fig. 1. Comparison of calpains and calpastatin levels in young and old rat muscle in cytosolic and particulate fractions. Subcellular fractions were prepared from rat muscles as described in Section 2. 50 μ g of protein were run on a 10% SDS-PAGE. Immunodetection was carried out using specific antibodies for μ -calpain, m-calpain and calpastatin (a). Pictures shown are representative of at least 3 separate experiments. C: cytosolic fraction, P: particulate fraction. The level of μ -calpain and m-calpain was quantified and expressed as a percentage of the level obtained in the cytosolic fraction (b). Bars on the graph represent the standard deviation. *Significantly different from the control ($P < 0.01$).

Specific mRNA levels for μ - and m-calpains were quantified by real time RT-PCR. As shown in Fig. 2c, μ -calpain transcripts increased 1.7-fold between 3 and 24 months. On the other side, m-calpain mRNA level was unchanged in both conditions. This data are in accordance with what we observed at the protein level, suggesting that muscle aging triggers an up-regulation of μ -calpain expression at the transcriptional level.

According to the present data, changes in calpain expression level varies between both isoforms. μ -calpain expression level would be more sensitive to aging than m-calpain in muscle. However, altogether, the results clearly indicated a change of the calpain/calpastatin balance with muscle aging.

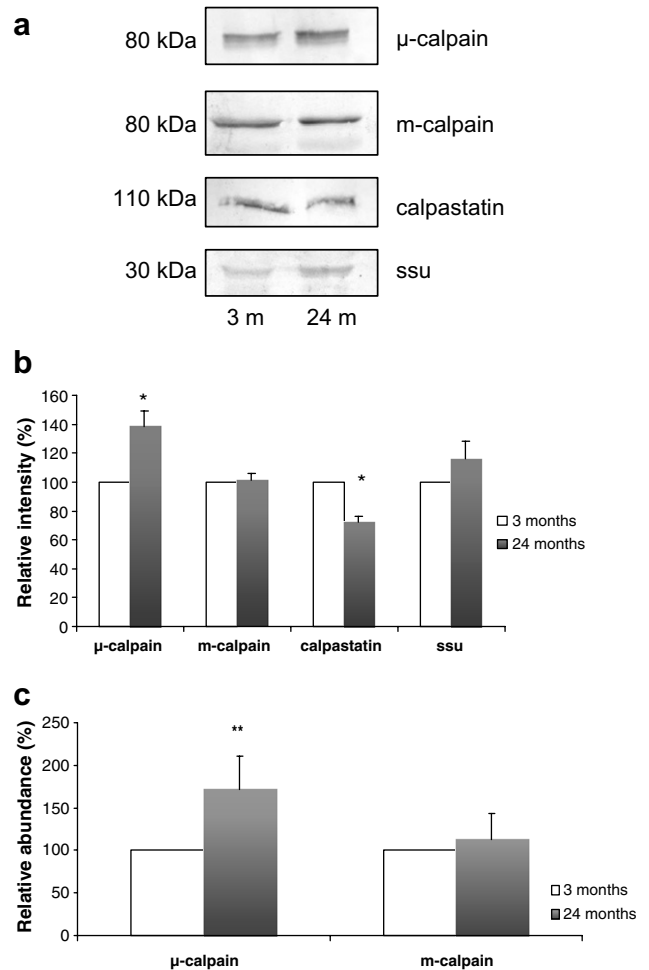


Fig. 2. Expression of μ -calpain, m-calpain, calpastatin and calpain small subunit (ssu) in muscle from young (3 months) and old rats (24 months). Proteins were extracted and 50 μ g were subjected to SDS-PAGE. Immunodetection was carried out using specific antibodies for μ -calpain, m-calpain, calpastatin and ssu (a). The level of μ -calpain, m-calpain, calpastatin and ssu was quantified and expressed as a percentage of the level obtained in the young rats muscle (b). Total RNA were extracted and 300 ng were reverse transcribed using random primers. Standard curves were done by plotting crossing points versus log concentration of serial dilutions of plasmids containing μ - and m-calpain cDNA. Transcript concentration of μ - and m-calpain was determined from the standard curve. Results are expressed as a percentage of the level obtained in the young rats muscle (c). Pictures shown are representative of at least 3 separate experiments. Bars on the graph represent the standard deviation. *Significantly different from the control ($P < 0.01$), **significantly different from the control ($P < 0.05$).

3.3. Muscle aging and calpain activity

We next tested the calpain activity, from 3 and 24 months old rat muscles. Crude extracts were first submitted to a hydrophobic interaction chromatographic (HIC) column in order to discard calpastatin whose presence would interfere with the protease activity (Cottin et al., 1994). Both μ - and m-calpains were eluted in the same fractions as controlled by Western blot using specific antibodies (Fig. 3a). Positive fractions (10–13) were pooled and protein amounts were measured. FITC-casein was then

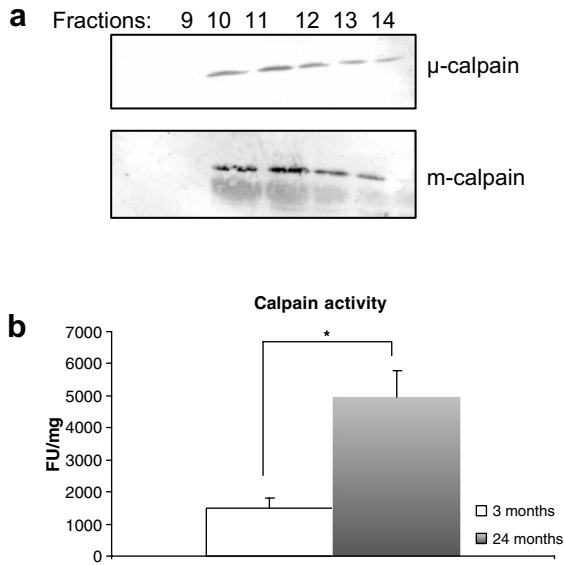


Fig. 3. Quantification of calcium-dependent proteolytic activity in young and old rat muscles. Calpain activity was quantified after a HiTrap Phenyl FF column as described in Section 2. Fractions positive for both μ- and m-calpains were identified by Western blot (a). Elution profiles were identical in young and old samples. Specific activity levels are expressed as arbitrary units from the fluorescence of FITC-casein and values are the means ± S.D. for at least 3 separate experiments (b). *Significantly different ($P < 0.05$).

used as a substrate to measure the calcium-dependent activity of the pool, expressed in fluorescence units (FU). Specific activities were calculated and expressed in fluorescence unit per mg of protein. As shown in Fig. 3b, calpain activity was 3.3 times higher in 24 months than in 3 months muscle extract (4957 versus 1477 FU/mg). This experiment allowed us to measure the overall calpain activity. We were able to confirm that in muscle, it increases during aging, like it has been shown previously in other tissues (Manya et al., 2002).

Showing that global calcium-dependent activity was indeed greater in old muscles, was a first step in our study. However, we next wanted to measure calpain activities individually. For that purpose, the pooled positive fractions collected from the HIC column were loaded onto an anion exchange chromatography column. Elution was performed using a two step procedure. μ-calpain was first collected by running a 0.2 M NaCl buffer and m-calpain elution was done by raising the ionic strength up to 0.35 M NaCl. These conditions have been previously used in our laboratory (Cottin et al., 1994). Fractions were collected and μ- and m-calpains were identified by Western blots (Fig. 4a). As previously described fractions positive for μ- and m-calpains (29–31 and 46–48, respectively) were pooled and calcium-dependent activity was measured for each pool. The protein content was then quantified and

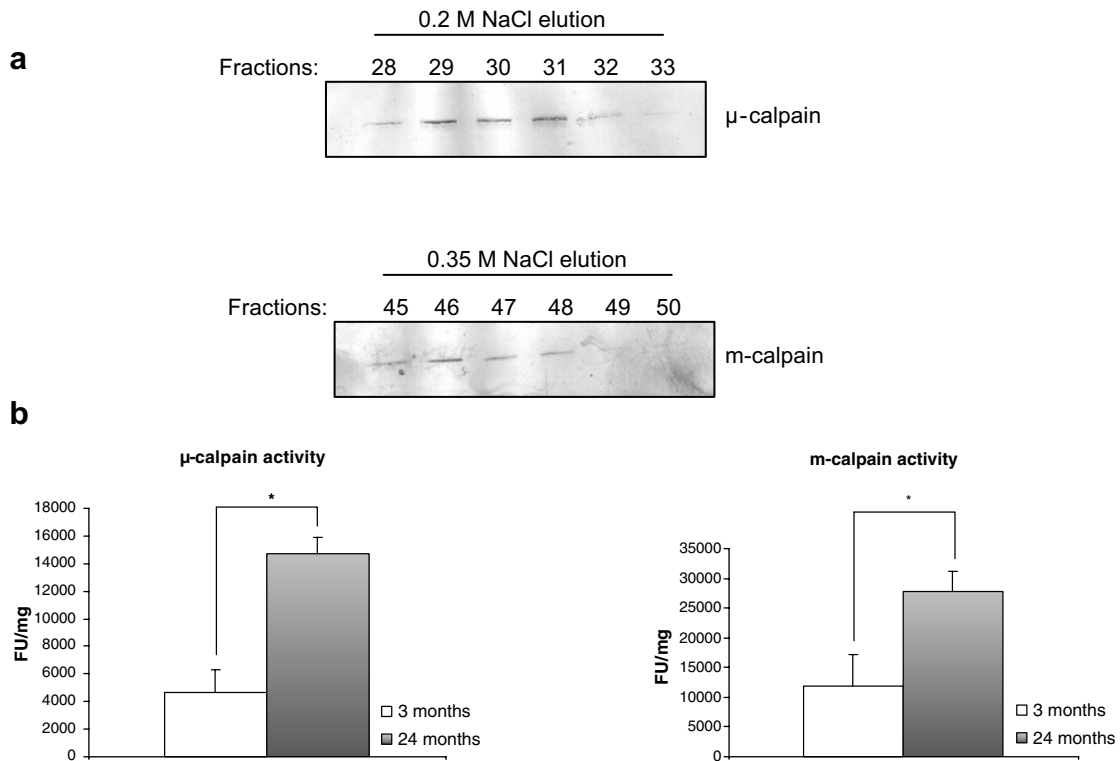


Fig. 4. Quantification of μ-calpain and m-calpain activities in young and old rat muscle. Proteins were eluted from a HiTrap DEAE FF column as described in Section 2. Fractions were collected and tested for μ- and m-calpains by Western blot (a). Identical elution profiles were obtained in old and young samples. Specific activity levels are expressed as arbitrary units from the fluorescence of FITC-casein and values are the means ± SD for at least 3 separate experiments (b). *Significantly different ($P < 0.01$).

μ - and m-calpains specific activities were calculated. As depicted in Fig. 4b, enzymatic activity of both proteases significantly increased with age. μ -calpain specific activity was 3.1 times higher in old muscle extracts than in young ones (14745 versus 4627 FU/mg, Fig. 4b), while m-calpain activity increased by 2.3 times between 3 and 24 months (27890 compared to 11 820 FU/mg, Fig. 4b).

3.4. Muscle aging and α -fodrin degradation

All the data reported above were based on in vitro activity assays using FITC-casein as a substrate. To confirm the increase of calpain activity with muscle aging in vivo, we compared the levels of α -fodrin in young and old rats muscle by Western blot using specific antibodies. Cleavage of this 240 kDa cytoskeletal protein has been used in different studies as an indication of calpain activity in vivo (Manya et al., 2002; Rice and Blough, 2006). As shown in Fig. 5 the level of full length α -fodrin decreased with muscle aging. After signal quantification, a 40 % reduction of the 240 kDa band was estimated between 3 and 24 months extracts ($P < 0.05$). In the mean time, we could also detect an increase of the 150 kDa degradation product. Although the intensity of the band was 20% higher in old samples

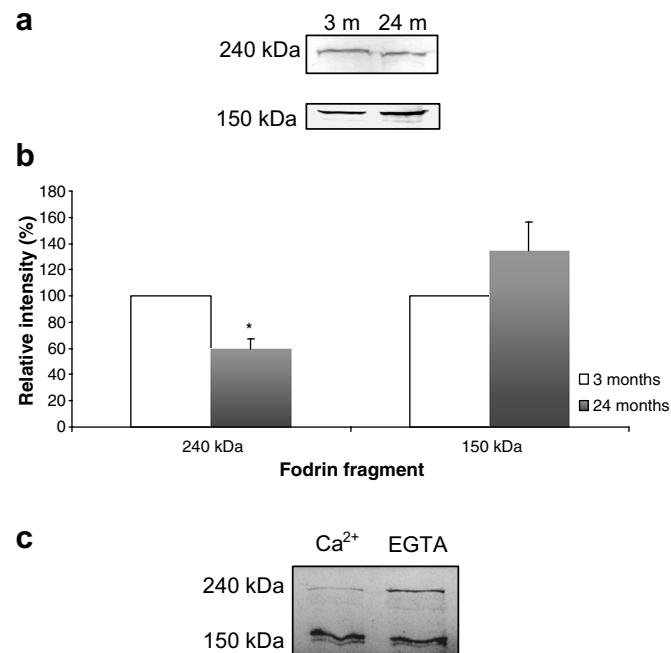


Fig. 5. α -fodrin degradation in young and old rat muscle. Proteins were extracted and 50 μ g were subjected to SDS-PAGE. Immunodetection was carried out using specific antibodies for α -fodrin (a). The level of fodrin 240 kDa and 150 kDa fragments was quantified and expressed as a percentage of the level obtained in the young rat muscles. Bars on the graph represent the standard deviation (b). Protein extracts from 3 months old rat muscles were incubated with purified μ -calpain and 5 mM CaCl₂ or EGTA, as described in Section 2. Samples were subjected to SDS-PAGE and immunodetection was carried out using specific antibodies for α -fodrin (c). Pictures shown are representative of at least 3 separate experiments. *Significantly different from the control ($P < 0.05$).

than in young ones, this difference was not significant (Fig. 5b). According to some researchers, α -fodrin can also be cleaved by caspase 3 (Janicke et al., 1998). In order to clearly show that what we observed was linked to calpain activity, we carried out an in vitro digestion assay. Western-blot analysis of the digests clearly indicates a reduction of native fodrin in the presence of calcium (Fig. 5c). Altogether these data confirmed in vivo the rise in calpain activity we observed in FITC-casein proteolysis assays.

3.5. Muscle aging and calpastatin activity

As previously mentioned, calpain activity is tightly regulated in vivo by a specific endogenous inhibitor, calpastatin. It was thus very important for our study to next address the evolution of calpastatin activity during muscle aging. This protein being heat-stable (Goll et al., 2003), crude extracts were first heated at 90 °C for 10 min in order to discard most other proteins including calpains (data not shown). The presence of calpastatin was then checked by Western blot using specific antibodies (Fig. 6a). The heated extracts from 3 or 24 months old rats muscle were used in a calpain assay using μ - or m-calpain purified from rabbit muscle (Cottin et al., 1994). Fluorescence was measured and compared to a control without added calpastatin. Results were then expressed as a percentage of calpain activity inhibition. As shown in Fig. 6b, calpastatin dependent inhibition of m-calpain activity significantly decreased, from 71% in 3 months extracts to 48% in 24 months old muscle. Surprisingly, no apparent effect could be detected on μ -calpain activity between young and old muscle samples (Fig. 6b).

Although a discrepancy of calpastatin activity behaviour between both ubiquitous calpains was noticed, the present results confirmed a global tendency of calcium-dependent activity to increase with muscle aging.

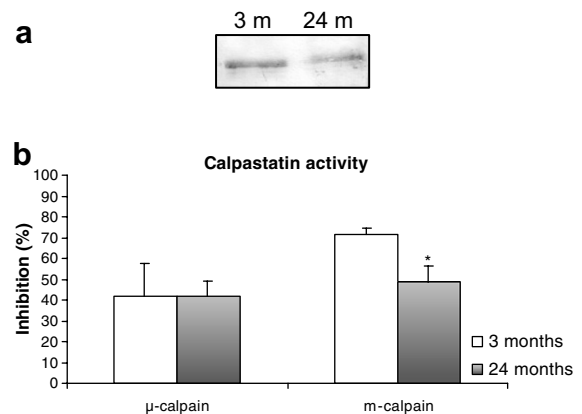


Fig. 6. Quantification of calpastatin activity in young and old rat muscle. Calpastatin activity was quantified as described in Section 2. Calpastatin level was controlled by Western blot in the heated samples (a). Specific activity levels are expressed as a percentage of calpain activity inhibition. Data shown are the means \pm S.D. for at least 3 separate experiments (b). *Significantly different ($P < 0.01$).

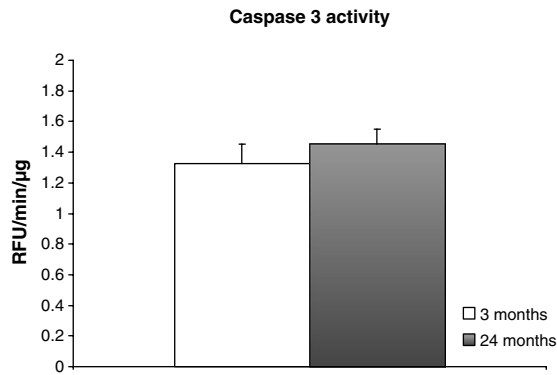


Fig. 7. Quantification of caspase 3 activity in young and old rat muscle. Caspase 3 activity was quantified as described in Section 2. Specific activity levels are expressed as arbitrary units from the fluorescence of Ac-DEVD-AMC and values are the means \pm SD for at least 3 separate experiments.

3.6. Muscle aging and caspase-3 activity

Given the numerous cross-talks between calpains and caspases in the regulation of cell death (Harwood et al., 2005; Pineiro et al., 2007), we decided to study the behaviour of caspase-3 activity during muscle aging. In this experiment, cytosolic proteins were extracted from young and old muscles and incubated for one hour with a fluorogenic substrate (Ac-DEVD-AMC) in the presence or absence of the specific inhibitor (Ac-DMQD-CHO). As indicated in Fig. 7, no significant difference could be detected between 3 months and 24 months muscle extracts. The same result was obtained with various incubation times (data not shown).

It thus appears that caspase-3 activation is not associated with the increased calcium-dependent proteolysis observed in old rat muscle.

4. Discussion

All data reported here unambiguously showed a global increase of the calcium-dependent proteolytic activity during muscle aging. Western blot analysis and mRNA level quantification indicated an up-regulation of μ -calpain expression (Fig. 2). This result corroborated studies realised in cardiac and skeletal muscles where calpain expression was shown to be up-regulated in the course of aging (Dardevet et al., 1995; Johnson and Hammer, 1993). Surprisingly m-calpain mRNA and protein levels remained unchanged between young and old muscle in our conditions. Concerning the endogenous inhibitor, we found a 28% decrease of its protein level in old muscle compared to young. A decline of calpastatin amount associated with aging has already been observed by others in mice kidney, or human erythrocytes (Manya et al., 2002; Schwarz-Benmeir et al., 1994). This drop in intracellular calpastatin rate could be put together with the loss of muscle mass occurring during sarcopenia. Indeed, overexpression of a cal-

pastatin transgene has been shown to trigger an increase in the number of muscle fibres and prevent atrophy after unloading (Tidball and Spencer, 2002).

An up or down-regulation of enzyme expression level does not necessarily reflect a modification of intracellular activity. It has been shown for instance that calpain mediated proteolysis could be modulated simply by translocation of the proteases to the membranes (Molinari et al., 1994). In that context we compared the enzymes subcellular localisation in young and old muscle. First, only a small proportion of calpains was localised in the particulate fraction, while calpastatin was exclusively found in the cytosol (Fig. 1). This result confirmed the possible relocation of the proteases away from the inhibitor and in the vicinity of their specific substrates upon activation (Gil-Parrado et al., 2003). However, we were unable to show any change in calpain and calpastatin distribution with muscle aging. Further experiments will be done using immunohistochemistry techniques to analyse more closely this aspect.

Altogether these data pointed to an imbalance of the calpastatin/calpains ratio in favour of an increased proteolysis in muscle during aging. Our activity assays confirmed this statement. First, the overall calpain activity was found to be significantly higher in 24 months old muscle than in 3 months old (Fig. 3). Similar increases of calpain activity have been previously associated with aging (Nixon, 2003). Looking more closely at each individual activity (μ - or m-calpain) we found that both enzymes were significantly more active in old specimen than in young ones (Fig. 4). This result corroborated the Western blot data for μ -calpain. However, m-calpain specific activity was found to be higher in 24 months old muscle, even though its expression was identical in 3 and 24 months old muscle. The lack of correlation between calpain expression level and activity has been widely noticed and just confirmed the role of calpain activity regulators (Averna et al., 2007). In the present case, m-calpain activity could be up-regulated by phosphorylation through the ERK/MAPK pathway (Glading et al., 2004).

Calpain dependent proteolysis in vivo results from the balance between the activities of the proteases and their inhibitor. We showed a significant decrease of calpastatin mediated inhibition of m-calpain with aging (Fig. 6). This result probably reflected the lower amount of inhibitor we found in old muscle extracts compared to young ones. Similar behaviour of calpastatin activity during aging has been reported earlier (Schwarz-Benmeir et al., 1994). On the contrary, the lack of effect observed on μ -calpain activity was unexpected. This age-related discrepancy between calpastatin behaviour on the two ubiquitous enzymes could be explained by the existence of a differential regulation by distinct phosphorylated forms of the inhibitor like postulated in the past (Salamino et al., 1994). Moreover it is important to highlight that in our study, we tested calpastatin activity on each purified enzyme (μ - and m-calpain), while most of the reports have been done using one single calpain isoform (Averna et al., 2007; Schwarz-Benmeir et al., 1994).

If we focus on m-calpain only, the amount of protease did not change with aging, but its higher activity in old muscle together with a decrease of calpastatin level and inhibition indicated an overall increase of m-calpain activity in 24 months old rat muscles. Similarly, we could show that μ -calpain level and activity were higher in old muscle. This result combined with a decrease of the inhibitor resulted in a significant rise in the isoform's activity with aging. In conclusion, calpain-dependent proteolysis was up-regulated in the course of muscle aging.

Since the above-mentioned results were obtained from *in vitro* activity assays, we needed to confirm them *in vivo*. Alpha-fodrin, together with β -spectrin, is a major component of the membrane associated cytoskeleton of muscle fibres (Zhou et al., 1998). Full length protein (240 kDa) has been shown to be specifically cleaved by calpains into a 150 kDa breakdown product. This characteristic has been recently used as an indicator of calpain activity in muscle (Razeghi et al., 2007; Rice and Blough, 2006; Takamura et al., 2005; Xiao et al., 2003). In our Western blot experiments, we showed a significant decrease of native α -fodrin in 24 months old muscle together with an increase of the 150 kDa degradation product (Fig. 5). This result confirmed *in vivo* the up-regulation of calpain activity with muscle aging.

In conclusion, in the present study, we clearly showed an involvement of the calcium-dependent proteolytic system in sarcopenia. The enhanced activity we observed could be explained by an increase of the resting cytosolic calcium levels in skeletal muscle of aged animals (Frayse et al., 2006). However sarcopenia is a multifactorial disorder and other deregulations have been described in aged muscle. Reactive oxygen species (ROS) accumulation is one probable factor responsible for muscle loss during aging (Fulle et al., 2004). Sarcopenia has also been associated with apoptosis (Marzetti and Leeuwenburgh, 2006). Interestingly, apoptosis is tightly linked to ROS accumulation and calcium homeostasis in mitochondria and could involve calpain activity (Fulle et al., 2005; Dirks et al., 2006). We did not find any significant change in caspase3 activity between 3 and 24 months old extracts (Fig. 7). Similar observations have already been reported by others (Leeuwenburgh et al., 2005). Altogether, these data strongly suggest that, during sarcopenia, calpains could induce apoptosis by a caspase3 independent mechanism. Further experiments are currently being done in our laboratory to identify what calpain regulated pathways could be affected during muscle aging.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the region Aquitaine and from INRA (Institut National de la Recherche Agronomique). The authors acknowledge C. Merlet, A. Trimoulet and P. Lochet for technical assistance.

References

- Aragon, B., Poussard, S., Dulong, S., Touyart, K., Dargelos, E., Brustis, J.J., Leveux, D., Ducastaing, A., Cottin, P., 2002. Protein kinase C alpha is a calpain target in cultured embryonic muscle cells. *Mol. Cell. Biochem.* 231, 97–106.
- Attaix, D., Mosoni, L., Dardevet, D., Combaret, L., Patureau Mirand, P., Grizard, J., 2005. Altered responses in skeletal muscle protein turnover during aging in anabolic and catabolic periods. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 1962–1973.
- Averna, M., Stifanese, R., De Tullio, R., Passalacqua, M., Defranchi, E., Salamino, F., Melloni, E., Pontremoli, S., 2007. Regulation of calpain activity in rat brain with altered Ca^{2+} homeostasis. *J. Biol. Chem.* 282, 2656–2665.
- Baumgartner, R.N., Koehler, K.M., Gallagher, D., Romer, L., Heymsfield, S.B., Ross, R.R., Garry, P.J., Lindeman, R.D., 1998. Epidemiology of sarcopenia among the elderly in New Mexico. *Am. J. Epidemiol.* 147, 755–763.
- Biswas, S., Harris, F., Singh, J., Phoenix, D., 2004. The *in vitro* retardation of porcine cataractogenesis by the calpain inhibitor, SJA6017. *Mol. Cell. Biochem.* 261, 169–173.
- Cai, D., Lee, K.K., Li, M., Tang, M.K., Chan, K.M., 2004. Ubiquitin expression is up-regulated in human and rat skeletal muscles during aging. *Arch. Biochem. Biophys.* 425, 42–50.
- Carmeli, E., Reznick, A.Z., 1994. The physiology and biochemistry of skeletal muscle atrophy as a function of age. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 206, 103–113.
- Cottin, P., Brustis, J.J., Poussard, S., Elamrani, N., Broncard, S., Ducastaing, A., 1994. Ca^{2+} -dependent proteinases (calpains) and muscle cell differentiation. *Biochim. Biophys. Acta* 1223, 170–178.
- Cottin, P., Poussard, S., Dargelos, E., Balcerzak, D., Aragon, B., Brustis, J.J., Ducastaing, A., 2000. Calpains and myogenesis. *Methods Mol. Biol.* 144, 173–180.
- Cottin, P., Thompson, V.F., Sathe, S.K., Szpacenko, A., Goll, D.E., 2001. Autolysis of μ - and m-calpain from bovine skeletal muscle. *Biol. Chem.* 382, 767–776.
- Dardevet, D., Sornet, C., Taillandier, D., Savary, I., Attaix, D., Grizard, J., 1995. Sensitivity and protein turnover in skeletal muscle from adult and old rats. Lack of regulation of the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway in aging. *J. Clin. Invest.* 96, 2113–2119.
- Dedieu, S., Poussard, S., Mazeres, G., Grise, F., Dargelos, E., Cottin, P., Brustis, J.J., 2004. Myoblast migration is regulated by calpain through its involvement in cell attachment and cytoskeletal organisation. *Exp. Cell Res.* 292, 187–200.
- Del Bello, B., Moretti, D., Gamberucci, A., Maellaro, E., 2006. Cross-talk between calpain and caspase-3/-7 in cisplatin-induced apoptosis of melanoma cells: a major role of calpain inhibition in cell death protection and p53 status. *Oncogene* 26, 2717–2726.
- Delbono, O., 2002. Molecular mechanisms and therapeutics of the deficit in specific force in aging skeletal muscle. *Biogerontology* 3, 265–270.
- Dirks, A.J., Leeuwenburgh, C., 2004. Aging and longlife caloric restriction result in adaptations of skeletal muscle apoptosis repressor, apoptosis inducing factor, X-linked inhibitor of apoptosis, caspase-3, and caspase-12. *Free Radic. Biol. Med.* 36, 27–39.
- Dirks, A.J., Leeuwenburgh, C., 2005. The role of apoptosis in age-related skeletal muscle atrophy. *Sports Med.* 35, 473–483.
- Dirks, A.J., Hofer, T., Marzetti, E., Pahor, M., Leeuwenburgh, C., 2006. Mitochondrial DNA mutations, energy metabolism and apoptosis in aging muscle. *Ageing Res. Rev.* 5, 179–195.
- Dulong, S., Goudenege, S., Vuiller-Devillers, K., Manenti, S., Poussard, S., Cottin, P., 2004. Myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) is involved in myoblast fusion through its regulation by protein kinase C alpha and calpain proteolytic cleavage. *Biochem. J.* 382, 1015–1023.
- Evans, W.J., 2004. Protein nutrition, exercise and aging. *J. Am. Coll. Nutr.* 23, 601S–609S.

- Frayssé, B., Desaphy, J.F., Rolland, J.F., Pierno, S., Liantonio, A., Giannuzzi, V., Camerino, C., Didonna, M.P., Cocchi, D., De Luca, A., Conte Camerino, D., 2006. Fiber type-related changes in rat skeletal muscle calcium homeostasis during aging and restoration by growth hormone. *Neurobiol. Dis.* 21, 372–380.
- Fulle, S., Protasi, F., Di Tano, G., Pietrangelo, T., Beltramin, A., Boncompagni, S., Vechhiet, L., Fano, G., 2004. The contribution of reactive oxygen species to sarcopenia and muscle ageing. *Exp. Gerontol.* 39, 17–24.
- Fulle, S., Di Donna, S., Puglielli, C., Pietrangelo, T., Beccafico, S., Bellomo, R., Protasi, F., Fano, G., 2005. Age-dependent imbalance of the antioxidative system in human satellite cells. *Exp. Gerontol.* 40, 189–197.
- Gil-Parrado, S., Popp, O., Knoch, T.A., Zahler, S., Bestvater, F., Felgentrager, M., Holloschi, A., Fernandez-Montalvan, A., Auerswald, E.A., Fritz, H., Fuentes-Prior, P., Machleidt, W., Spiess, E., 2003. Subcellular localization and in vivo subunit interactions of ubiquitous mu-calpain. *J. Biol. Chem.* 278, 16336–16346.
- Glading, A., Bodnar, R.J., Reynolds, I.J., Shihara, H., Satish, L., Potter, D.A., Blair, H.C., Wells, A., 2004. Epidermal growth factor activates m-calpain (calpain II), at least in part, by extracellular signal-mediated phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 24, 2499–2512.
- Goll, D.E., Thompson, V.F., Li, H., Wei, W., Cong, J., 2003. The calpain system. *Physiol. Rev.* 83, 731–801.
- Griffiths, R.D., Newsholme, E.A., Young, A., 2000. Muscle as a dynamic metabolic store. In: Evans, J.G., Williams, T.F., Beattie, B.L., Michel, J.P., Wilcock, C.K. (Eds.), *Oxford Textbook of Geriatric Medicine*, 2nd ed. Oxford University Press, Oxford, pp. 972–979.
- Harwood, S.M., Yaqoob, M.M., Allen, D.A., 2005. Caspase and calpain function in cell death: bridging the gap between apoptosis and necrosis. *Ann. Clin. Biochem.* 42, 415–431.
- Hugues, V.A., Frontera, W.R., Roubenoff, R., Evans, W.J., Singh, M.A., 2002. Longitudinal changes in body composition in older men and women: role of body weight change and physical activity. *Am. J. Clin. Nutr.* 76, 473–481.
- Husom, A.D., Peters, E.A., Kolling, E.A., Fugere, N.A., Thompson, L.V., Ferringdon, D.A., 2004. Altered proteasome function and subunit composition in aged muscle. *Arch. Biochem. Biophys.* 421, 67–76.
- Janicke, R.U., Ng, P., Sprengart, M.L., Porter, A.G., 1998. Caspase-3 is required for alpha-fodrin cleavage but dispensable for cleavage of other death substrates in apoptosis. *J. Biol. Chem.* 273, 15540–15545.
- Johnson, P., Hammer, J.L., 1993. Cardiac and skeletal muscle enzyme levels in hypertensive and aging rats. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 104, 63–67.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lamberts, S.W., van den Beld, A.W., van der Lely, A.J., 1997. The endocrinology of aging. *Science* 278, 419–424.
- Lebart, M.C., Benyamin, Y., 2006. Calpain involvement in the remodeling of cytoskeletal anchorage complexes. *FEBS J.* 273, 3415–3426.
- Leloup, L., Mazerès, G., Daury, L., Cottin, P., Brustis, J.J., 2006. Involvement of calpains in growth factor-mediated migration. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38, 2049–2063.
- Manya, H., Inomata, M., Fujimori, T., Dohmae, N., Sato, Y., Takio, K., Nabeshima, Y., Endo, T., 2002. Klotho protein deficiency leads to overactivation of mu-calpain. *J. Biol. Chem.* 277, 35503–35508.
- Marzetti, E., Leeuwenburgh, C., 2006. Skeletal muscle apoptosis, sarcopenia and frailty at old age. *Exp. Gerontol.* 41, 1234–1238.
- Mazerès, G., Leloup, L., Daury, L., Cottin, P., Brustis, J.J., 2006. Myoblast attachment and spreading are regulated by different patterns of ubiquitous calpains. *Cell Motil. Cytoskeleton* 63, 193–207.
- Molinari, M., Anagli, J., Carafoli, E., 1994. Ca²⁺ activated neutral protease is activated in the erythrocyte membrane in its non autolyzed 80 kDa form. *J. Biol. Chem.* 269, 27992–27995.
- Morley, J.E., Baumgartner, R.N., 2004. Cytokine-related aging process. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 59, M924–M929.
- Nixon, R.A., 2003. The calpains in aging and aging-related diseases. *Ageing Res. Rev.* 2, 407–418.
- Ouanounou, A., Zhang, L., Charlton, M.P., Carlen, P.L., 1999. Differential modulation of synaptic transmission by calcium chelators in young and aged hippocampal CA1 neurons: evidence for altered calcium homeostasis in aging. *J. Neurosci.* 19, 906–915.
- Pineiro, D., Martin, M.E., Guerra, N., Salinas, M., Gonzalez, V.M., 2007. Calpain inhibition stimulates caspase-dependent apoptosis induced by taxol in NIH3T3. *Exp. Cell Res.* 313, 369–379.
- Raynaud, F., Marcilhac, A., 2006. Implication of calpain in neuronal apoptosis. A possible regulation of Alzheimer's disease. *FEBS J.* 273, 3437–3443.
- 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.
- Razeghi, P., Volpini, K.C., Wang, M., Youker, K.A., Stepkowski, S., Taegtmeier, H., 2007. Mechanical unloading of the heart activates the calpain system. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 42, 49–452.
- Rice, K.M., Blough, E.R., 2006. Sarcopenia-related apoptosis is regulated differently in fast- and slow-twitch muscles of the aging F344/N x BN rat model. *Mech. Ageing Dev.* 127, 670–679.
- Richard, I., Broux, O., Allamand, V., Fougère, F., Chianilkulchai, N., Bourg, N., Brenguier, L., Devaud, C., Pastureau, P., Roudaut, C., Hillaire, D., Passos-Bueno, M.R., Zatz, M., Tischfield, J.A., Fardeau, M., Jackson, C.E., Cohen, C., Beckmann, J.S., 1995. Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Cell* 81, 27–40.
- Romero, P.J., Salas, V., Hernandez, C., 2002. Calcium pump phosphoenzyme from young and old human red cells. *Cell Biol. Int.* 26, 945–949.
- Saido, T.C., Nagao, S., Shiramine, M., Tsukaguchi, M., Sorimachi, H., Murofushi, H., Tsuchiya, T., Ito, H., Suzuki, K., et al., 1992. Autolytic transformation of mu-calpain upon activation as resolved by antibodies distinguishing between the pre- and post-autolysis forms. *J. Biochem.* 111, 81–86.
- Salamino, F., De Tullio, R., Mengotti, P., Melloni, E., Pontremoli, S., 1994. Differential regulation of mu- and m-calpain in rat hearts perfused with Ca²⁺ and cAMP. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 202, 1197–1203.
- Schwarz-Benmeir, N., Glaser, T., Barnoy, S., Kosower, N.S., 1994. Calpastatin in erythrocytes of young and old individuals. *Biochem. J.* 304, 365–370.
- Sloane, J.A., Hinman, J.D., Lubonia, M., Hollander, W., Abraham, C.R., 2003. Age-dependant myelin degeneration and proteolysis of oligodendrocyte proteins is associated with the activation of calpain-1 in the rhesus monkey. *J. Neurochem.* 84, 157–168.
- Suzuki, K., Sorimachi, H., 1998. A novel aspect of calpain activation. *FEBS Lett.* 433, 1–4.
- Szulc, P., Beck, T.J., Marchand, F., Delmas, P.D., 2005. Low skeletal muscle mass is associated with poor structural parameters of bone and impaired balance in elderly men—the MINOS study. *J. Bone Miner. Res.* 20, 721–729.
- Takamura, M., Murata, K.Y., Tamada, Y., Azuma, M., Ueno, S., 2005. Calpain-dependent alpha-fodrin cleavage at the sarcolemma in muscle disease. *Muscle Nerve* 32, 303–309.
- Tan, Y., Dourdin, N., Wu, C., De Veyra, T., Elce, J.S., Greer, P.A., 2006. Ubiquitous calpains promote caspase-12 and JNK activation during endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 281, 16016–16024.
- Tidball, J.G., Spencer, M.J., 2000. Calpains and muscular dystrophies. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 32, 1–5.
- Tidball, J.G., Spencer, M.J., 2002. Expression of a calpastatin transgene slows muscle wasting and obviates changes in myosin isoform expression during murine muscle disuse. *J. Physiol.* 545, 819–828.
- Visser, M., Pahor, M., Taaffe, D.R., Goodpaster, B.H., Simonsick, E.M., Newman, A.B., Nevitt, M., Harris, T.B., 2002. Relationship of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha with muscle mass and muscle strength in elderly men and women: the Health ABC Study. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 57, M326–M332.
- Wolfe, F.H., Sathe, S.K., Goll, D.E., Kleese, W.C., Edmunds, T., Duperret, S.M., 1989. Chicken skeletal muscle has three Ca²⁺ dependent proteinases. *Biochim. Biophys. Acta* 998, 236–250.

- Xiao, Y.Y., Wang, M.C., Purintrapiban, J., Forsberg, N.E., 2003. Roles of μ -calpain in cultured L8 muscle cells: application of a skeletal muscle-specific gene expression system. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 134, 439–450.
- Yarasheski, K.E., 2003. Exercise, aging and muscle protein metabolism. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 58, M918–M922.
- Zhou, D., Ursitti, J.A., Bloch, R.J., 1998. Developmental expression of spectrins in rat skeletal muscle. *Mol. Biol. Cell* 9, 47–61.

Article 2: Proteomic study of calpain-dependent pathways during muscle aging.

Cédric Brulé¹, Elise Dargelos¹, Ramata Diallo, Anne Listra, Patrick Cottin, Sylvie Poussard.

Experimental Gerontology, soumis

¹ les auteurs ont participé à part égale dans ce travail

Dans la continuité de l'étude précédente, il nous a paru intéressant de mener une étude protéomique afin d'identifier des protéines clés (régulatrices ou substrats) susceptibles d'interagir avec les calpaïnes au cours du vieillissement musculaire et ainsi de préciser leur mécanisme d'action des protéases dans un tel contexte. Pour cela, nous avons étudié un muscle particulier de patte arrière de rat, qui est un des muscles modèles dans l'étude de la sarcopénie : le muscle gastrocnémien. Des rats jeunes, adultes et âgés (3, 10 et 24 mois) ont été utilisés.

D'un point de vue méthodologique, nous avons couplé des immunoprécipitations de la μ - et de la m-calpaïne à une analyse protéomique suivie d'une identification des protéines co-immunoprécipitées par nanoLC-MS/MS. Des expériences de co-localisation par microscopie confocale complètent cette investigation et valident la réalité physiologique des interactions caractérisées précédemment. Enfin, des expériences de protéolyse calpaïno-dépendante *in vitro* ont été menées afin de vérifier si les protéines partenaires identifiées sont des substrats des calpaïnes.

Résultats principaux :

Dans un premier temps, nous avons étudié les différents critères permettant de valider le modèle de vieillissement. L'étude phénotypique des gastrocnémiens des différents rats Wistar a été réalisée. Le ratio poids gastrocnémien / poids total, révélateur de la perte musculaire caractéristique de la sarcopénie (Chabi *et al.*, 2008), diminue jusqu'à 27% pour les rats vieux. Une étude TUNEL a montré que le rapport nombre de noyaux apoptotiques / nombre de noyaux totaux augmente d'un facteur 24 pour les rats de 24 mois ; indiquant clairement une augmentation significative de l'apoptose avec l'âge. Enfin, le dosage de la

concentration en groupements carbonyles, révélant l'existence d'un stress oxydant, montre une augmentation de l'oxydation des protéines d'un facteur quatre dans le muscle de rats âgés.

Quinze partenaires putatifs des calpaïnes ont été identifiés après immunoprécipitation et spectrométrie de masse. Nous remarquons que ces derniers jouent tous un rôle dans des fonctions musculaires altérées au cours de la sarcopénie et notamment:

- _ Régulation de l'homéostasie calcique
- _ Maintien de l'intégrité musculaire et contraction
- _ Métabolisme mitochondrial
- _ Régénération musculaire

Dans la suite de ce travail, cinq protéines d'intérêt ont été choisies de part leur rôle important dans la physiologie musculaire:

- _ l' α -actinine 3 : protéine cytosquelettique impliquée dans l'assemblage du sarcomère.
- _ le récepteur à la ryanodyne 1 : responsable du relargage du calcium dans le sarcoplasme.
- _ Serca 1 : une calcium ATPase du réticulum sarcoplasmique.
- _ la glyceraldéhyde 3 phosphate déhydrogénase (GAPDH) : enzyme glycolytique généralement dérégulée lors d'un stress oxydant.
- _ la sous unité α de l'ATP synthase : composant essentiel du complexe V de la chaîne respiratoire.

Des expériences de co-immunoprécipitation inverse et de microscopie confocale nous ont permis de valider les interactions entre ces protéines et les calpaïnes.

L'évolution de l'interaction entre les calpaïnes et ces différentes protéines partenaires a été quantifiée en fonction de l'âge. Il est à noter que seul le profil de l' α -actinine 3 et de la sous unité α de l'ATP synthase varie au cours du vieillissement, et ce uniquement avec la m-calpaïne. L'interaction entre l' α -actinine 3 et la m-calpaïne diminue dans les muscles de rats âgés alors que celle entre la sous unité α de l'ATP synthase et la m-calpaïne augmente par rapport aux rats adultes. Les autres interactions montrent une certaine tendance à l'augmentation (Ryr1 / m-calpaïne) ou à la diminution (Ryr 1, α -actinine 3 / μ -calpaïne) au cours du vieillissement ; cette tendance étant initiée dès l'âge adulte.

Afin de mieux définir le type d'interaction entre les deux calpaïnes ubiquitaires et ces protéines, des tests de digestion *in vitro* ont été réalisés en présence ou non d'inhibiteur des

calpaïnes. Dans ces conditions, Ryr 1, α -actinine 3 et la sous unité α de l'ATP synthase apparaissent comme des substrats *in vitro* des calpaïnes ubiquitaires contrairement à la GAPDH.

Ces résultats mettent en évidence des rôles différents pour la μ - et la m-calpaïne au cours du vieillissement musculaire et suggèrent une successibilité différente de Ryr1, α -actinine 3 et la sous unité α de l'ATP synthase à une protéolyse par les calpaïnes dans le muscle âgé.

Les données obtenues durant cette étude nous ont permis de définir des protéines partenaires substrats des calpaïnes et qui seraient dérégulées par ces dernières au cours du vieillissement musculaire. Ces résultats démontrent une possible implication des calpaïnes dans la dérégulation du cytosquelette au niveau du sarcomère, l'homéostasie calcique pouvant être liée à une perte de force musculaire et dans des dysfonctions mitochondriales associées à une perte énergétique caractéristique de la sarcopénie.

Proteomic study of calpain-dependent pathways during skeletal muscle aging.

Brulé C.^{a1}, Dargelos E.^{a1}, Diallo R.^a, Listrat A.^b, Cottin P.^a, Poussard S.^{a*}.

^a Université Bordeaux I, INRA USC 2009, Unité Protéolyse Croissance et Développement Musculaire, Avenue des Facultés, 33405 Talence Cedex, France

^b Unité de Nutrition Humaine, UMR1019, Institut National de la Recherche Agronomique, Saint Genes Champanelle, France.

* Corresponding author

sylvie.poussard@u-bordeaux1.fr

Phone number: + 33 5 40 00 87 57

Fax number: + 33 5 40 00 84 96

¹ Contributed equally to this work

Running title: Calpains and skeletal muscle aging

Key words: Aging, Skeletal muscle, Calpains, Ryanodine receptor, Alpha actinin, ATP synthase

Abstract

Aging is associated with a progressive and involuntary loss of muscle mass also known as sarcopenia. This condition represents a major public health concern. Although sarcopenia is well documented, the molecular mechanisms of this condition still remain unclear. The calcium-dependent proteolytic system is composed of calcium dependent cysteine-proteases named calpains. Calpains are involved in a large number of physiological processes such as muscle growth and differentiation, and pathological conditions such as muscular dystrophies. The aim of this study was to determine the involvement of this proteolytic system in the phenotype associated with sarcopenia by identifying key proteins (substrates or regulators) interacting with calpains during muscle aging.

Immunoprecipitations coupled with proteomic analyses and protein identification by nanoLC-MS/MS have been undertaken. Reverse co-immunoprecipitation, cellular co-localisation by confocal microscopy and calpain-dependent in vitro proteolysis of several of the identified proteins have been also carried out. We identify ATP synthase subunit alpha and alpha actinin 3 as key partners of calpains during muscle aging. Such interactions would suggest that calpains are implicated in many process altered during aging including cytoskeletal disorganisation and mitochondrial dysfunction.

Introduction

Aging is associated with a progressive and involuntary loss of muscle mass also known as sarcopenia. This condition is characterised by impaired muscle strength and function that affects 25% of people under the age of 70 years and 40% of those aged 80 years or more (Baumgartner et al., 1998). Sarcopenia has been reported even among healthy, physically active subjects and is becoming one of the major public health problems of our aging population. Sarcopenia affects all elderly and does not discriminate based on ethnicity, gender, or wealth. It can deprive people of their functional independence, and increase their risk for sudden falls and fractures (Szulc et al. 2005). As the proportion of older people in the population increases, sarcopenia will impact dramatically on quality of life and place ever-increasing demands on public health care (see Lynch 2004 for review).

Sarcopenia is characterised by not only the loss of skeletal muscle mass, but also the gradual decline in muscle function, including a decrease in force producing capacity, maximum velocity of shortening, and a general slowing of contraction and relaxation. Intimately linked to the decrease in muscle mass is a metabolic dysregulation, which includes a reduction in insulin sensitivity, impaired oxidative defence, and decreased mitochondrial function (Giresi et al., 2005; Dela and Kjaer 2006).

During aging, the loss of muscle mass and strength is hypothesised to be due to the progressive atrophy (decrease in myofibre cross-sectional area) and loss of muscle fibres (Brooks and Faulkner 1994; McNeil et al. 2005), and a reduction in muscle 'quality' due to the infiltration of fat and other non-contractile material (Conley et al. 1995; Cree et al. 2004). These changes are attributed to a complex interaction of many factors that affect neuromuscular transmission, muscle architecture, fibre composition, excitation–contraction

(E–C) coupling, and muscle metabolism (Larsson et al. 1979; Edstrom and Larsson 1987).

The reduction in the number of fibres during muscle aging could be partly due to apoptosis (Dirks and Leeuwenburgh, 2005). If caspase-dependent pathways have been well characterised in apoptotic processes, calpains could also play a role in cell death associated with sarcopenia (Dirks and Leeuwenburgh, 2004). According to some authors an imbalance between the rates of protein synthesis and proteolysis could also account for the loss of muscle mass (Attaix et al., 2005; Yarasheski, 2003).

Calpains are members of a large family of calcium dependent cysteine proteases. The mammalian calpain family consists of 14 different, tissue-specific or ubiquitous, typical or atypical (with or without EF-Hand) enzymes (Goll et al., 2003). Micro-calpain and m-calpain, two typical, ubiquitous isoforms, are heterodimeric enzymes consisting of a distinct large catalytic subunit (80 kDa, CAPN1 or CAPN2, encoded by *capn1* and *capn2* genes, respectively) and a small regulatory subunit, *css1* (formerly CAPN4, 30 kDa) (Schad et al., 2002). Calpain activity is regulated by calpastatin, its specific endogenous inhibitor, calcium, and autoproteolytic cleavage, but also by a variety of factors, such as phospholipids and phosphorylations (Alderton & Steinhardt, 2000; Averna et al., 2003; Barnoy et al., 2000; Li et al., 2004; Suzuki et al., 1992). Calpains are thought to be involved in many pathological events, such as muscular dystrophies, cataract formation, diabetes, rheumatoid arthritis, neurodegenerative diseases, ischemia, and psoriasis (Biswas et al., 2004; Cox et al., 2004; Matsushita et al., 2005; Menard & El-Amine, 1996; Nixon, 2003; Perrin et al., 2004; Richard et al., 2000), as well as various biological and physiological phenomena. For example, calpains are involved in signal transduction, apoptosis, cell-cycle regulation, cell spreading, adhesion, motility, invasion, and myogenesis (Atencio et al., 2000; Dedieu et al., 2004; Franco et al., 2004; Glading et al., 2001; Mamoune et al., 2003; Mazères et al., 2006). Calpains play a critical role in myogenesis and, specifically in the early stages, i.e. myoblast

migration and fusion. Calpain activity increases significantly during fusion and the calpain-specific inhibitor, calpastatin, inhibits myoblasts migration and fusion (Barnoy et al., 2005; Dedieu et al., 2004).

Calcium homeostasis is frequently altered during aging, which could explain why unregulated calpain activities are often associated with degenerative diseases. An increase in calpain activity has been reported, as well as an elevation of the calcium influx in several aging tissues (Manya et al., 2002; Ouanounou et al., 1999; Romero et al., 2002). The most striking example being Alzheimer's disease where increased calpain activity has been correlated with impaired calcium homeostasis (Nixon, 2003). Calcium plays a critical role in muscle function. Several recent studies have shown that an impaired calcium homeostasis could be involved in the loss of muscle mass that occurs during aging (Delbono, 2002; Fraysse et al., 2006). Among other deleterious effects, high calcium levels could trigger apoptosis via calpain activation and a subsequent caspase 12-mediated pathway (Tan et al., 2006). Still, little information is available today concerning the link between calpains and sarcopenia. However, we have shown an increase in the activity of the calcium dependent proteolytic system during aging of rat skeletal muscle (Dargelos et al., 2007).

In the present study, we used a proteomics-based approach to explore calpain interacting proteins in rat gastrocnemius during aging. Mu- and m-calpain co-immunoprecipitated proteins were identified by mass spectrometry. The putative partners were further characterised by co-localisation experiments carried out on muscle cross sections and in vitro calpain-dependent proteolysis.

Materials and methods

1 Materials

NBT (nitrobluetetrazolium) and BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indoyl-1-phosphate) were purchased from Promega. Immobilon P membrane was obtained from Millipore. The BCA kit was purchased from Interchim. The protease inhibitor cocktail was obtained from Roche Diagnostics. The Dynal Beads protein G were obtained from Invitrogen. The m- and μ -calpain antibodies were raised in sheep as described by Cottin et al. (1994). Anti μ -calpain (for Western blot), anti α -actinin 3 and anti GAPDH were from Sigma Aldrich. Anti μ -calpain (for Immunohistochemistry) and anti Ryr 1 were from Millipore. Anti Serca 1 was from TEBU Santa Cruz biotechnology; anti Ryr 1 (for Western Blot) was from Abcam and anti ATP synthase subunit α was from Molecular Probes. All secondary antibodies were from Sigma. Molecular weight markers were obtained from Biorad.

2 Animals

The study was conducted in accordance with the European Communities Council Directives (861609/EEC). All of the experiments conformed to the Guidelines on the Handling and Training of Laboratory Animals. Male Wistar rats were maintained in a room with a constant airflow system, controlled temperature (21-23°C) and a 12 h light/dark cycle. The rats were allowed ad libitum access to food and tap water. They were divided into three groups (10 animals per group) designated as young, adult and old. Young rats were studied at 3 months of age, adult rats at 10 months and old rats at 24 months. The animals were killed by decapitation and all gastrocnemius from both back legs were rapidly removed, quick frozen in liquid nitrogen and store at -80°C. Frozen muscle was then carefully collected from each individual in the same group and pooled for further experiments.

3 Tunel analysis

Ten μm cross sections of gastrocnemius muscle were air dried and mounted on microscopic slides. Slides were immersed in a freshly prepared 4% paraformaldehyde solution in PBS pH=7.5 for fixation. After a 30 minutes wash in PBS, the slides were dried in absolute ethanol for 2 minutes. The permeabilisation was carried out by using a 0.1% triton X100, 0.1% sodium citrate solution during 2 minutes on ice. Following TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling (TUNEL) assay using a cell death detection kit (Roche), the cells were visualised directly by fluorescence microscopy using an epifluorescence microscope (Leica AF DMI6000).

4 Carbonyl protein

Protein carbonyls were determined by measuring the reactivity of carbonyl derivatives with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) (Levine et al. 1994). Total proteins were extracted using 50mM Tris-HCl, pH=7.5 with 100 μM DTPA. The homogenates were centrifuged at 1000g for 10 minutes at 4°C. Proteins from the resulting supernatant were recovered. Protein concentration was determined using a BCA protein assay reagent with BSA as standard.

Three mg of soluble proteins were precipitated with 1 ml of 20% TCA and incubated for 15 minutes on ice. The mix was centrifuged at 12000g 15 min 4°C and the pellet was incubated with 200 μl of 2M HCl (blank) or 200 μl of 10mM DNPH, 2M HCl (assay) one hour in the dark. Proteins were precipitated with 200 μL of 20% TCA, incubated 30 minutes on ice and centrifuged at 12000g for 15 minutes at 4°C. The pellet was washed with 1ml of ethanol/ethyl acetate (1/1) and centrifuged at 12000g during 15 minutes at 4°C. The pellet was diluted in phosphate buffer pH=8 containing 10 mM EDTA and 70 mM SDS.

The protein carbonyl content was determined by the absorbance at 370 nm with a UV spectrophotometer.

5 Electrophoresis and immunoblotting procedure

The samples were run on a 10% SDS-PAGE, as described by Laemmli (1970) and proteins were transferred onto Immobilon P membranes. The membranes were blocked at room temperature for 2h using TBS (50 mM Tris-HCl pH=8, 138 mM NaCl, 2.7 mM KCl) containing 5% skimmed milk. The membranes were incubated with the primary antibodies in TBS containing 1% skimmed milk for 2h at room temperature (the following antibody dilutions were used: 1/5000 for μ -calpain, 1/1000 for m-calpain, 1/500 for Serca 1, 1/10000 for GAPDH, 1/2500 for Ryr 1, 1/2000 for ATP synthase subunit α and 1/500 for α -actinin 3). The membranes were washed with TBS and incubated with the secondary antibodies (alkaline phosphatase conjugated antibodies, 1/10000) in TBS containing 1% skimmed milk for 1h at room temperature. After washing, the NBT/BCIP was used as detection substrate.

6 Immunoprecipitation

Proteins from rats of 3, 10 or 24 months of age were extracted from 300 mg of gastrocnemius muscle in 2 ml of 50mM Tris-HCl pH = 7.5, 1% NP40. After centrifugation at 1000g during 10 minutes at 4°C, proteins from the resulting supernatant were recovered. Protein concentration was determined using a BCA protein assay reagent with BSA as standard. μ - and m-calpain and interacting proteins were co-immunoprecipitated from equal quantities of proteins using antibodies covalently bound and cross-linked to magnetic beads, according to Dynal Biotech protocol. 250 μ l of antibodies was used (against μ - or m-calpain) or 10 μ g (against Ryr1, Alpha actinin 3, serca1, GAPDH or ATP synthase for 2.5 mg or 1 mg of total proteins respectively). Immunoprecipitated material was run on a 4-20% SDS-PAGE and stained with colloidal blue (G250 brilliant blue). In parallel, immunoprecipitated material was run on a 10% SDS-PAGE for Western blot application as described in 5.

7 Protein identification by mass spectrometry

The protein bands of interest were trypsin-digested as previously described (Goudenege et al., 2007). The peptide mixture was analysed by on-line capillary HPLC (LC Packings, Amsterdam, The Netherlands) coupled to a nanospray LTQ XL IT mass spectrometer (Thermo-Finnigan, San Jose, CA). The mass spectrometer operated in positive ion mode at a 1.8-kV needle voltage and a 49-V capillary voltage. Data were acquired in a data dependent mode alternating an MS scan survey over the range m/z 300–1700 and three MS/MS scans in an exclusion dynamic mode. MS/MS spectra were acquired using a 2 m/z units ion isolation window, a 35% relative collision energy, and a 0.5 min dynamic exclusion duration. Data were searched by SEQUEST through Bioworks 3.3 interface (Thermo-Finnigan) against a subset of the IPI database restricted to RAT species (39906 entries in version 3.52) (see <http://www.ebi.ac.uk/IPI/IPIrat.html>). DTA files were generated for MS/MS spectra that both reach a minimal intensity ($1.10e3$) and a sufficient number of ions. All protein identifications were based on a minimum of two peptides assignments. Shared peptides are only counted for the protein that has over all the most matching peptides. The choice has been made to select, when possible, the entries originating from the SwissProt database.

8 Immunohistochemistry

Ten μm frozen cross sections of gastrocnemius muscles from 3, 10 and 24 months old Wistar rats were used for immunohistochemistry. Cross sections were fixed 15 min with 4% PAF and permeabilised with 1% triton X-100 during 5 minutes at room temperature. Aspecificity was disrupted by 30 minutes incubation with PBS/BSA-3%. Then, the cross sections were incubated with primary antibodies diluted in PBS/BSA (1%) overnight at 4°C:

anti- μ -calpain (1:50), anti-m-calpain (1:50), anti-Ryr 1 (1:250), anti- α -actinin 3 (1:500) and anti-ATP synthase subunit α (1:500). The cross sections were then incubated with appropriate secondary alexa fluor antibody diluted in PBS/BSA-1% 1 hour at room temperature. Negative controls (not shown) were done without primary antibody. Co-immunolocalisations were performed on a confocal microscope (LEICA SPE). The results were analysed using metamorph software (Molecular device).

9 In vitro digestion by calpains

Frozen muscle (300 mg) was homogenised in 50mM Tris-buffer pH 7.5 with 1% NP 40. After a quick centrifugation step at 1000g during 5 minutes at 4°C, the supernatant (50 μ g of proteins) was incubated at different times with 5mM CaCl₂, 50 μ M Calpain inhibitor 3 or 50 μ M Calpeptin at 30°C. The reaction was stopped by addition of sample buffer (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.01% Bromophenol blue, 30% glycerol, 2% β -mercaptoethanol, 1% SDS). The samples were then analysed by Western blotting with antibody of interest as described in section 5.

Results

1 Muscle characteristics and apoptosis

Wistar rat gastrocnemius was characterised to verify that this muscle is a good model for sarcopenia. As expected, adult animals had a 27% greater body mass and senescent animals had a 48% greater body mass than their young counterparts (fig. 1A). In contrast, the muscle (gastrocnemius) to body mass ratio was reduced by 7% and 27% for adults and senescent animals respectively ($P < 0.05$; fig. 1A); reflecting the muscle loss characteristic of sarcopenia. Apoptotic cell death was measured by the TUNEL method (fig. 1B). While very few TUNEL-positive nuclei were observed in the cross sections of gastrocnemius muscle of

young ($0.34\% \pm 0.27$) and adult ($2.67\% \pm 0.4$) animals, the signal increased dramatically (by a factor of 24) in the senescent animals, reflecting increased apoptosis with age in Wistar rat muscle.

In the meantime, intracellular oxidative stress was evaluated by quantification of the carbonyl content, an indicator of protein oxidation. As shown in figure 1C, the amount of carbonyl groups increased significantly from 8 to 31 nmol/mg of protein for the 24 month old rats. It is interesting to note that in 10 month old rat muscle, the level of carbonyl groups did not significantly increase (8 to 12 nmol/mg).

2 Identification of putative calpain binding partners

Co-immunoprecipitates with calpains (μ - and m-) antibodies were performed on 3, 10 and 24 month old muscles and resolved by SDS-PAGE (fig.2). Most bands were specific for calpain immunoprecipitation, and were not detected with non immune antibodies.

Unfortunately, Coomassie Blue staining did not reveal major differences in the profiles as a function of age, or between μ and m-calpains immunoprecipitates. We focused on bands with the highest intensity, and after trypsin digestion of these bands, a range of putative calpains partners were identified by mass spectrometry. The identified proteins are listed in Table 1, including the corresponding band number, protein name, accession number in the Swiss-Prot database and percentage of coverage. This table shows four groups of proteins involved in muscle function:

- Proteins involved in calcium homeostasis: Ryr 1, Serca 1 and Calsequestrin 1,
- Cytoskeletal proteins: dysferlin which is implicated in regeneration,
- Proteins located in the sarcomere and involved in muscle contraction such as myosin, nebulin or alpha actinin,
- Mitochondrial proteins such as ATP synthase alpha subunit,

- Proteins involved in glucose metabolism e.g. glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

It is important to underline that calpains were also identified among these proteins. Some putative interactions were validated by calpain Western blotting after reverse immunoprecipitation (fig.3). Five proteins were studied because of their connections with muscle functionality : α -actinin 3 (a sarcomeric protein), ryanodine receptor 1 and sarcoplasmic/endoplasmic calcium ATPase 1 (serca1) which regulate calcium exchanges at the level of the sarcoplasmic reticulum; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and ATP synthase subunit α , a mitochondrial protein, part of complex V of the respiratory chain. For all five proteins, we verified co-immunoprecipitation of μ - and m-calpains.

3 In situ validation of the interactions between calpains, Ryr1, alpha actinin and ATPsynthase subunit alpha

To complete and corroborate these observations, confocal microscopy experiments were performed on gastrocnemius muscle cross sections of 3, 10 and 24 month old rats. In order to identify a potential colocalisation, double labelling of μ -calpain / Ryr1, m-calpain / Ryr1, ATP synthase or α -actinin 3 was performed. Data shown in figure 4 represents the 10 month old muscle (the same results obtained for 3 and 24 month old rats are not shown). Each protein tested colocalised with μ - or m-calpain (see the line scans in fig.4D). These colocalisations of calpains with their partners identified by co-immunoprecipitation (Table 1 and fig.3) argue for their real and physiological interactions in gastrocnemius muscle.

4 Evolution of calpain associated Ryr1, alpha actinin and ATP synthase subunit alpha during aging

To quantify the possible modifications of the calpain interactions with their identified partners as a function of age, we performed Western blotting after immunoprecipitation of μ - and m-calpain. The binding pattern of calpains with their partners is shown in figure 5. The serca1 and GAPDH profiles were identical in all conditions (data not shown). There is no significant difference in the amount of ATP synthase subunit α immunoprecipitated with μ -calpain throughout the different ages. However, co-immunoprecipitation with m-calpain increased by 75% in adults and by 243% in old animals ($P < 0.05$) indicating that the interaction between ATP synthase subunit α and m-calpain rises with age.

The profiles for α -actinin 3 co-immunoprecipitations with μ - and m-calpains are very similar. Indeed, α -actinin 3 level decreased by 55% in μ -calpain immunoprecipitates and by 45% in m-calpain immunoprecipitates in the 24 month old rats. This decrease is already detected in the adult rats after μ -calpain immunoprecipitation (- 70%).

In contrast, the Ryanodine receptor 1 interaction profiles with μ - and m-calpain are very different. In μ -calpain immunoprecipitates, Ryr 1 decreased by 49% in adults and by 55% in old rats (both are significantly different from young rats but not different from one another). In m-calpain immunoprecipitates, Ryr 1 level increased by 160% in adults and 210% in old animals compared to the young.

In summary, only α -actinin 3 (decrease) and ATP synthase (increase) interactions with m-calpain are modified in old rats compared to adult rats. For Ryr 1 there is a net tendency for a decrease of interaction as a function of age for μ -calpain and an increase for m-calpain, but they occur during growth (3 to 10 month period) and not during the aging period.

5 In vitro calpain digestion of Ryr1, alpha actinin 3 and ATP synthase subunit alpha

To test the possibility that the proteins we identified could be calpain substrates, we performed in vitro digestion kinetics in the presence of 5 mM calcium (5 to 60 minutes). As

controls, we used EGTA and calpeptin. Figures 6A and B show that GAPDH is not a calpain substrate. Ryanodine receptor 1 and ATP synthase subunit α were shown to decrease by 35% and 21 % respectively after 5 minutes incubation and reached minimum values (-85% and -43%) after 60 minutes. A complete digestion of α -actinin 3 is observed at all times tested. In order to clearly ascertain that the proteolysis was calpain-dependant, another control was carried out with calpain inhibitor 3 (data not shown).

The data shows that ryanodine receptor 1, α -actinin 3 and ATP synthase subunit α are calpain substrates in vitro and this would suggest a possible calpain regulation of these proteins during aging.

Discussion

Sarcopenia is a multifactorial process, involving inactivity, malnutrition, hormonal change and acute chronic inflammation (Szulc et al., 2005). From a cellular point of view, sarcopenia is characterised by three major modifications: ROS accumulation, reduction of cellular ATP content (Dirks et al. 2006) and deregulation of Ca^{2+} homeostasis (Weisleder and Ma., 2008). Altogether these modifications lead to lipid and protein oxidation, diminution of the contractile capacity of muscle and cell apoptosis. Moreover, precedent work from our laboratory showed an activation of calpains during aging of rat skeletal muscle (Dargelos et al., 2007). These data, together with known functions of calpains in calcium overload induced pathologies, led us to study calpain-dependent molecular mechanisms related to sarcopenia. We developed a proteomic strategy which offers the potential advantage to identify unexpected partners, and this is of considerable interest for defining new therapeutic targets in pathologies such as sarcopenia.

We compared young (3 months), adult (10 months) and old (24 months) Wistar rat muscles. The latter present a high degree of sarcopenia, as evidenced by a decrease in the gastrocnemius mass/Body mass ratio of 27%. As expected, gastrocnemius muscle of old

animals also displayed an increase in the protein carbonyl content by a factor of 4 and an increase in apoptotic nuclei by a factor of 24 (fig. 1). All these results clearly indicate major alterations in the aged gastrocnemius of Wistar rats.

Using co-immunoprecipitation studies and mass spectrometry-based methodology, fifteen major proteins potentially interacting with μ - and m-calpain in gastrocnemius muscle were identified (see figure 2 and table 1). Among these proteins, six are components of the sarcomere which is the basic contractile unit of myofibrils (reviewed in Clark et al., 2002): Actin alpha (skeletal muscle type isoform) composes the thin filament of the I-Z-I lines; nebuline connects I-line to Z-line; myosin (component of the A-line) is the molecular motor of muscle contraction thanks to its connection to actin by its head domain; myomesin (located in the M-line) plays a role in assembling the sarcomere; creatine kinase regenerates ATP in the M-line; α -actinin 3, located in the Z-line is an actin cross-linking protein and may be part of a nexus for the assembly of the Z-line complex.

It is important to underline that among these proteins, nebuline, myosin, α -actinin 3 have already been identified as calpain substrates (Goll et al., 2003).

Three identified proteins are located in the sarcoplasmic reticulum (SR) and are major regulators of Ca^{2+} homeostasis: the ryanodine receptor 1 releases Ca^{2+} in the sarcoplasm which is essential for the skeletal muscle contraction (Fill and Copello, 2002); calsequestrin is a Ca^{2+} buffering protein located in the SR lumen and plays a regulatory role in SR Ca^{2+} release by Ryr1 (Ikemoto et al., 1989) ; Serca1 (sarcoplasmic/endoplasmic calcium ATPase 1) is responsible for the sarcoplasmic Ca^{2+} uptake to continue Ca^{2+} cycling (Berchtold et al., 2000). Dysferlin, another identified calpain interacting protein, is implicated in active membrane repair in skeletal muscle and enables cells to survive routine mechanical stress (Bansal et al., 2003). It has been shown recently that the skeletal muscle specific calpain 3 interacts with the dysferlin complex (Huang et al., 2008). Regulation of dysferlin function by ubiquitous

calpains would suggest a role in regenerative events known to be altered in aging muscle (Carosio et al., 2009).

Two mitochondrial proteins co-immunoprecipitate with μ - and m-calpain: leucine rich PPR motif containing protein which is implicated in mRNA transport and regulation, and ATP synthase subunit α , a part of the complex V of the electron transport chain which has been already identified as a calpain substrate (Goudenege et al., 2007).

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is a classic glycolytic enzyme. For many decades, GAPDH has been regarded merely as a housekeeping enzyme that exists mainly in the cytoplasm. However recent studies have clarified a role for this molecule during cell death frequently associated with oxidative stress (Hara et al., 2006).

The identified calpain partners provide interesting perspectives in the involvement of these proteases during skeletal muscle aging. The present study focused on five proteins (α -actinin 3, Ryr1, Serca 1, ATP synthase subunit α and GAPDH), which play a major role in sarcomeric organisation, calcium homeostasis or mitochondrial functionality, all processes strongly related to sarcopenia. Reverse immunoprecipitations confirmed the interaction of these proteins with calpains (fig. 3). Moreover, the co-localisation evidenced by confocal microscopy of Ryr 1, ATP synthase and α -actinin 3 with calpains on gastrocnemius cross section (fig. 4) suggested a potential physiological relationship between calpains and these proteins. Such results are in accordance with previous studies which reported calpain interaction or localisation with mitochondria (Kar et al., 2008; Badugu et al., 2008) or sarcomeric component especially at the Z-line (Raynaud et al., 2005).

Taken together this data allows us to define without ambiguity new partners of calpains in rat gastrocnemius but we do not know the nature of these interactions and how they evolve during aging. To obtain additional information, calpains co-immunoprecipitation of these proteins coupled with quantitative western blotting analysis as a function of age and in vitro

calpain digestions were performed. These experiments reveal that aging is not associated with variations in the level of calpain-associated Serca1 or GAPDH. However, a decrease in α -actinin 3 and an increase in ATP synthase subunit alpha interactions with m-calpain are observed in old rats compared to adult rats. For Ryr 1 there is a net tendency of a decrease in the interaction as a function of age with μ -calpain and an increase with m-calpain (fig. 5), but these changes occur during the growth period (3-10 months). In the meantime we also showed that only Ryr 1, alpha actinin and ATP synthase could be proteolysed in a calpain dependent fashion in gastrocnemius protein extracts (fig. 6). Taken together this data points to different roles for μ and m-calpain and suggests different susceptibility of these proteins to calpain-dependent proteolysis or different localisation of calpains during aging.

It is known that skeletal muscle contraction and/or sarcomere integrity is altered during aging (for a review see Weisleder and Ma, 2008 or Margreth et al., 1999). Our results suggest that the impairment in contraction observed in aging muscle could be due to calpains activation because they interact with alpha actinin a main regulatory sarcomeric protein. It could be postulated that calpains regulate or cleave alpha actinin thus leading to the cytoskeletal disorganisation observed in the aging muscle sarcomere unit. So, during aging, the decrease in binding of alpha actinin and actin could entail the sarcomere disorganisation and the decrease of mechanical signalling at the Z-line. The release of Ca^{2+} in the sarcoplasm is also essential for skeletal muscle contraction. Shevchenko showed in 1998 that calpain 3 can cleave Ryr1, but the interaction between μ - or m-calpain and Ryr 1 is a novel observation which can be explored further in order to define the potential role of ubiquitous calpains in the deregulation of calcium homeostasis in aging muscle. This suggests that calpains could play a role in the excitation-contraction cycle between the SR and the sarcomere. Another interesting feature of this interaction would be to position calpains next to calcium sparks thus leading to their activation. Although interactions between Ryr1 and calpains do not change during aging, an

upregulation of calpain activity in old muscles (Dargelos et al., 2007) could lead to a depleted Ryr1 channel, defective Ca^{2+} signalling, muscle damage and impaired exercise capacity (Bellinger et al., 2008). On the other hand leakage of SR Ca^{2+} elevates myoplasmic Ca^{2+} levels, leading to an increased mitochondrial Ca^{2+} uptake resulting in cell death (Chabi et al., 2008) and contributing to muscle weakness. Mitochondria are intimately linked to the correct functioning of skeletal muscle, as these organelles constitute the main energy supply in contracting muscle. Evidence has shown that a decrease in the anti-oxidative capacity of aged skeletal muscle is associated with the impairment of mitochondrial function such as reduced electron transport chain activity (Hagen et al., 2004) and ATP synthesis (Drew et al., 2003). Our data suggests that a deregulation of ATP synthase activity by calpains contributes to the decrease of ATP synthesis and the alteration of mitochondrial function leading to cell death in aging muscle.

In conclusion, we have clearly identified new partners for μ - and m-calpains during aging. All of these partners are implicated in muscle cell physiology. Moreover, μ - and m-calpains are able to degrade some of these partners which suggests an even tighter regulation by calpains. An increase in calpain activity during muscle aging together with their implicated role in a key step of muscle cell physiology may explain calpain dependent pathways involved in the establishment of sarcopenia (reviewed by Dargelos et al. in 2008) Further experiments are currently being undertaken in our laboratory to further elucidate the molecular mechanisms of calpain regulated pathways affected during muscle aging or after oxidative stress induction.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the region Aquitaine and from the “Association Française contre les Myopathies” (AFM). The authors acknowledge Dr. Deborah Farmer for proof reading the manuscript. We are grateful to Christelle Poujol (Imaging centre, PICIN) and Jean Luc Morel (CNIC) for their assistance in the use of the confocal microscope, Stéphane Claverol (“Pôle proteomique”, University of Bordeaux II) for mass spectrometric analyses and Amélie Pires-Alves and Pierre Lochet for their technical assistance.

References

- Alderton, J.M., Steinhardt, R.A., 2000. How calcium influx through calcium leak channels is responsible for the elevated levels of calcium-dependent proteolysis in dystrophic myotubes. *Trends Cardiovasc. Med.* 10, 268-272.
- Atencio, I.A., Ramachandra, M., Shabram, P., Demers, G.W., 2000. Calpain inhibitor 1 activates p53-dependent apoptosis in tumor cell lines. *Cell Growth Differ.* 11, 247-253.
- Attaix, D., Mosoni, L., Dardevet, D., Combaret, L., Mirand, P.P., Grizard, J., 2005. Altered responses in skeletal muscle protein turnover during aging in anabolic and catabolic periods. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 1962-1973.
- Averna, M., De Tullio, R., Capini, P., Salamino, F., Pontremoli, S., Melloni, E., 2003. Changes in calpastatin localization and expression during calpain activation: a new mechanism for the regulation of intracellular Ca²⁺-dependent proteolysis. *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 2669-2678.
- Badugu, R., Garcia, M., Bondada, V., Joshi, A., Geddes, J.W., 2008. N terminus of calpain 1 is a mitochondrial targeting sequence. *J. Biol. Chem.* 283, 3409-3417.
- Bansal, D., Miyake, K., Vogel, S.S., Groh, S., Chen, C.C., Williamson, R., McNeil, P.L., Campbell, K.P., 2003. Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature* 423, 168-172.
- Barnoy, S., Maki, M., Kosower, N.S., 2005. Overexpression of calpastatin inhibits L8 myoblast fusion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 332, 697-701.
- Baumgartner, R.N., Koehler, K.M., Gallagher, D., Romero, L., Heymsfield, S.B., Ross, R.R., Garry, P.J., Lindeman, R.D., 1998. Epidemiology of sarcopenia among the elderly in New Mexico. *Am. J. Epidemiol.* 147, 755-763.
- Bellinger, A.M., Reiken, S., Dura, M., Murphy, P.W., Deng, S.X., Landry, D.W., Nieman, D., Lehnart, S.E., Samaru, M., LaCampagne, A., Marks, A.R., 2008. Remodeling of ryanodine

receptor complex causes "leaky" channels: a molecular mechanism for decreased exercise capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 2198-2202.

Berchtold, M.W., Brinkmeier, H., Muntener, M., 2000. Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. *Physiol. Rev.* 80, 1215-1265.

Biswas, S., Harris, F., Dennison, S., Singh, J., Phoenix, D.A., 2004. Calpains: targets of cataract prevention? *Trends Mol. Med.* 10, 78-84.

Brooks, S.V., Faulkner, J.A., 1994. Skeletal muscle weakness in old age: underlying mechanisms. *Med. Sci. Sports Exerc.* 26, 432-439.

Carosio, S., Berardinelli, M.G., Aucello, M., Musaro, A., 2009. Impact of ageing on muscle cell regeneration. *Ageing Res. Rev.*

Chabi, B., Ljubcic, V., Menzies, K.J., Huang, J.H., Saleem, A., Hood, D.A., 2008. Mitochondrial function and apoptotic susceptibility in aging skeletal muscle. *Aging Cell* 7, 2-12.

Clark, K.A., McElhinny, A.S., Beckerle, M.C., Gregorio, C.C., 2002. Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18, 637-706.

Conley, M.S., Meyer, R.A., Bloomberg, J.J., Feedback, D.L., Dudley, G.A., 1995. Noninvasive analysis of human neck muscle function. *Spine* 20, 2505-2512.

Cottin, P., Brustis, J.J., Poussard, S., Elamrani, N., Broncard, S., Ducastaing, A., 1994. Ca(2+)-dependent proteinases (calpains) and muscle cell differentiation. *Biochim. Biophys. Acta* 1223, 170-178.

Cox, N.J., Hayes, M.G., Roe, C.A., Tsuchiya, T., Bell, G.I., 2004. Linkage of calpain 10 to type 2 diabetes: the biological rationale. *Diabetes* 53 Suppl 1, S19-25.

Cree, M.G., Newcomer, B.R., Katsanos, C.S., Sheffield-Moore, M., Chinkes, D., Aarsland, A., Urban, R., Wolfe, R.R., 2004. Intramuscular and liver triglycerides are increased in the elderly. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 3864-3871.

Dargelos, E., Brule, C., Combaret, L., Hadj-Sassi, A., Dulong, S., Poussard, S., Cottin, P., 2007. Involvement of the calcium-dependent proteolytic system in skeletal muscle aging. *Exp. Gerontol.* 42, 1088-1098.

Dargelos, E., Poussard, S., Brule, C., Daury, L., Cottin, P., 2008. Calcium-dependent proteolytic system and muscle dysfunctions: a possible role of calpains in sarcopenia. *Biochimie* 90, 359-368.

Dedieu, S., Poussard, S., Mazeres, G., Grise, F., Dargelos, E., Cottin, P., Brustis, J.J., 2004. Myoblast migration is regulated by calpain through its involvement in cell attachment and cytoskeletal organization. *Exp. Cell Res.* 292, 187-200.

Dela, F., Kjaer, M., 2006. Resistance training, insulin sensitivity and muscle function in the elderly. *Essays Biochem.* 42, 75-88.

Delbono, O., 2002. Molecular mechanisms and therapeutics of the deficit in specific force in ageing skeletal muscle. *Biogerontology* 3, 265-270.

Dirks, A.J., Hofer, T., Marzetti, E., Pahor, M., Leeuwenburgh, C., 2006. Mitochondrial DNA mutations, energy metabolism and apoptosis in aging muscle. *Ageing Res. Rev.* 5, 179-195.

Dirks, A.J., Leeuwenburgh, C., 2004. Aging and lifelong calorie restriction result in adaptations of skeletal muscle apoptosis repressor, apoptosis-inducing factor, X-linked inhibitor of apoptosis, caspase-3, and caspase-12. *Free Radic. Biol. Med.* 36, 27-39.

Dirks, A.J., Leeuwenburgh, C., 2005. The role of apoptosis in age-related skeletal muscle atrophy. *Sports Med.* 35, 473-483.

Drew, B., Phaneuf, S., Dirks, A., Selman, C., Gredilla, R., Lezza, A., Barja, G., Leeuwenburgh, C., 2003. Effects of aging and caloric restriction on mitochondrial energy

production in gastrocnemius muscle and heart. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284, R474-480.

Edstrom, L., Larsson, L., 1987. Effects of age on contractile and enzyme-histochemical properties of fast- and slow-twitch single motor units in the rat. *J Physiol* 392, 129-145.

Fill, M., Copello, J.A., 2002. Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol. Rev.* 82, 893-922.

Franco, S.J., Rodgers, M.A., Perrin, B.J., Han, J., Bennin, D.A., Critchley, D.R., Huttenlocher, A., 2004. Calpain-mediated proteolysis of talin regulates adhesion dynamics. *Nat. Cell Biol.* 6, 977-983.

Fraysse, B., Desaphy, J.F., Rolland, J.F., Pierno, S., Liantonio, A., Giannuzzi, V., Camerino, C., Didonna, M.P., Cocchi, D., De Luca, A., Conte Camerino, D., 2006. Fiber type-related changes in rat skeletal muscle calcium homeostasis during aging and restoration by growth hormone. *Neurobiol. Dis.* 21, 372-380.

Giresi, P.G., Stevenson, E.J., Theilhaber, J., Koncarevic, A., Parkington, J., Fielding, R.A., Kandarian, S.C., 2005. Identification of a molecular signature of sarcopenia. *Physiol. Genomics* 21, 253-263.

Glading, A., Uberall, F., Keyse, S.M., Lauffenburger, D.A., Wells, A., 2001. Membrane proximal ERK signaling is required for M-calpain activation downstream of epidermal growth factor receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 276, 23341-23348.

Goll, D.E., Thompson, V.F., Li, H., Wei, W., Cong, J., 2003. The calpain system. *Physiol. Rev.* 83, 731-801.

Goudenege, S., Dargelos, E., Claverol, S., Bonneu, M., Cottin, P., Poussard, S., 2007. Comparative proteomic analysis of myotube caveolae after milli-calpain deregulation. *Proteomics* 7, 3289-3298.

Hagen, J.L., Krause, D.J., Baker, D.J., Fu, M.H., Tarnopolsky, M.A., Hepple, R.T., 2004. Skeletal muscle aging in F344BN F1-hybrid rats: I. Mitochondrial dysfunction contributes to the age-associated reduction in VO₂max. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 59, 1099-1110.

Hara, M.R., Cascio, M.B., Sawa, A., 2006. GAPDH as a sensor of NO stress. *Biochim. Biophys. Acta* 1762, 502-509.

Huang, Y., de Morree, A., van Remoortere, A., Bushby, K., Frants, R.R., Dunnen, J.T., van der Maarel, S.M., 2008. Calpain 3 is a modulator of the dysferlin protein complex in skeletal muscle. *Hum. Mol. Genet.* 17, 1855-1866.

Ikemoto, N., Ronjat, M., Meszaros, L.G., Koshita, M., 1989. Postulated role of calsequestrin in the regulation of calcium release from sarcoplasmic reticulum. *Biochemistry (Mosc.)* 28, 6764-6771.

Kar, P., Chakraborti, T., Samanta, K., Chakraborti, S., 2008. Submitochondrial localization of associated mu-calpain and calpastatin. *Arch. Biochem. Biophys.* 470, 176-186.

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Larsson, L., Grimby, G., Karlsson, J., 1979. Muscle strength and speed of movement in relation to age and muscle morphology. *J. Appl. Physiol.* 46, 451-456.

Levine, R.L., Williams, J.A., Stadtman, E.R., Shacter, E., 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 233, 346-357.

Li, H., Thompson, V.F., Goll, D.E., 2004. Effects of autolysis on properties of mu- and m-calpain. *Biochim. Biophys. Acta* 1691, 91-103.

Lynch, G.S., 2004. Emerging drugs for sarcopenia: age-related muscle wasting. *Expert Opin. Emerg. Drugs* 9, 345-361.

Mamoune, A., Luo, J.H., Lauffenburger, D.A., Wells, A., 2003. Calpain-2 as a target for limiting prostate cancer invasion. *Cancer Res.* 63, 4632-4640.

Manya, H., Inomata, M., Fujimori, T., Dohmae, N., Sato, Y., Takio, K., Nabeshima, Y., Endo, T., 2002. Klotho protein deficiency leads to overactivation of mu-calpain. *J. Biol. Chem.* 277, 35503-35508.

Margreth, A., Damiani, E., Bortoloso, E., 1999. Sarcoplasmic reticulum in aged skeletal muscle. *Acta Physiol. Scand.* 167, 331-338.

Matsushita, Y., Shimada, Y., Kawara, S., Takehara, K., Sato, S., 2005. Autoantibodies directed against the protease inhibitor calpastatin in psoriasis. *Clin. Exp. Immunol.* 139, 355-362.

Mazeres, G., Leloup, L., Daury, L., Cottin, P., Brustis, J.J., 2006. Myoblast attachment and spreading are regulated by different patterns by ubiquitous calpains. *Cell Motil. Cytoskeleton* 63, 193-207.

McNeil, C.J., Doherty, T.J., Stashuk, D.W., Rice, C.L., 2005. Motor unit number estimates in the tibialis anterior muscle of young, old, and very old men. *Muscle Nerve* 31, 461-467.

Menard, H.A., el-Amine, M., 1996. The calpain-calpastatin system in rheumatoid arthritis. *Immunol. Today* 17, 545-547.

Nixon, R.A., 2003. The calpains in aging and aging-related diseases. *Ageing Res. Rev.* 2, 407-418.

Ouanounou, A., Zhang, L., Charlton, M.P., Carlen, P.L., 1999. Differential modulation of synaptic transmission by calcium chelators in young and aged hippocampal CA1 neurons: evidence for altered calcium homeostasis in aging. *J. Neurosci.* 19, 906-915.

Perrin, C., Vergely, C., Rochette, L., 2004. [Calpains and cardiac diseases]. *Ann. Cardiol. Angeiol. (Paris)* 53, 259-266.

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, 2578-2590.

Richard, I., Roudaut, C., Marchand, S., Baghdiguian, S., Herasse, M., Stockholm, D., Ono, Y., Suel, L., Bourg, N., Sorimachi, H., Lefranc, G., Fardeau, M., Sebille, A., Beckmann, J.S., 2000. Loss of calpain 3 proteolytic activity leads to muscular dystrophy and to apoptosis-associated IkappaBalpha/nuclear factor kappaB pathway perturbation in mice. *J. Cell Biol.* 151, 1583-1590.

Romero, P.J., Salas, V., Hernandez, C., 2002. Calcium pump phosphoenzyme from young and old human red cells. *Cell Biol. Int.* 26, 945-949.

Schad, E., Farkas, A., Jekely, G., Tompa, P., Friedrich, P., 2002. A novel human small subunit of calpains. *Biochem. J.* 362, 383-388.

Shevchenko, S., Feng, W., Varsanyi, M., Shoshan-Barmatz, V., 1998. Identification, characterization and partial purification of a thiol-protease which cleaves specifically the skeletal muscle ryanodine receptor/Ca²⁺ release channel. *J. Membr. Biol.* 161, 33-43.

Suzuki, K., Saido, T.C., Hirai, S., 1992. Modulation of cellular signals by calpain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 674, 218-227.

Szulc, P., Beck, T.J., Marchand, F., Delmas, P.D., 2005. Low skeletal muscle mass is associated with poor structural parameters of bone and impaired balance in elderly men--the MINOS study. *J. Bone Miner. Res.* 20, 721-729.

Tan, Y., Dourdin, N., Wu, C., De Veyra, T., Elce, J.S., Greer, P.A., 2006. Ubiquitous calpains promote caspase-12 and JNK activation during endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 281, 16016-16024.

Weisleder, N., Ma, J., 2008. Altered Ca²⁺ sparks in aging skeletal and cardiac muscle. *Ageing Res. Rev.* 7, 177-188.

Yarasheski, K.E., 2003. Exercise, aging, and muscle protein metabolism. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 58, M918-922.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1 Effects of age on gastrocnemius characteristics

A) Body mass (BM) and Gastrocnemius mass (GM) expressed per unit of body weight in 3, 10 and 24-months-old rats. B) Apoptotic nuclei were counted by TUNEL assay in 10 μ m muscle cross sections from 3,10 and 24 months old Wistar rats. C) Protein carbonyl concentration was measured after incubation with DNPH and measured by the absorbance at 370nm with a UV spectrophotometer.

Values are means \pm SEM; n=10 for each group. * $P < 0.05$ versus 3 months old rats, # $P < 0,05$ versus 10 months old rats

Fig.2 Separation of μ - and m-calpain co-immunoprecipitated proteins

A) Co-immunoprecipitation-based approach to identify putative μ - and m-calpain partners. B) SDS-PAGE obtained for μ - and m-calpain immunoprecipitates. Proteins were extracted from gastrocnemius muscle in non-denaturing conditions and immunoprecipitated with anti μ - and m-calpain sera. Negative control (-) was performed with non immune sheep serum. Co-immunoprecipitated proteins were separated on 4-20% gradient SDS-PAGE and stained with colloidal Coomassie Blue as described in material and methods.

IP= immunoprecipitation; Y= young; A= adult; O= old
n=6 for each condition

Fig. 3 Reverse immunoprecipitations and Western blotting analyses.

Reverse immunoprecipitations were performed with antibodies against proteins identified as putative partners of calpains (fig. 1 and table 1) followed by calpain immunodetection.

Controls were performed with non-immune IgG.

Ryr1= ryanodyne receptor1; serca1 = sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase;
ATP synt = ATP synthase; GAPDH= glyceraldéhyde 3 phosphate dehydrogenase

Fig. 4 Confocal laser scanning fluorescence microscopic images of μ - and m-calpain (A); Ryr, α -actinin3 and ATP synthase subunit α (B); overlay of both images (C) and graphs of the

intensity value along the selected yellow line in C (D). A width at the middle of the peak overlapping zone higher than 2 pixels illustrates colocalisation of both proteins. Numbers indicated the number of pixel between the limit of the overlapping zone. Muscle cross sections were incubated with appropriate primary antibodies (see materials and methods). Proteins were detected using secondary antibodies conjugated to Alexa fluor (Alexa 594 for μ -calpain, Ryr1, α -actinin 3 and ATP synthase subunit α ; Alexa 488 for Ryr1 and m-calpain). Each experiment was repeated at least four times (scale bar, 25 μ m).

Fig. 5 Quantification of the level of calpain-associated partners as a function of age

After μ - or m-calpain immunoprecipitation, ATP synthase, α -actinin 3 and Ryr 1 levels were measured by Western blotting and expressed as a percentage of the level obtained in the young rats.

Value are means \pm SEM, n=6 for each group, * $P < 0,05$ versus 3 months old rats ; # $P < 0,05$ versus 10 months old rats

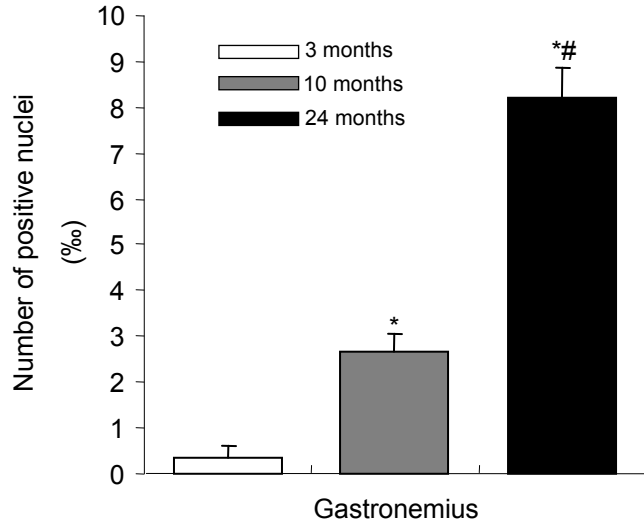
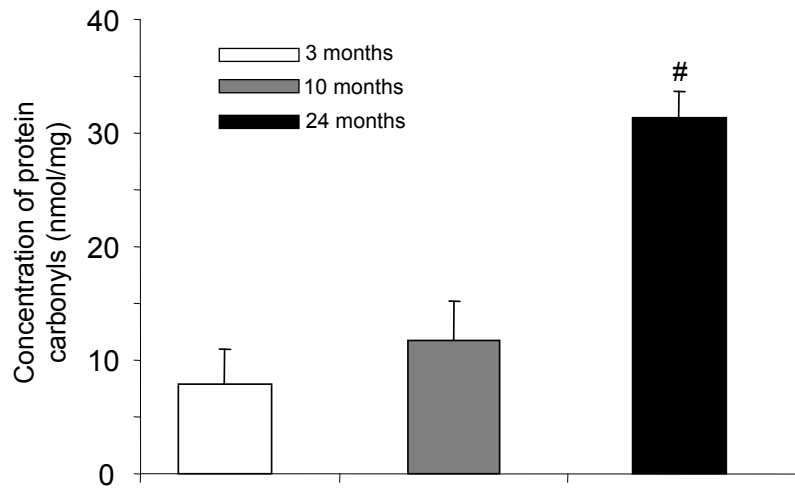
Fig. 6 Digestion of ATP synthase, Ryanodyne receptor 1 and α -actinin 3 by calpains

Proteins were extracted and 50 μ g were incubated with 5mM of CaCl₂ or 50 μ M Calpeptin (C.) or 5 mM EGTA at different time. Samples were subjected to SDS-PAGE and immunodetection was carried out using specific antibodies for Ryr 1, ATP synthase, α -actinin 3 and GAPDH. All values are normalized with regard to GAPDH protein amount for equal gel loading and expressed as a percentage of the level of the non digested extract (represented by the dotted line in the graph).

Value are means \pm SEM, n=5 for each group; * $P < 0.05$

A)

Age (months)	BM (g)	GM / body mass (mg/g)
3	401 ± 21	5,2 ± 0,201
10	508 ± 30 *	4,8 ± 0,195 *
24	593 ± 34 *	3,8 ± 0,224 *

B)**C)****Figure 1**

A)

Extraction of gastronemius muscle proteins from 3, 10 and 24 months rats.

↓
Co-immunoprecipitation of μ - and m-calpain interacting proteins

↓
SDS-PAGE

↓
Band cutting and trypsin digestion

↓
Mass spectrometry (Maldi-TOF) and database searching

↓
Validation with specific antibodies

B)

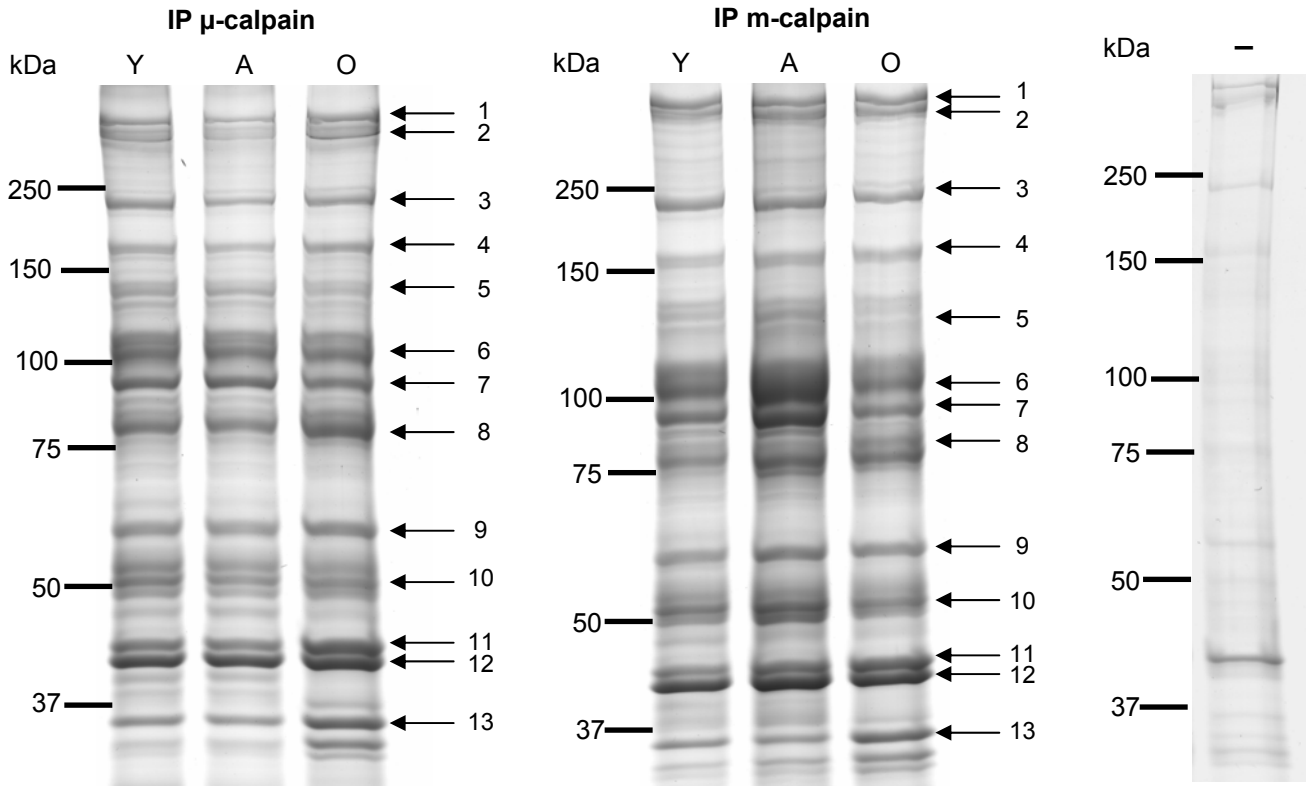


Figure 2

Band number	Name	Accession number	Weight (Da)	MS/MS peptides	Coverage %	μ - or m-substrate	Fonction	Validation
1	Ryanodyne receptor 1	Q9R1G1	565485	74	17	No	Calcium homeostasis	Antibody
2	Nebuline	P20929	850760	113	18	Yes	Cytoskeletal protein	None
3	Myosin 4 Dysferlin	Q29RW1 NP_001101339 (NCBI)	223494 236735	96 41	44 26	Yes No	Cytoskeletal protein Cytoskeletal protein	None None
4	Myomesin 2 Clathrin heavy chain 1	Q80UL0 P11442	164711 191596	62 14	47 11	No No	Cytoskeletal protein Vesicle mediated transport	None None
5	Leucine rich PPR motif containing protein, mitochondrial	Q5SGE0	156651	25	24	No	Mitochondrial protein	None
6	Alpha actinin 3	Q8K551	103012	42	50	Yes	Cytoskeletal protein	Antibody
7	Sarcoplasmic/endoplasmic calcium ATPase 1 (Serca1)	Q64578	109408	30	33	No	Calcium homeostasis	Antibody
8	Phosphofructokinase Calpain (μ - or m-)	P47858 Q07009	85889 79918	21 3	30 5	No /	Metabolism enzyme	None Antibody
9	Calsequestrin 1 precurosor	P19633	46333	11	25	No	Calcium homeostasis	None
10	ATP synthase subunit alpha	P15999	59753	25	50	Yes	Mitochondrial metabolism	Antibody
11	Actin alpha skeletal muscle type	P68136	42050	14	46	No	Cytoskeletal protein	Antibody
12	Creatine kinase M-type	P00564	43044	18	47	No	Metabolism enzyme	None
13	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	P04797	35827	20	38	No	Metabolism enzyme	antibody

Table 1 Identification of putative calpain partners by mass spectrometry

Bands from gradient SDS-PAGE (fig.2, 1-13), numbered from high to low molecular weights were digested by trypsin and analysed by mass spectrometry trough MALDI-TOF mass fingerprint

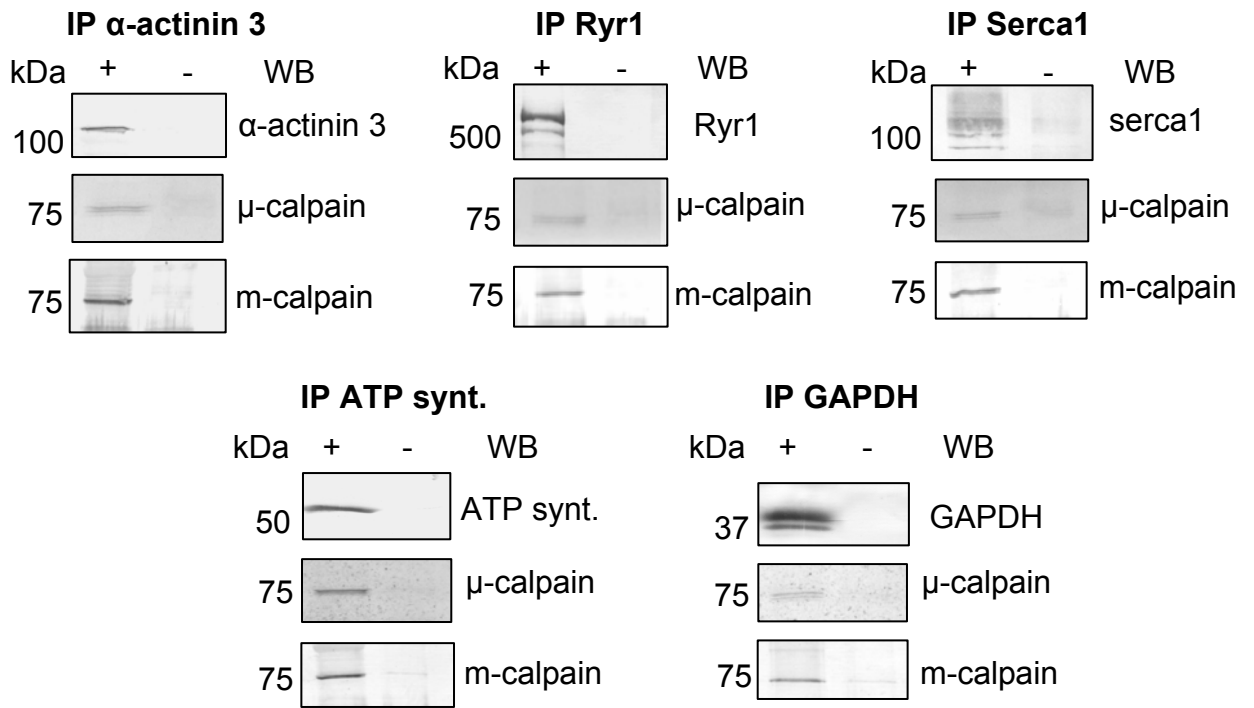


Figure 3

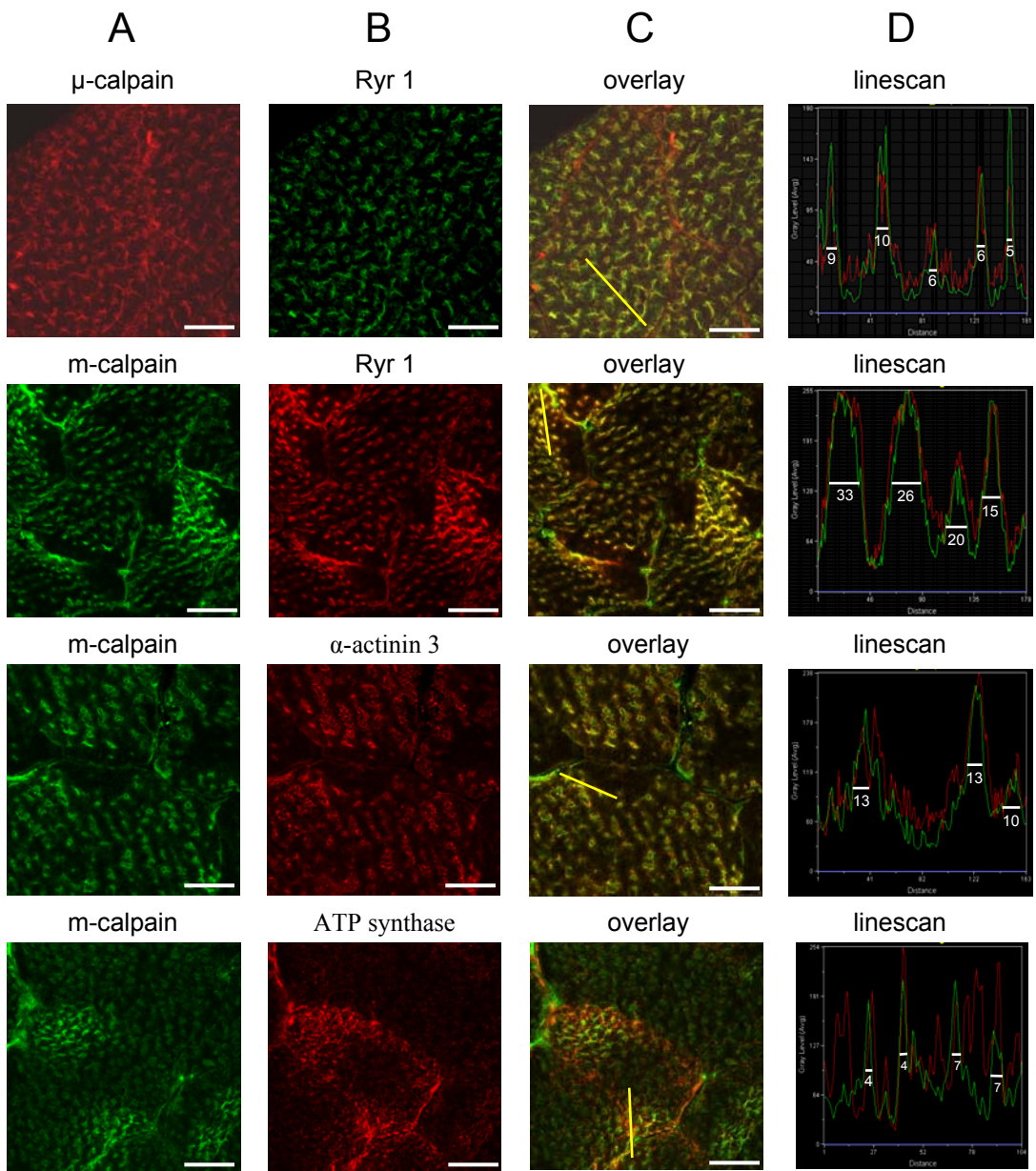


Figure 4

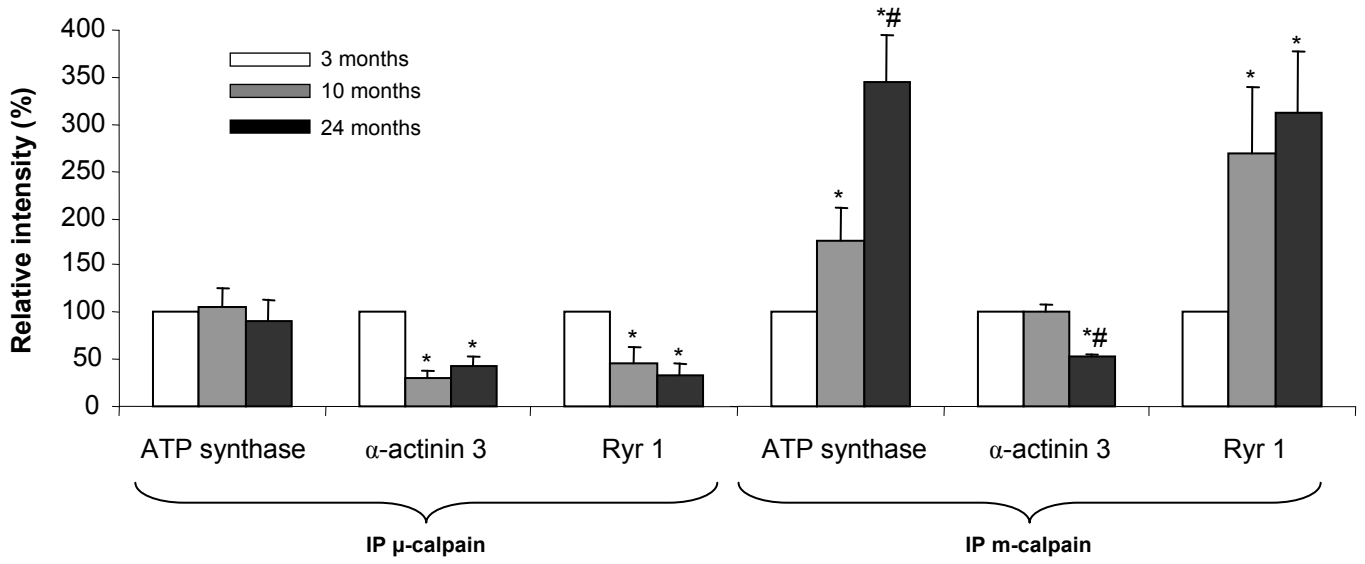


Figure 5

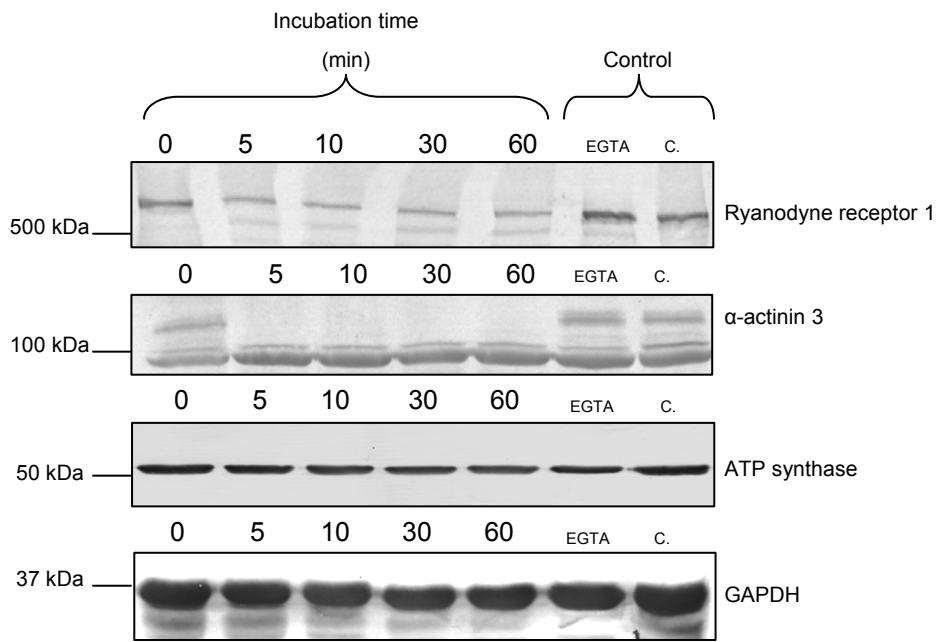
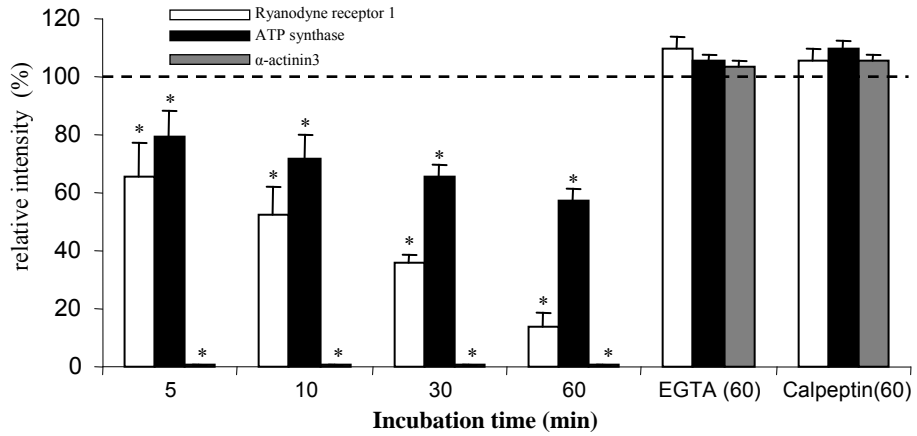
A)**B)**

Figure 6

Chapitre 2

Augmentation de la protéolyse neutre calcium-dépendante dans des myoblastes humains après induction d'un stress oxydant

Article 3: Up-regulation of calcium-dependent proteolysis in human myoblast under acute oxidative stress.

Elise Dargelos¹, Cédric Brulé¹, Pascal Stuelsatz, Vincent Mouly, Philippe Veschambre, Patrick Cottin, Sylvie Poussard.

Experimental Cell research, doi:10.1016/j.yexcr.2009.07.025

¹ les auteurs ont participé à part égale dans ce travail

Un des mécanismes majeurs responsables de la progression du vieillissement musculaire est la réduction du potentiel régénératif des fibres musculaires. Cette réduction serait due à la diminution du nombre et/ou de la fonction des cellules satellites (Barani *et al.*, 2003). L'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) au cours du vieillissement est une des causes principales de la sarcopénie et pourrait contribuer aux défauts de fonctionnement des cellules satellites. Un stress oxydant est également corrélé à l'accumulation de calcium cytosolique observé durant le vieillissement pouvant être responsable de l'activation des voies de signalisation calcium-dépendante (Cherednichenko *et al.*, 2004). C'est dans cette optique que nous avons étudié les effets d'un stress oxydant sur des cellules satellites humaines : les cellules LHCNM2.

Ainsi, nous avons étudié l'incidence d'un traitement à l'eau oxygénée sur l'expression, l'activité des calpaïnes et leur localisation subcellulaire. Un antioxydant commercial provenant d'écorce de pin (l'Oligopin®) a également été testé afin de prévenir les effets de l'eau oxygénée.

Résultats principaux :

Dans un premier temps, nous avons validé l'induction du stress oxydant au niveau cellulaire. Nous avons pu constater par une étude TUNEL que l'eau oxygénée à une concentration de 1mM entraîne une augmentation du nombre de noyaux apoptotiques de 26%. Dans les mêmes conditions, un dosage des protéines carbonylées révèle une augmentation d'un facteur deux environ des groupements carbonyles. Enfin, nous avons mis en évidence une activation de la MAP kinase p38, celle-ci étant induite très rapidement lors d'un stress oxydant.

Les profils d'expression des ARNm codant pour la μ - et la m-calpaïne sont affectés de façon très similaire par le stress oxydant. Ainsi, leurs niveaux augmentent significativement après une heure de traitement à l'eau oxygénée parallèlement à celui des protéines. Après une diminution quatre et sept heures après l'induction du stress, qui pourrait traduire un feedback négatif, le niveau d'expression des ARNm tend à retourner au niveau d'expression du contrôle après treize heures. D'une façon remarquable, la forme active de la μ -calpaïne (76 kDa) augmente très fortement suite à l'induction du stress oxydant.

L'activité des calpaïnes, mesurée *in situ* par la dégradation d'un substrat fluorescent (le T-BOC-LM-CMAC) augmente dès 15 minutes et jusqu'à treize heures après le traitement par l' H_2O_2 . Cette augmentation est parfaitement corrélée à une hausse de la concentration calcique intracellulaire. Parallèlement, l'étude d'un substrat mitochondrial des calpaïnes (Goudenège *et al.*, 2007), la sous unité α de l'ATP synthase, nous a permis de confirmer cette activation de la protéolyse calcium-dépendante en condition de stress.

L'eau oxygénée induit également une relocalisation intracellulaire des calpaïnes. En effet, les deux enzymes qui sont principalement localisées dans le cytoplasme des cellules contrôles, subissent une relocalisation périnucléaire suite à l'induction du stress oxydant. De plus, la m-calpaïne semble également relocalisée dans des compartiments vésiculaires suggérant sa translocation dans des organites cellulaires.

Enfin, nous avons pu montrer qu'un traitement avec un antioxydant naturel extrait d'écorce de pin (l'Oligopin®) était capable de protéger les cellules de l'apoptose induite par

l'eau oxygénée. Parallèlement, l'activation des calpaïnes observée après induction du stress oxydant est inhibée par une pré-incubation des cellules avec l'Oligopin®.

Cette étude nous a permis de mettre en évidence qu'un stress oxydant entraîne une augmentation de l'expression et de l'activité des calpaïnes ubiquitaires dans les myoblastes humains LHCN-M2. Cette protéolyse accrue pourrait participer à l'apoptose des cellules satellites entraînant la diminution de la régénération observée au cours du vieillissement musculaire.



ELSEVIER

available at www.sciencedirect.comwww.elsevier.com/locate/yexcr

Research Article

Up-regulation of calcium-dependent proteolysis in human myoblasts under acute oxidative stress

Elise Dargelos^{a,*}, Cédric Brulé^{a,1}, Pascal Stuelsatz^a, Vincent Mouly^b, Philippe Veschambre^a, Patrick Cottin^a, Sylvie Poussard^a

^aUniversité Bordeaux 1, Unité Protéolyse Croissance et Développement Musculaire, INRA, USC 2009, Avenue des Facultés, F-33405 Talence, France

^bUniversité Pierre et Marie Curie-Paris 06 UMRS 974, INSERM U974, CNRS UMR 7215, Institut de Myologie, 105 bd de l'Hôpital, Paris, F-75013, France

ARTICLE INFORMATION

Article Chronology:

Received 16 June 2009

Revised version received 24 July 2009

Accepted 27 July 2009

Keywords:

Oxidative stress

Calpains

Proteolysis

Skeletal muscle

Regeneration

Ageing

ABSTRACT

The reduced regenerative potential of muscle fibres, most likely due to a decreased number and/or function of satellite cells, could play a significant role in the progression of muscle ageing. Accumulation of reactive oxygen species has been clearly correlated to sarcopenia and could contribute to the impairment of satellite cell function. In this work we have investigated the effect of oxidative stress generated by hydrogen peroxide in cultured human skeletal muscle satellite cells. We specifically focused on the activity and regulation of calpains. These calcium-dependent proteases are known to regulate many transduction pathways including apoptosis and play a critical role in satellite cell function. In our experimental conditions, which induce an increase in calcium concentration, protein oxidation and apoptotic cell death, a significant up-regulation of calpain expression and activity were observed and ATP synthase, a major component of the respiratory chain, was identified as a calpain target. Interestingly we were able to protect the cells from these H₂O₂-induced effects and prevent calpain up-regulation with a natural antioxidant extracted from pine bark (Oligopin®). These data strongly suggest that oxidative stress could impair satellite cell functionality *via* calpain-dependent pathways and that an antioxidant such as Oligopin® could prevent apoptosis and calpain activation.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Muscle ageing, also called sarcopenia, is characterized by a progressive and involuntary loss of muscle mass [1]. This loss of muscle mass results from a decline in regeneration events and imbalance between anabolism and catabolism rates linked with cell death. This condition, which results in a reduction in both the number and the size of muscle fibres, affects all aged people independently of their overall health status [2]. Although sarcopenia

has been well documented over the last decade, the molecular mechanisms leading to such a loss of muscle mass still remain controversial. Among the different hypotheses proposed in the literature is the severe increase of oxidative stress in muscle cells during the course of ageing [3,4]. Skeletal muscle represents a highly oxygenated tissue and is normally exposed to reactive oxygen species (ROS). In resting conditions, the mitochondrial electron transport chain and the phospholipase A2 are the main sites of ROS production [5,6]. During contraction, NADPH oxidase

* Corresponding author. Fax: +33 5 40 00 84 96.

E-mail address: elise.dargelos@enscpb.fr (E. Dargelos).

¹ Contributed equally to this work.

and phospholipase A2 are responsible for the synthesis of ROS [7,8]. In physiological conditions, the cellular content of ROS, controlled by several antioxidant molecules (superoxide dismutase, glutathione, catalase...), participates to the regulation of metabolism [9]. However in pathological conditions as well as during ageing, the antioxidant defences are impaired leading to the development of oxidative stress. For example, it has been shown that mice lacking CuZnSOD show a loss of muscle mass similar to what is observed during sarcopenia [10]. Intracellular ROS accumulation can have deleterious effects on most macromolecules. Protein oxidation, lipid peroxidation or DNA mutations have been well characterized following the induction of oxidative stress [11].

In response to a stress, skeletal muscle is able to initiate rapid and wide repair mechanisms in order to overcome the loss of muscle mass. Myogenic stem cells, also called satellite cells, are located between the basal lamina and the plasma membrane of skeletal muscle fibres, and have the potential to give rise to new fibres, repair damaged fibres and maintain muscle mass. Satellite cells play a key role not only in fibre formation during muscle development but also during regeneration following muscle damage. In response to several stimuli, they become activated, enter the cell cycle, proliferate and fuse with muscle cells in order to contribute to tissue repair and avoid muscle loss.

From a histological point of view, old animal muscles are highly modified with the appearance of fibres with irregular calibre and inflammatory infiltrates characteristic of degeneration/regeneration events [12,13]. Cellular and molecular mechanisms known to be involved in activation and proliferation of satellite cells are modified [14]. Altogether, these changes result in an impaired muscle regeneration process and contribute to the accumulation of incomplete repair events leading to sarcopenia. The proportion of satellite cells is reduced in old subjects because of their greater sensitivity to apoptosis [15,16]. Consequently, the muscles ability to regenerate is decreased. Proteins involved in the regulation of the cell cycle, when affected by oxidative stress would impair the muscle regeneration capacity [17]. ROS accumulation would also play a major role in the development of cell death and apoptosis [18].

Interestingly, oxidative stress has been correlated with the release of calcium from the sarcoplasmic reticulum [19], which could partly explain the increase in resting calcium concentration observed in aged individuals and lead to the activation of calcium-dependent pathways [20]. We recently showed that calpain (calcium-dependent proteases) activity was dramatically up-regulated in the muscle of old rats compared to young ones [21].

Calpains belong to a large family of calcium-dependent cysteine proteases. At least 15 isoforms have been identified in mammals among which calpain 1 (μ -calpain) and calpain 2 (m-calpain) are the best characterized [22]. Both are heterodimeric proteins consisting of a large catalytic subunit (80 kDa) and a small regulatory subunit (30 kDa). Calpain activity is tightly regulated by calcium but also by the specific endogenous inhibitor, calpastatin, association with phospholipids, autoproteolysis and phosphorylation [23–25].

Calpains are involved in a large variety of cellular processes such as cytoskeletal remodelling, cell spreading and motility, signal transduction, cell cycle regulation, apoptosis... [26–30]. Calpain activity has been shown to play a critical role in cellular events associated with regeneration: satellite cell proliferation, migration and fusion [27,31]. Apoptosis is one of the mechanisms

involved in the age-related depletion of satellite cells. Calpains could be implicated at several levels in this process. They have been shown to interact with caspases, regulate bcl-2 and stabilize tumour suppressor proteins (p53 and Rb), consequently activating cell death [32,33]. Given the strong involvement of calcium homeostasis in the control of intracellular transduction pathways, calcium-dependent proteolysis has been shown to be affected in the development of multiple diseases associated with calcium overload. It has been demonstrated for instance that calpain activity is up-regulated in Alzheimer's disease or muscular dystrophies [34,35].

Like previously described, ageing increases the susceptibility of satellite cells to apoptosis [36]. This phenomenon could not only account for the reduction in the number of cells but also participate to the impairment of their regenerative capacity [37]. It was thus of major interest to understand how ROS accumulation, a major cause of cell ageing, can induce cell death in satellite cells in proliferation. We show here that oxidative stress induction is able to trigger a calcium overload and activate calcium-dependent proteolysis during proliferation of human muscle satellite cells, in a similar way than what we observed during ageing of differentiated muscle fibres. We identified ATP-synthase subunit alpha, a major component of the respiratory chain, as a calpain target under oxidative stress. This enhanced intracellular proteolysis could contribute to abnormal mitochondrial function and apoptotic cell death. In a second step, we were able to protect the cells from H₂O₂-induced cell death with a natural antioxidant (pine bark extract). In a very remarkable way, Oligopin[®] treatment was able to inhibit the activation of calpains mediated by H₂O₂.

Altogether, these data demonstrate that the oxidative-induced calpain-dependent pathways could play a pivotal role in the depletion of the satellite cell pool leading to an impairment in regeneration events and the development of sarcopenia.

Materials and methods

Materials

Trypan blue dye, DMEM, medium 199 and foetal bovine serum were purchased from Gibco. The M-MLV reverse transcriptase was from Invitrogen and the random primers from Promega. Anti-p38 antibodies were from Tebu-bio. Anti-phosphorylated p38 antibodies were from Cell signalling and anti-ATP-synthase alpha subunit antibodies from Invitrogen, Molecular probes. The m-calpain antibodies were raised in sheep as described by Cottin et al. [38]. Anti- μ -calpain antibodies, all secondary antibodies and other chemicals were from Sigma. Oligopin[®] is a French maritime pine bark extract, naturally enriched in polyphenols, which has been provided by DRT ("Dérivés Résiniques et Terpéniques", France).

Cell culture and treatments

Human satellite cells LHCN-M2 were grown as previously described [39]. Briefly, cells were seeded at 2.5 10⁴/cm² and grown in proliferation medium (four parts Dulbecco's modified Eagle's medium (4.5 mg/mL glucose) to one part medium 199 with penicillin (50 U/mL)/streptomycin (50 mg/mL)) supplemented with 20% foetal bovine serum until sub-confluence. All cultures were kept in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37 °C.

Treatments were carried out with 1 mM H₂O₂ in serum free medium. Cells used as controls were cultured in serum free medium without H₂O₂. The cells were harvested after 0.25 or 1 h incubation with or without H₂O₂. When the experiment was done later (4, 7 or 13 h) the serum free medium \pm H₂O₂ was replaced after 1 h by complete standard medium (i.e. containing 20% foetal bovine serum and without H₂O₂), and the cells were allowed to recover for 3, 6 or 12 h before being harvested. Calpeptin (50 μ M) or Oligopin[®] (0.05 mg/mL) was incubated 4 h or 1 h, respectively, in serum free medium followed by H₂O₂. Dose-response studies were used to determine the appropriate concentrations and times used (not shown).

Determination of cell viability

Cell viability was assessed by trypan blue dye exclusion. After detachment from the plates by trypsin treatment, cell suspensions were mixed with an equal volume of 0.4% trypan blue. The number of unstained living cells was counted with a Hemacytometer and cell viability was determined as a percentage of the total cell population.

TUNEL analysis

Cell death was detected by the TUNEL assay using the "In situ cell death detection kit" from Roche. After fixation with 4% paraformaldehyde, fragmented DNA was detected by incorporating fluorescein-12-dUTP with the terminal deoxynucleotidyl transferase. Fixed cells treated with DNase I were used as positive controls. Positive cells were counted in at least 10 different fields and results are expressed as the percentage of the total number of cells.

Western blot analyses

Cell pellets were dissolved in RIPA Buffer (20 mM Tris, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% sodium deoxycholate, 1% nonidet P40 and a protease inhibitor tablet cocktail).

The samples (50 μ g of protein) were applied onto 10% SDS-PAGE according to the Laemmli procedure [40]. Fractionated proteins were then transferred onto an Immobilon membrane. The membranes were blocked for 2 h at room temperature with 5% (w/v) skimmed milk in Tris-Buffered Saline (TBS: 50 mM Tris buffer, pH = 8, 138 mM NaCl, and 2.7 mM KCl). After washing for 5 min in TBS, the membranes were incubated for 2 h at room temperature in TBS containing the primary antibody at appropriate concentrations and 1% skimmed milk. Antibody dilutions were used as follows: 1:1000 for m-calpain, 1:5000 for μ -calpain, 1:500 for p38, 1:700 for pp38 and 1:2000 for ATP synthase. The membranes were next

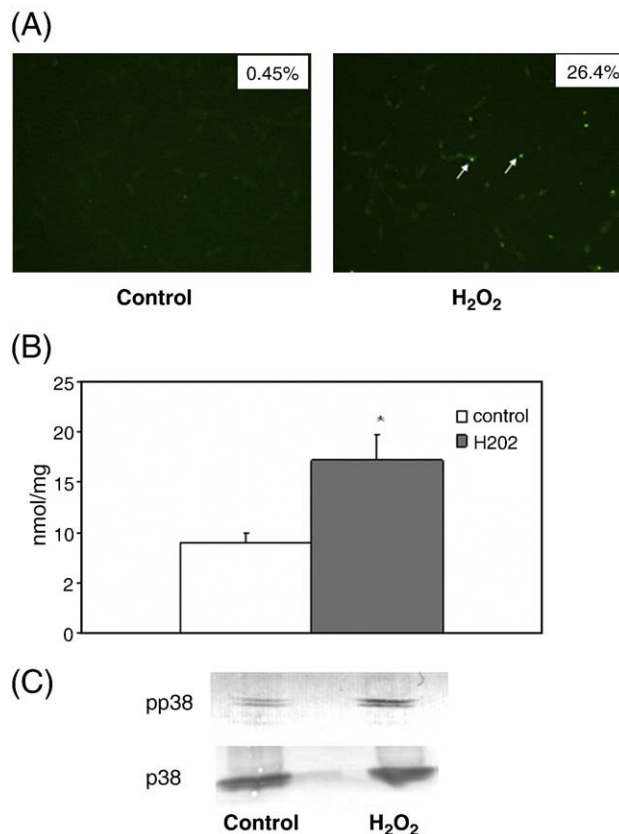


Fig. 1 – Induction of apoptosis and oxidative stress by H₂O₂ treatment. (A) Cells were treated with or without (control) 1 mM H₂O₂ for 1 h and allowed to recover for 6 h in standard medium. TUNEL analysis was carried out as described in Materials and methods and the percentage of positive cells is indicated in the white square. (B) The carbonyl content was measured in cells treated as in (A) and expressed in nmol per mg of total proteins. (C) Proteins were extracted from cells treated with or without (control) 1 mM H₂O₂ for 5 min and subjected to SDS-PAGE. Immunodetection was carried out like described in Materials and methods using specific antibodies for phosphorylated and unphosphorylated forms of p38 MAPK. Bars on the graph represent the SEM. *Significantly different from the untreated control ($P < 0.05$).

washed three times in TBS and the alkaline phosphatase conjugated secondary antibodies were applied. Antibody binding was visualized by the addition of BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indoyl-1-phosphate) and NBT (nitroblue tetrazolium).

Immunofluorescence

LHCN-M2 cells were seeded on glass chamber slides in proliferation medium. After H₂O₂ treatment as indicated, cells were rinsed three times with PBS and fixed for 15 min with paraformaldehyde (4% W/V in PBS). Cells were then permeabilized for 5 min with PBS containing Triton X-100 (1%) and blocked in PBS containing 3% BSA for 1 h. Anti-milli-calpain (1:100) or anti micro-calpain antibodies (1:250) in PBS with 1% BSA were added for 3 h. After three washes (10 min) with PBS, the secondary antibodies (Alexa Fluor 594 (617) donkey anti-goat IgG and Alexa

Table 1 – Effect of H₂O₂ on the viability of LHCN-M2 cells.

H ₂ O ₂ (mM)	0		0.5		1	
Cell viability (% total)	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
	92.3	1.4	76.9	10.4	34.2*	11.1

The cells were treated with various amount of H₂O₂ for 1 h and the viability was measured 12 h later by trypan blue exclusion as described in Materials and methods.

*Significantly different from the untreated sample ($P < 0.05$).

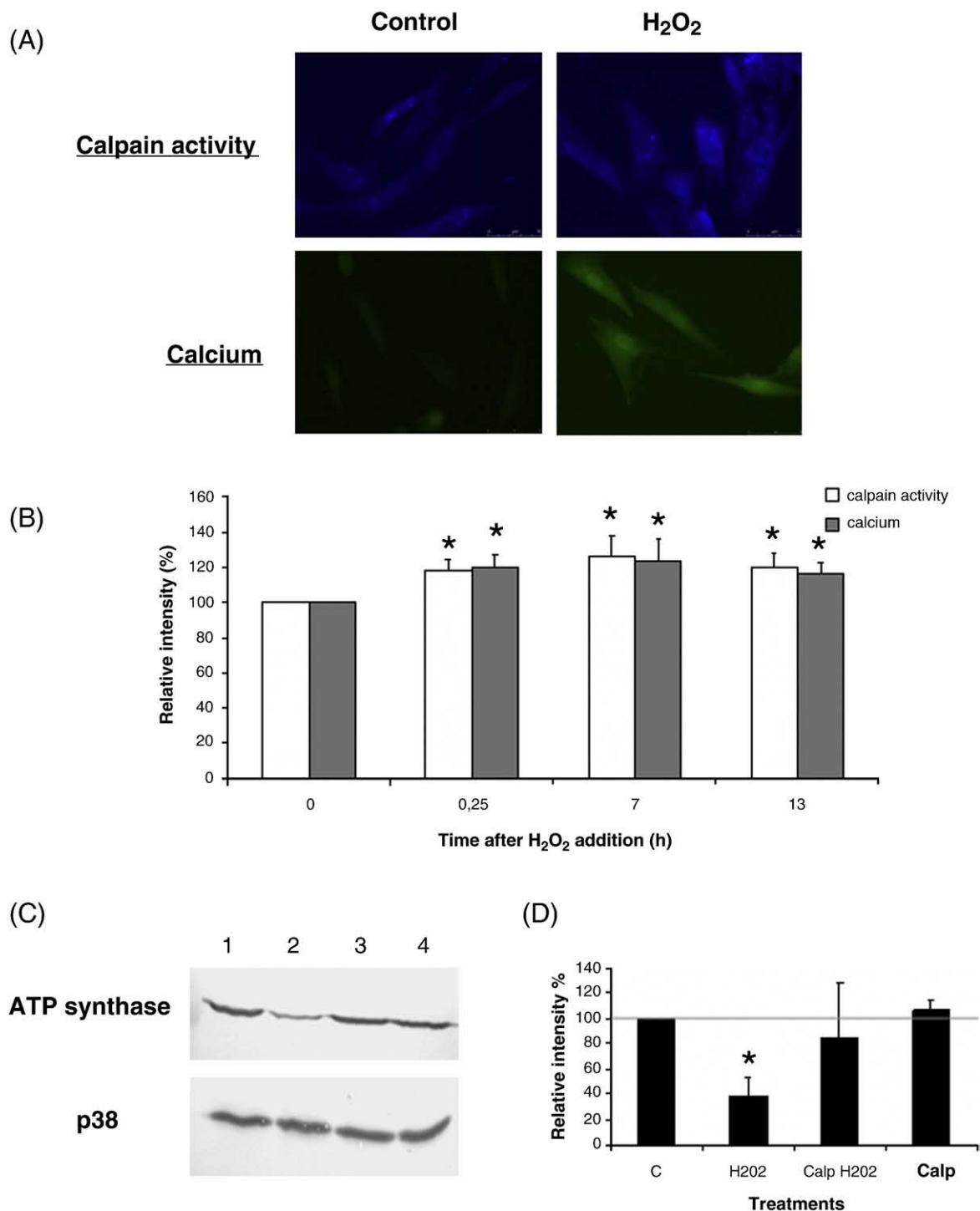


Fig. 2 – Effect of H₂O₂ treatment on calpain activity and intracellular calcium concentration. (A) Cells were treated with or without (control) 1 mM H₂O₂ for 15 min and immediately harvested. Calpain activity and calcium concentration were measured using the t-BOC-LM-CMAC and the Oregon green BAPTA-1 fluorescence, respectively (see [Materials and methods](#)). (B) Fluorescence was quantified with Metamorph software after different time of treatment with H₂O₂, as described in [Materials and methods](#), and results are expressed as a percentage of the level obtained in the untreated control. (C) Cells were treated with or without (control) 1 mM H₂O₂ for 1 h and with or without 50 μM calpeptin for 4 h before harvesting. Proteins were extracted and 50 μg was subjected to SDS-PAGE. Immunodetection was carried out using specific antibodies for ATP synthase and p38, which was used as a loading control. (D) The level of ATP synthase was quantified and expressed as a percentage of the level obtained in the untreated control cells. Bars on the graphs represent the SEM. *Significantly different from the untreated control ($P < 0.01$).

Fluor 594 (617) rabbit anti-mouse IgG, Invitrogen Molecular Probes) were added and incubated for 1 h. The slides were washed, coverslip mounted and examined with an inverted fluorescence microscope (Leica AF DMI 6000). Images were obtained using a digital monochrome Leica DFC350FX R2 camera.

Extraction of total RNA and reverse transcription

Total RNA was extracted using the Promega SV total RNA isolation system. The integrity of the extracted RNA was verified by electrophoresis. The purity and concentration of total RNA were estimated by measuring the 260 nm/280 nm absorbance ratio. Then, 300 ng RNA was reverse transcribed to cDNA using random primers and M-MLV reverse transcriptase. The cDNA were conserved at -20°C and used in q-PCR.

Quantitative PCR

Quantitative PCR was performed using Roche LightCycler[®] FastStart DNA Master SYBR Green I kit according to the manufacturer's instruction. The PCR reactions were performed in capillary tubes in a final volume of 20 μl containing 1 \times LC-DNA Master SYBR Green I mix, 4 mM MgCl_2 , 0.5 μM of each primer and 2 μl cDNA. Forward and

reverse primer sequences for μ - and m-calpain amplification are: agtcgtgccgcagcatggtga, actgtccaggtcaacttccg and gccatcaagtacct-caaccagg, gctccttggcagatgtctgtg, respectively. After a denaturation step (10 min at 95°C), amplification was carried out for 40 cycles of 10 s at 95°C , 5 s at 58°C and 10 s at 72°C . At the end of the run, the specificity of the reaction was confirmed by analysing the melting curves. Crossing points were calculated using the second derivative method in the LightCycler[®] software. Standard curves were made by plotting crossing points versus log concentration of serial dilutions of plasmids containing μ - and m-calpain cDNA. Transcript concentration of both isoforms was determined from the standard curve and compared to the control untreated samples.

Calpain activity

Calpain activity was assayed in living cells using t-BOC-LM-CMAC (7-amino-4-chloromethylcoumarin, t-BOC-L-leucyl-L-methionine amide) as a substrate [41]. This cell permeant molecule becomes fluorescent after specific cleavage by calpain. Cells were grown in DMEM/199 medium supplemented with 20% FBS until they reach sub-confluence. Culture medium was replaced by DMEM/199 without serum, containing 50 μM t-BOC-LM-CMAC. Cells were incubated during 30 min at 37°C in the dark and calpain activity

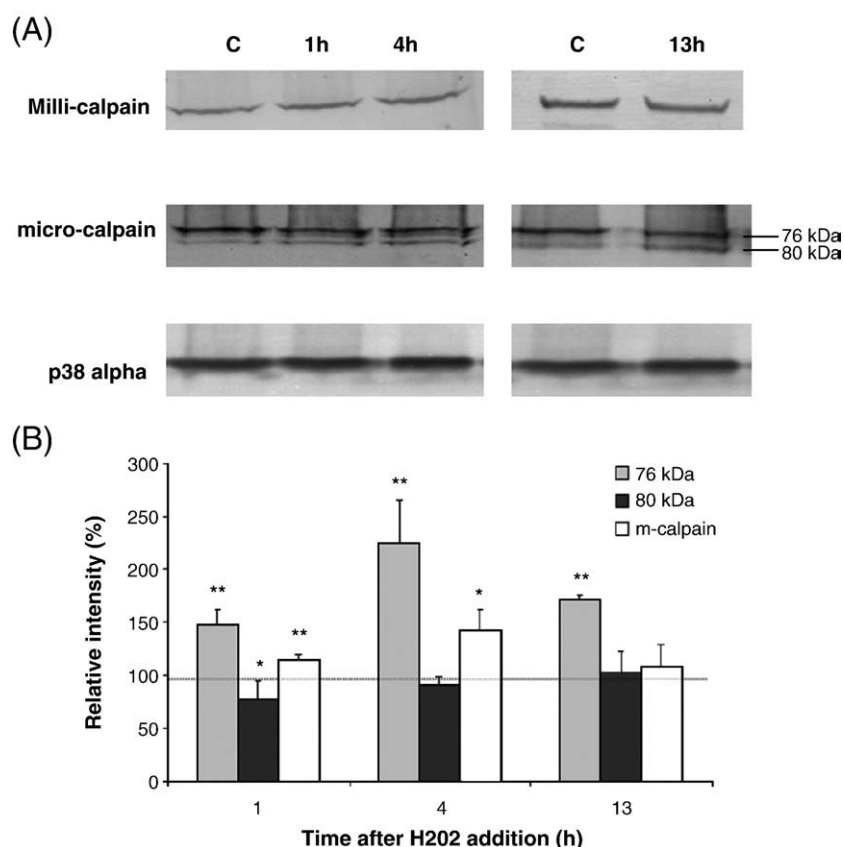


Fig. 3 – Effect of H_2O_2 treatment on μ - and m-calpain protein levels. (A) Cells were treated with or without (control) 1 mM H_2O_2 for 1 h and immediately harvested or left 3 to 12 more hours to recover before harvesting. Proteins were extracted and 50 μg was subjected to SDS-PAGE. Immunodetection was carried out using specific antibodies for μ - and m-calpains and p38, which was used as a loading control. (B) The level of μ - and m-calpains was quantified and expressed as a percentage of the level obtained in the untreated control cells. Bars on the graph represent the SEM. *Significantly different from the control ($P \leq 0.05$), **significantly different from the control ($P < 0.01$).

was then observed using an inverted epifluorescence microscope (Leica AF DMI6000). The fluorescence intensity was quantified using Metamorph software (Molecular device).

Carbonyl protein

Protein carbonyls were determined by measuring the reactivity of carbonyl derivatives with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) [42]. Cells were harvested with ice cold PBS and protein extracts were done in RIPA buffer containing 100 μ M diethylenetriaminepenta-acetic acid (DTPA). Proteins were precipitated with 20% TCA and the reaction with 10 mM DNPH in 2 N HCl was performed for 1 h at room temperature in the dark. Proteins were then washed with ethanol-ethyl acetate (1:1) and precipitated with 20% TCA. Precipitated proteins were dissolved in 80 mM phosphate buffer containing 7 mM SDS, and 0.1 mM EDTA and carbonyl content was determined by the absorbance at 370 nm with a UV spectrophotometer.

Calcium concentration measurement

Cells were grown in DMEM/199 medium supplemented with 20% FBS until they reach sub-confluence. PBS washed cells were incubated for 30 min at room temperature in the dark with Oregon green BAPTA-1 (5 μ M). Unincorporated dye was removed by washing twice with PBS. Real-time calcium flux was monitored *via* epifluorescence microscopy (Leica AF DMI6000). The fluorescence intensity was quantified using Metamorph software (Molecular device).

Statistical analysis

All data are expressed as means \pm SEM and are representative of an average of at least three separate experiments. Each single experiment was conducted on separate cultures. The statistical significance of the difference between multiple groups was determined using ANOVA followed by a Student's *t* test or Tukey analysis. A value of $P < 0.05$ was considered significant.

Results

Effect of H₂O₂ on cell viability

To determine the effect of H₂O₂ on cell viability we used the trypan blue exclusion assay, as described in Materials and methods. As shown in Table 1, two different concentrations of H₂O₂ were used (0.5 and 1 mM). In our conditions, 1 mM H₂O₂ treatment had the most significant effect on cell death (34.2% viability after 12 h). Consequently, 1 mM H₂O₂ was used for all subsequent experiments.

Oxidative stress induction after H₂O₂ treatment

Although H₂O₂ treatment has already been used by others to induce oxidative stress and apoptotic cell death in muscle cells [43,44], we needed to confirm that our conditions of treatment had the expected consequences on our experimental model (LHCN-M2). Apoptotic cell death was measured by the TUNEL method (Fig. 1A). While very few TUNEL-positive cells were observed in the untreated myoblasts ($0.45 \pm 0.06\%$), the signal dramatically increased in the H₂O₂ treated cells ($26.4 \pm 3.5\%$, see

arrows). In the meantime intracellular oxidative stress was evaluated by quantification of the carbonyl content, an indicator of protein oxidation. As shown in Fig. 1B, the amount of carbonyl groups increased from 9 to 17 nmol/mg of protein after H₂O₂ treatment. We also investigated p38 MAPK, a well known mediator of cellular stress in a variety of cell types [45,44]. As expected, p38 MAPK was rapidly and dramatically activated after H₂O₂ addition (up-regulation of the phosphorylated form), although there was no change in the total amount of p38 MAPK (Fig. 1C).

Effect of H₂O₂ treatment on calpain activity and intracellular calcium concentration

Since oxidative stress has been suggested to be involved in the development of sarcopenia [46], we considered a possible link between ROS accumulation and calcium-dependent proteolysis. This hypothesis was partially addressed by measuring cell viability after H₂O₂ treatment with or without pre-incubation with 50 μ M calpeptin for 4 h. In the presence of the calpain inhibitor, cell viability showed a significant increase when compared to the H₂O₂ treated cells ($52 \pm 2\%$ versus $39 \pm 2\%$, $P < 0.05$). In the meantime, the effect of a calpeptin treatment was measured on apoptotic cell death by TUNEL assay. In cells pre-incubated for 4 h with 50 μ M calpain inhibitor before H₂O₂ treatment, the percentage of TUNEL-positive nuclei returned to control level (0.63 ± 0.07 versus 0.42 ± 0.08) while in H₂O₂ treated cells the amount of apoptotic nuclei was $18 \pm 5\%$. Calpeptin alone had no effect on apoptotic cell death (data not shown). To confirm that the proteases are directly

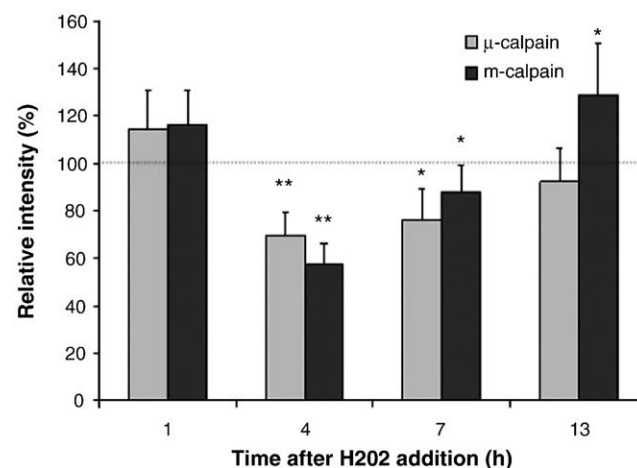


Fig. 4 – Effect of H₂O₂ treatment on calpain expression level. Cells were treated with or without (control) 1 mM H₂O₂ for 1 h and immediately harvested or left 3 to 12 more hours to recover before harvesting. Total RNA were extracted and 300 ng was reverse transcribed using random primers. Standard curves were done by plotting crossing points versus log concentration of serial dilutions of plasmids containing μ - and m-calpain cDNA. Transcript concentration of μ - and m-calpain was determined from the standard curve. Results are expressed as a percentage of the level obtained in the untreated cells. Bars on the graph represent the SEM. *Significantly different from the control ($P < 0.05$), **significantly different from the control ($P < 0.01$).

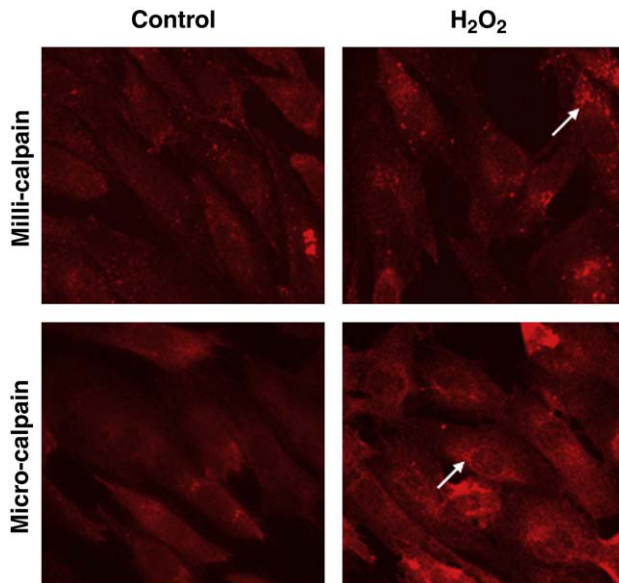


Fig. 5 – Immunofluorescence analysis of calpains' subcellular distribution after H₂O₂ treatment. Cells were treated with or without (control) 1 mM H₂O₂ for 1 h and recovered 3 h later. After fixation, cells were incubated with m- or μ -calpain antibodies followed by staining with respective Alexa Fluor 594 conjugated antibodies (see [Materials and methods](#)). Magnification $\times 400$.

involved in oxidative stress-mediated cell death, calpain activity was measured in human muscle cells after H₂O₂ treatment using a specific synthetic fluorescent substrate (see [Materials and methods](#)). As shown in [Figs. 2A and B](#), t-BOC-LM-CMAC fluorescence intensity reached 120% of the untreated control as early as 15 min after stress induction and stayed at that level until 13 h. ATP-synthase alpha subunit, a mitochondrial calpain substrate [47] was also used to monitor calpain activity after induction of oxidative stress ([Figs. 2C and D](#)). One hour after H₂O₂ treatment, the level of ATP synthase was significantly decreased. Pre-treatment with calpeptin tends to prevent ATP-synthase degradation (-40%) suggesting an involvement of calpain activity in this process. Treatment with calpeptin alone did not alter ATP-synthase content. In parallel intracellular calcium concentration was quantified using Oregon green[®] (see [Materials and methods](#)). Interestingly the calcium concentration evolved in a very similar way to the calpain activity. After 15 min of H₂O₂ treatment, specific fluorescence was 20% higher than the fluorescence

measured in the untreated cells and stayed at that level for 13 h ([Figs. 2A and B](#)).

Influence of oxidative stress induction on calpain expression level

The above mentioned increase in calcium concentration could trigger the up-regulation of calpain activity following the induction of oxidative stress. However, we wanted to determine if there was a possible regulation of the enzymes at the expression level. Western blots were carried out using protein extracts from LHCN-M2 cells submitted (or not) to oxidative stress. As shown in [Fig. 3](#), H₂O₂ treatment induced significant changes in the expression of the proteases. The amount of m-calpain reached 145% of the control 4 h after oxidative stress induction. In a very remarkable way, we were able to observe the accumulation of the activated form of μ -calpain (76 kDa). While the level of the native 80 kDa fragment showed a slight drop 1 h after H₂O₂ treatment (78%), the autolyzed form of μ -calpain dramatically and continually increased, reaching 2.2 times the level of the control 4 h after stress induction. After 13 h, m-calpain returned to the control level whereas the 76 kDa μ -calpain fragment stayed still significantly high (171%). At the same time we have shown that the amount of calpastatin, the calpain endogenous inhibitor, did not change (data not shown).

Specific mRNA levels for μ - and m-calpains were quantified by real time RT-PCR. As shown in [Fig. 4](#), both transcripts were significantly affected by oxidative stress and in a very similar fashion. The levels of both μ - and m-calpain mRNAs slightly increased after 1 h of H₂O₂ treatment (+15%). Surprisingly, we could measure a decrease to 69 and 57% of the control, 4 h after stress induction, for μ - and m-calpains, respectively. Between 7 and 13 h after treatment, mRNA levels tend to return to control levels, even if they still were slightly different from the untreated cells.

Influence of oxidative stress induction on calpain intracellular distribution

As shown in [Fig. 5](#), both μ - and m-calpain localization were modified after H₂O₂ treatment. While a diffuse cytosolic distribution of both enzymes was observed in control cells, oxidative stress tended to trigger a perinuclear translocation of both proteases (white arrows). The level of μ -calpain significantly increased in the H₂O₂ treated cells (determined after signal quantification), confirming the results obtained by Western blot. Furthermore m-calpain appeared in punctate vesicular compartments indicating a possible translocation to intracellular organelles.

Table 2 – Effect of Oligopin[®] on H₂O₂-induced cell death.

	Control		H ₂ O ₂		Oligopin		Oligopin + H ₂ O ₂	
	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
Cell viability (% total)	86.7 [#]	3.2	42.3 [*]	4.8	80 [#]	3.4	55.2 ^{*,#}	3.2
TUNEL (% positive cells)	0.48 [#]	0.12	21.7 [*]	2.7	0.72 [#]	0.2	1.1 [#]	0.12

The cells were pre-incubated with 0.05 mg/mL Oligopin[®] for 1 h before H₂O₂ treatment (1 h, 1 mM). Cell viability and TUNEL analysis were previously described ([Table 1, Fig. 1](#)).

^{*}Significantly different from the control ($P < 0.05$).

[#]Significantly different from the H₂O₂ treated sample ($P < 0.05$).

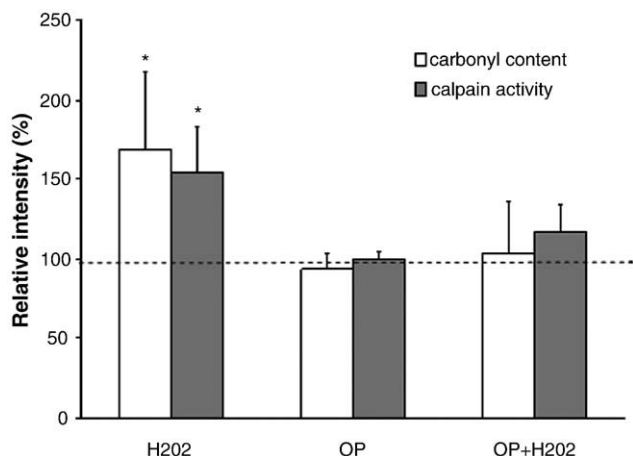


Fig. 6 – Effect of Oligopin® on calpain activity and protein carbonyl content. The cells were pre-incubated with 0.05 mg/mL Oligopin® for 1 h before treatment with 1 mM H₂O₂ for 1 h. Carbonyl content and calpain activity were measured 6 h later as previously described (Figs. 1 and 2). Results are expressed as a percentage of the untreated control cells (dotted line). *Significantly different from the untreated sample ($P < 0.05$).

Effect of a natural antioxidant (Oligopin®) on H₂O₂-induced oxidative damages in LHCN-M2 cells

Oligopin® is a natural antioxidant extracted from French maritime pine bark. Human satellite cells LHCN-M2 were pre-incubated with Oligopin® (0.05 mg/mL) before H₂O₂ treatment, as described in [Materials and methods](#). Data shown in [Table 2](#) indicated that 0.05 mg/mL Oligopin® was not toxic to the cells, the cell viability was not significantly modified in the presence of the antioxidant. More interestingly, a 1 h pre-incubation with the pine bark extract was able to partially restore cell viability ($55.2 \pm 3.2\%$ versus $42.3 \pm 4.8\%$ in the H₂O₂ treated cells), while the H₂O₂-induced apoptotic cell death was completely abolished.

Since Oligopin® had a clear antioxidant potential in our experimental model, we next looked at the effect of the polyphenol extract on protein oxidation and calpain activity. As shown in [Fig. 6](#), addition of Oligopin® to the culture medium was able to protect the cells from H₂O₂ oxidative damage. The carbonyl content was not significantly different from the control. In a similar way, while calpain activity reached $153 \pm 29\%$ in cells treated with H₂O₂, it was not significantly different from the control in cells pre-incubated with the pine bark extract ($117 \pm 17\%$). H₂O₂-induced ATP-synthase degradation was also prevented in Oligopin® treated cells (data not shown).

Discussion

In this paper we show for the first time that oxidative stress is able to activate the calcium-dependent proteolytic system in human myoblasts. These data, together with those previously published on differentiated rat skeletal muscle fibres [\[21\]](#), where we demonstrated calpain activation during ageing, strongly support

the involvement of oxidative stress in the aetiology of sarcopenia through calpain-dependent pathways.

In the present study, we induced an acute intracellular oxidative stress by treating LHCN-M2 human myoblasts with 1 mM H₂O₂. Cell viability was reduced by about 60%, a value comparable to what has been reported in the literature. Experiments carried out on C₂C₁₂ mouse myoblasts, showed a 40% viability using a similar dose of H₂O₂ [\[48\]](#), while in mouse myotubes, Smythe and Rando used between 1 and 4 mM H₂O₂ to obtain significant cell death [\[44\]](#).

Intracellular ROS accumulation is well known to have deleterious effects on proteins, lipids and DNA, eventually leading to apoptosis [\[49,50\]](#). In our experimental model, we measured the level of apoptotic nuclei by TUNEL analysis after H₂O₂ treatment ([Fig. 1A](#)). As expected, the number of TUNEL-positive cells dramatically increased after the induction of oxidative stress, this is in agreement with what has been reported for various cell types [\[51–53\]](#). Oxidative damage was also demonstrated at the protein level via the quantification of carbonyl proteins, which showed a twofold increase after H₂O₂ treatment ([Fig. 1B](#)). Induction of apoptosis by oxidative stress has been shown to be mediated by the p38-MAPK pathway [\[43,54\]](#). We show that H₂O₂ treatment rapidly triggered the activation of p38, as indicated by the high level of the phosphorylated form of the protein ([Fig. 1C](#)).

Interestingly, calpain activity is known to be regulated by MAPK-dependent pathways [\[24,55\]](#) and could therefore be affected by oxidative stress. Strengthening this idea, we were able to partially reverse the H₂O₂-induced cell death by pre-incubating the cells with calpeptin, a potent calpain inhibitor. Cell viability significantly increased by 13%. More strikingly, the same calpeptin pre-treatment was able to completely protect the cells from oxidative stress-induced apoptotic cell death. Altogether, these data reinforce the idea that among the multiple pathways linking oxidative stress to cell death, one probably involves the calcium-dependent proteolytic system. We next measured the calpain-specific activity in living cells after H₂O₂ treatment. Data presented in [Fig. 2](#) unambiguously showed that intracellular ROS accumulation led to calpain activation in human myoblasts. According to some authors, oxidative damage affecting calcium homeostasis-regulating proteins would result in intracellular calcium accumulation [\[56\]](#). In our conditions, we could indeed demonstrate that calcium concentration was significantly higher in H₂O₂-treated myoblasts than in control cells ([Fig. 2](#)). A possible scheme of events could be that oxidative stress elicits calcium accumulation, consequently leading to calpain activation. However, data presented in [Fig. 2](#) show a very similar behaviour of calcium concentration and calpain activity, therefore we are not able to conclude whether the increased calcium concentration precedes calpain activation. In addition to being regulated by calcium concentration, calpain-dependent proteolysis can be modulated by several other factors; i.e. expression level, intracellular localization, phosphorylation [\[18\]](#).

In our experimental conditions, oxidative stress tends to increase the level of μ and m-calpain mRNA after 1 h of treatment ([Fig. 4](#)). This data is consistent with the increase we observed in the amount of both proteases after H₂O₂ addition. However, 4 h after H₂O₂ administration (1 h incubation followed by an additional 3 h without H₂O₂) we could detect a decrease in mRNA levels while the protein concentration remained above control levels. It is well known that calpains are long lived proteins [\[57\]](#).

The oxidative stress-induced up-regulation of the proteases would therefore have a long lasting effect at the protein level, while the transcriptional down-regulation at 3 h after treatment could be a negative feedback in order to shut down this increase in protein accumulation. The exact oxidative stress-induced pathway involved in calpain gene regulation still remains to be identified. In a remarkable way, we were also able to show a specific increase in the activated form of μ -calpain (76 kDa). Since the autolyzed form of m-calpain cannot be detected by Western blot analysis, we could not conclude if there is specific activation of the protease [23]. Altogether these data suggest that oxidative stress is involved both in the up-regulation of calpain expression and its proteolytic activity in our model. Similar data have been observed in chick myotubes and C6 glioma cells [58,59].

In another set of experiments we showed an abnormal cellular localization of the calpains after oxidative stress induction. H_2O_2 administration induced a vesicular and perinuclear localization of the proteases, with a more pronounced effect for m-calpain (Fig. 5). Although calcium-dependent proteases are usually localized in the cytoplasm, they have been shown to translocate to several intracellular domains such as ER endoplasmic reticulum, GA golgi, caveolae and plasma membrane [60,61], where they can be activated. It is interesting to note, that the punctate perinuclear staining shown in Fig. 5 was very similar to the t-BOC-LM-CMAC specific fluorescence depicted in Fig. 2, characteristic of calpain activity. Further experiments will be needed to identify towards which organelle the calpains are translocating following stress induction.

In a previous study, we identified ATP-synthase alpha subunit as a calpain substrate after ionophore treatment in C_2C_{12} muscle cells [47]. Here we show that ATP-synthase alpha subunit, a complex V component of the respiratory chain, was down-regulated by oxidative stress, and that this phenomenon could be mediated in a calpain-dependent way (Fig. 2). This data supports the notion that, in these conditions, calpain activation and abnormal mitochondrial function could be interdependent processes. To strengthen this idea, μ -calpain has been recently identified in the mitochondrial inner membrane [62]. A number of studies have demonstrated that mitochondrial integrity declines as a function of age. Old mitochondria appear to be morphologically altered and produce more oxidants and less ATP [63]. A decrease in the intracellular level of free ATP can favour necrotic cell death associated with a loss of membrane integrity. In our model we detected necrotic cell death by measuring trypan blue exclusion. Interestingly this phenomenon was partially reversed by calpeptin. On the other hand, a moderate decrease in ATP level can trigger apoptosis *via* a mitochondria-dependent pathway [64,65]. Interestingly, calpain activation has been shown to participate to the release of pro-apoptotic factors from mitochondria in the context of sarcopenia [66,67].

Altogether these data clearly demonstrate that oxidative stress is able to induce calpain activation in myoblasts. As a consequence, this enhanced intracellular proteolysis would participate to the necrotic and/or apoptotic satellite cell death which has been observed during muscle ageing [16]. Such a decline in the number of satellite cells may contribute to the age-related loss of muscle mass [68], therefore involving calpain-dependent proteolysis in the development of sarcopenia. To our knowledge it is the first study that has really demonstrated a link between oxidative stress and calcium-dependent proteolysis in human myoblasts. Further-

more we were able to protect the cells from H_2O_2 -induced apoptotic cell death with a natural antioxidant (Table 2). In a very remarkable way, Oligopin[®] treatment significantly prevented the activation of calpains mediated by H_2O_2 (Fig. 6). Increasing the antioxidative potential of satellite cells could help to compensate the age-dependent imbalance of the antioxidant system and thus improve the muscles ability to regenerate and replace damaged fibres in old muscle and to maintain muscle mass.

More experiments are currently being undertaken in order to better characterize the molecular mechanisms involved, and hopefully help us gain insight into the cellular events leading to sarcopenia. A differential proteomic approach is currently being carried out in our laboratory to dissect the molecular events linking oxidative stress to calcium-dependent proteolysis.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the region Aquitaine and from the "Association Française contre les Myopathies" (AFM). The authors acknowledge Dr. Gillian Butler-Browne for proof reading the manuscript; Amélie Pires-Alves, Pierre Lochet and Antoine Graffeuil for their technical assistance.

REFERENCES

- [1] R.N. Baumgartner, K.M. Koehler, D. Gallagher, L. Romero, S.B. Heymsfield, R.R. Ross, P.J. Garry, R.D. Lindeman, Epidemiology of sarcopenia among the elderly in New Mexico, *Am. J. Epidemiol.* 147 (1998) 755–763.
- [2] E. Marzetti, C. Leeuwenburgh, Skeletal muscle apoptosis, sarcopenia and frailty at old age, *Exp. Gerontol.* 41 (2006) 1234–1238.
- [3] S. Fulle, F. Protasi, G. Di Tano, T. Pietrangelo, A. Beltramin, S. Boncompagni, L. Vecchier, G. Fano, The contribution of reactive oxygen species to sarcopenia and muscle ageing, *Exp. Gerontol.* 39 (2004) 17–24.
- [4] A. Mansouri, F.L. Muller, Y. Liu, R. Ng, J. Faulkner, M. Hamilton, A. Richardson, T.T. Huang, C.J. Epstein, H. Van Remmen, Alterations in mitochondrial function, hydrogen peroxide release and oxidative damage in mouse hind-limb skeletal muscle during ageing, *Mech. Ageing. Dev.* 127 (2006) 298–306.
- [5] A. Vasilaki, M. Csete, D. Pye, S. Lee, J. Palomero, F. McArdle, H. Van Remmen, A. Richardson, A. McArdle, J.A. Faulkner, M.J. Jackson, Genetic modification of the manganese superoxide dismutase/glutathione peroxidase 1 pathway influences intracellular ROS generation in quiescent, but not contracting, skeletal muscle cells, *Free Radic. Biol. Med.* 41 (2006) 1719–1725.
- [6] D. Nethery, L.A. Callahan, D. Stofan, R. Mattera, A. DiMarco, G. Supinski, PLA(2) dependence of diaphragm mitochondrial formation of reactive oxygen species, *J. Appl. Physiol.* 89 (2000) 72–80.
- [7] R. Xia, J.A. Webb, L.L. Gnall, K. Cutler, J.J. Abramson, Skeletal muscle sarcoplasmic reticulum contains a NADH-dependent oxidase that generates superoxide, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 285 (2003) 215–221.
- [8] M.C. Cong, S. Arbogast, Z. Guo, J. Mathenia, W. Su, M.B. Reid, Calcium-independent phospholipase A2 modulates cytosolic oxidant activity and contractile function in murine skeletal muscle cells, *J. Appl. Physiol.* 100 (2006) 399–405.
- [9] H. Sauer, M. Wartenberg, Reactive oxygen species as signaling molecules in cardiovascular differentiation of embryonic stem cells and tumor-induced angiogenesis, *Antioxid. Redox. Signal.* 7 (2005) 1423–1434.

- [10] F.L. Muller, W. Song, Y. Liu, A. Chaudhuri, S. Pieke-Dahl, R. Strong, T.T. Huang, C.T. Epstein, L.J. Roberts, M. Csete, J.A. Faulkner, H. Van Remmen, Absence of CuZn superoxide dismutase leads to elevated oxidative stress and acceleration of age-dependent skeletal muscle atrophy, *Free Radic. Biol. Med.* 40 (2006) 1993–2004.
- [11] A. Bokov, A. Chaudhuri, A. Richradson, The role of oxidative damage and stress in aging, *Mech. Aging Dev.* 125 (2004) 811–826.
- [12] K. Fujisawa, Some observations on the skeletal musculature of aged rats. Part 2. Fine morphology of diseased muscle fibres, *J. Neurol. Sci.* 24 (1975) 447–469.
- [13] K. Fujisawa, Some observations on the skeletal musculature of aged rats. I. Histological aspects, *J. Neurol. Sci.* 22 (1974) 353–366.
- [14] A. Barani, A.C. Durieux, O. Sabido, D. Freyssenet, Age-related changes in the mitotic and metabolic characteristics of muscle-derived cells, *J. Appl. Physiol.* 95 (2003) 2089–2098.
- [15] V. Renault, L.E. Thornell, P.O. Eriksson, G. Butler-Browne, V. Mouly, Regenerative potential of human skeletal muscle during aging, *Aging Cell* 1 (2002) 132–139.
- [16] I.M. Conboy, M.J. Conboy, G.M. Smythe, T.A. Rando, Notch-mediated restoration of regenerative potential to aged muscle, *Science* 302 (2003) 1575–1577.
- [17] S. Machida, F.W. Booth, Increased nuclear proteins in muscle satellite cells in aged animals as compared to young growing animals, *Exp. Gerontol.* 39 (2004) 1521–1525.
- [18] E. Dargelos, C. Brule, L. Combaret, A. Hadj-Sassi, S. Dulong, S. Poussard, P. Cottin, Involvement of the calcium-dependent proteolytic system in skeletal muscle ageing, *Exp. Gerontol.* 42 (2007) 1088–1098.
- [19] G. Cherednichenko, A.V. Zima, W. Feng, S. Schaefer, L.A. Blatter, I.N. Pessah, NADH oxidase activity of rat cardiac sarcoplasmic reticulum regulates calcium-induced calcium-release, *Circ. Res.* 94 (2004) 478–486.
- [20] B. Fraysse, J.F. Desaphy, J.F. Rolland, S. Pierno, A. Liantonio, V. Giannuzzi, C. Camerino, M.P. Didonna, D. Cocchi, A. De Luca, D. Conte Camerino, Fibre type-related changes in rat skeletal muscle calcium homeostasis during ageing and restoration by growth hormone, *Neurobiol. Dis.* 21 (2006) 372–380.
- [21] E. Dargelos, S. Poussard, C. Brule, L. Daury, P. Cottin, Calcium-dependent proteolytic system and muscle dysfunctions: a possible role of calpains in sarcopenia, *Biochimie* 90 (2008) 359–368.
- [22] D.E. Goll, V.F. Thompson, H. Li, W. Wei, J. Cong, The calpain system, *Physiol. Rev.* 83 (2003) 731–801.
- [23] P. Cottin, V.F. Thompson, S.K. Sathe, A. Szpacenko, D.E. Goll, Autolysis of mu- and m-calpain from bovine skeletal muscle, *Biol. Chem.* 382 (2001) 767–776.
- [24] A. Glading, R.J. Bodnar, I.J. Reynolds, H. Shihara, L. Satish, D.A. Potter, H.C. Blair, A. Wells, Epidermal growth factor activates m-calpain (calpain II), at least in part, by extracellular signal-mediated phosphorylation, *Mol. Cell. Biol.* 24 (2004) 2499–2512.
- [25] T. Moldoveanu, C.M. Hosfield, D. Lim, J.S. Elce, Z. Jia, P.L. Davies, A Ca(2+) switch aligns the active site of calpain, *Cell* 108 (2002) 649–660.
- [26] B. Aragon, S. Poussard, S. Dulong, K. Touyarot, E. Dargelos, J.J. Brustis, D. Levieux, A. Ducastaing, P. Cottin, Protein kinase C alpha is a calpain target in cultured embryonic muscle cells, *Mol. Cell. Biochem.* 231 (2002) 97–106.
- [27] S. Dedieu, S. Poussard, G. Mazères, F. Grise, E. Dargelos, P. Cottin, J.J. Brustis, Myoblast migration is regulated by calpain through its involvement in cell attachment and cytoskeletal organization, *Exp. Cell Res.* 292 (2004) 187–200.
- [28] M.C. Lebart, Y. Benyamin, Calpain involvement in the remodeling of cytoskeletal anchorage complexes, *FEBS J.* 273 (2006) 3415–3426.
- [29] G. Mazeret, L. Leloup, L. Daury, P. Cottin, J.J. Brustis, Myoblast attachment and spreading are regulated by different patterns of ubiquitous calpains, *Cell Motil. Cytoskeleton* 63 (2006) 193–207.
- [30] F. Raynaud, G. Carnac, A. Marcilhac, Y. Benyamin, m-Calpain implication in cell cycle during muscle precursor cell activation, *Exp. Cell Res.* 298 (2004) 48–57.
- [31] S. Dulong, S. Goudenege, K. Vuillier-Devillers, S. Manenti, S. Poussard, P. Cottin, Myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) is involved in myoblast fusion through its regulation by protein kinase Calpha and calpain proteolytic cleavage, *Biochem. J.* 382 (2004) 1015–1023.
- [32] K. Blomgren, C. Zhu, X. Wang, J.O. Karlsson, A.L. Leverin, B.A. Bahr, C. Mallard, H. Hagberg, Synergistic activation of caspase-3 by m-calpain after neonatal hypoxia-ischemia: a mechanism of “pathological apoptosis”? *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 10191–10198.
- [33] S. Gil-Parrado, A. Fernandez-Montalvan, I. Assfalg-Machleidt, O. Popp, F. Bestvater, A. Holloschi, T.A. Knoch, E.A. Auerswald, K. Welsh, J.C. Reed, H. Fritz, P. Fuentes-Prior, E. Spiess, G.S. Salvesen, W. Machleidt, Ionomycin-activated calpain triggers apoptosis. A probable role for Bcl-2 family members, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 27217–27226.
- [34] F. Raynaud, A. Marcilhac, Implication of calpain in neuronal apoptosis. A possible regulation of Alzheimer's disease, *FEBS J.* 273 (2006) 3437–3443.
- [35] J.G. Tidball, M.J. Spencer, Calpains and muscular dystrophies, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 32 (2000) 1–5.
- [36] S.S. Jejurikar, E.A. Henkelman, P.S. Cederna, C.L. Marcelo, M.G. Urbanek, W.M. Kuzon, Aging increases the susceptibility of skeletal muscle derived satellite cells to apoptosis, *Exp. Gerontol.* 41 (2006) 828–836.
- [37] V. Mouly, A. Aamiri, A. Bigot, R.N. Cooper, S. Di Donna, D. Furling, T. Gidaro, V. Jacquemin, K. Mamchaoui, E. Negroni, S. Perie, V. Renault, S.D. Silva-Barbosa, G.S. Butler-Browne, The mitotic clock in skeletal muscle regeneration, disease and cell mediated gene therapy, *Acta Physiol. Scand.* 184 (2005) 3–15.
- [38] P. Cottin, J.J. Brustis, S. Poussard, N. Elamrani, S. Broncard, A. Ducastaing, Ca(2+)-dependent proteinases (calpains) and muscle cell differentiation, *Biochim. Biophys. Acta* 1223 (1994) 170–178.
- [39] C.H. Zhu, V. Mouly, R.N. Cooper, K. Mamchaoui, A. Bigot, J.W. Shay, J.P. Di Santo, G.S. Butler-Browne, W.E. Wright, Cellular senescence in human myoblasts is overcome by human telomerase reverse transcriptase and cyclin-dependent kinase 4: consequences in ageing muscle and therapeutic strategies for muscular dystrophies, *Aging Cell* 6 (2007) 515–523.
- [40] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [41] B.G. Rosser, S.P. Powers, G.J. Gores, Calpain activity increases in hepatocytes following addition of ATP. Demonstration by a novel fluorescent approach, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 23593–23600.
- [42] R.L. Levine, J.A. Williams, E.R. Stadtman, E. Shacter, Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins, *Methods Enzymol.* 233 (1994) 346–357.
- [43] E. Kefaloyianni, C. Gaitanaki, I. Beis, ERK1/2 and p38-MAPK signalling pathways, through MSK1, are involved in NF- κ B transactivation during oxidative stress in skeletal myoblasts, *Cell Signal.* 18 (2006) 2238–2251.
- [44] G.M. Smythe, T.A. Rando, Altered caveolin-3 expression disrupts PI(3) kinase signalling leading to death of cultured muscle cells, *Exp. Cell Res.* 312 (2006) 2816–2825.
- [45] A. Dasari, J.N. Bartholomew, D. Volonte, F. Galbiati, Oxidative stress induces premature senescence by stimulating caveolin-1 gene transcription through p38 mitogen-activated protein kinase/sp1-mediated activation of two GC-rich promoter elements, *Cancer Res.* 66 (2006) 10805–10814.
- [46] A.J. Dirks, T. Hofer, E. Marzetti, M. Pahor, C. Leeuwenburgh, Mitochondrial DNA mutations, energy metabolism and apoptosis in aging muscle, *Ageing Res. Rev.* 5 (2006) 179–195.
- [47] S. Goudenege, E. Dargelos, S. Claverol, M. Bonneau, P. Cottin, S.

- Poussard, Comparative proteomic analysis of myotube caveolae after milli-calpain deregulation, *Proteomics* 7 (2007) 3289–3298.
- [48] H. Nishida, H. Ichikawa, T. Konishi, Shengmai-san enhances antioxidant potential in C₂C₁₂ myoblasts through the induction of intracellular glutathione peroxidase, *J. Pharmacol. Sci.* 105 (2007) 342–352.
- [49] S. Raha, B.H. Robinson, Mitochondria, oxygen free radicals, and apoptosis, *Am. J. Med. Genet.* 106 (2001) 62–70.
- [50] G.C. Kujoth, A. Hiona, T.D. Pugh, S. Someya, K. Panzer, S.E. Wohlgemuth, T. Hofer, A.Y. Seo, R. Sullivan, W.A. Jobling, J.D. Morrow, H. VanRemmen, J.M. Sedivy, T. Yamasoba, M. Tanokura, R. Weindruch, C. Leeuwenburgh, T.A. Prolla, Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian ageing, *Science* 309 (2005) 481–484.
- [51] T. Moriue, J. Igarashi, K. Yoneda, K. Nakai, H. Kosaka, Y. Kubota, Sphingosine 1-phosphate attenuates H₂O₂-induced apoptosis in endothelial cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 368 (2008) 852–857.
- [52] K.R. Brunt, K.K. Fenrich, G. Kiani, M.Y. Tse, S.C. Pang, C.A. Ward, L.G. Melo, Protection of human vascular smooth muscle cells from H₂O₂-induced apoptosis through functional codependence between HO-1 and AKT, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26 (2006) 2027–2034.
- [53] H.J. Lin, X. Wang, K.M. Shaffer, C.Y. Sasaki, W. Ma, Characterization of H₂O₂-induced acute apoptosis in cultured neural stem/progenitor cells, *FEBS Lett.* 570 (2004) 102–106.
- [54] T. Finkel, N.J. Holbrook, Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing, *Nature* 408 (2000) 239–247.
- [55] H. Shiraha, A. Glading, J. Chou, Z. Jia, A. Wells, Activation of m-calpain (calpain II) by epidermal growth factor is limited by protein kinase A phosphorylation of m-calpain, *Mol. Cell. Biol.* 22 (2002) 2716–2727.
- [56] S.K. Powers, A.N. Kavazis, J.M. McClung, Oxidative stress and disuse muscle atrophy, *J. Appl. Physiol.* 102 (2007) 2389–2397.
- [57] W. Zhang, R.D. Lane, R.L. Mellgren, The major calpain isozymes are long-lived proteins. Design of an antisense strategy for calpain depletion in cultured cells, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 18825–18830.
- [58] K. Nakashima, S. Masaki, M. Yamazaki, H. Abe, Cysteine suppresses oxidative stress-induced myofibrillar proteolysis in chick myotubes, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68 (2004) 2326–2331.
- [59] S.K. Ray, G.G. Wilford, C.V. Crosby, E.L. Hogan, N.L. Banik, Diverse stimuli induce calpain overexpression and apoptosis in C6 glioma cells, *Brain Res.* 829 (1999) 18–27.
- [60] J.L. Hood, W.H. Brooks, T.L. Roszman, Subcellular mobility of the calpain/calpastatin network: an organelle transient, *Bioessays* 28 (2006) 850–859.
- [61] S. Goudenege, S. Poussard, S. Dulong, P. Cottin, Biologically active milli-calpain associated with caveolae is involved in a spatially compartmentalised signalling involving protein kinase C alpha and myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS), *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 37 (2005) 1900–1910.
- [62] P. Kar, T. Chakraborti, K. Samanta, S. Chakraborti, Submitochondrial localization of associated μ -calpain and calpastatin, *Arch. Biochem. Biophys.* 470 (2008) 176–186.
- [63] M.K. Shigenaga, T.M. Hagen, B.N. Ames, Oxidative damage and mitochondrial decay in ageing, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91 (1994) 10771–10778.
- [64] D.S. Izyumov, A.V. Avetisyan, O.Y. Pletjushkina, D.V. Sakharov, K.W. Wirtz, B.V. Chernyak, V.P. Skulachev, “Wages of fear”: transient threefold decrease in intracellular ATP level imposes apoptosis, *Biochim. Biophys. Acta* 1658 (2004) 141–147.
- [65] M. Comelli, F. Di Pancrazio, I. Mavelli, Apoptosis is induced by decline of mitochondrial ATP synthesis in erythroleukemia cells, *Free Rad. Biol. Med.* 34 (2003) 1190–1199.
- [66] A.J. Dirks, C. Leeuwenburgh, Ageing and longlife caloric restriction result in adaptations of skeletal muscle apoptosis repressor, apoptosis inducing factor, X-linked inhibitor of apoptosis, caspase-3, and caspase-12, *Free Rad. Biol. Med.* 36 (2004) 27–39.
- [67] E.E. Dupont-Versteegden, Apoptosis in muscle atrophy: relevance to sarcopenia, *Exp. Gerontol.* 40 (2005) 473–481.
- [68] L.B. Verdijk, R. Koopman, G. Schaart, K. Meijer, H.H. Savelberg, W.K. Wodzig, P. Dendale, L.J. Van Loon, Satellite cells content is specifically reduced in type II skeletal fibers in the elderly, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 292 (2007) 151–157.

Conclusion et **Perspectives**

La sarcopénie ou perte involontaire progressive de la masse musculaire chez le sujet âgé s'accompagne de l'altération de nombreux phénomènes physiologiques comparables à ceux observés chez les myopathes. Le processus de régénération est très ralenti, les activités protéolytiques intracellulaires sont modifiées et de nombreuses fonctions cellulaires sont perturbées en raison d'un stress oxydant incontrôlé. L'intervention des calpaïnes dans les processus associés au développement, à la régénération et à l'intégrité du tissu musculaire est incontestable. Les calpaïnes apparaissent, en effet, comme des acteurs clefs des voies de transductions liées à la myogenèse, la prolifération, la survie cellulaire et le stress oxydant. Toutefois, aucune étude permettant d'établir la relation vieillissement du tissu musculaire-activité des calpaïnes n'avait été entreprise à ce jour. C'est dans ce contexte que les travaux présentés dans ce manuscrit ont été initiés. Ces travaux avaient pour premier objectif de faire un inventaire des signaux prosarcopéniques impliquant les calpaïnes dans le muscle squelettique de rat. Dans un deuxième temps, et étant donné l'importance du stress oxydant dans l'établissement de la sarcopénie et l'incidence de ce dernier sur l'homéostasie calcique, il nous a paru intéressant d'initier une étude sur le stress oxydant et les calpaïnes. Cette étude a été réalisée sur des cellules satellites humaines en culture *in vitro*.

Evolution et rôle du système protéolytique neutre calcium-dépendant durant le vieillissement du muscle squelettique

Lors d'une première étude nous avons pu mettre en évidence une augmentation significative de l'expression et de l'activité des calpaïnes ubiquitaires durant le vieillissement musculaire chez le rat. Parallèlement, l'expression et l'activité de leur inhibiteur endogène, la calpastatine sont sensiblement diminuées. Ces résultats indiquent que le vieillissement musculaire s'accompagne de l'augmentation de la protéolyse neutre calcium-dépendante. Ces résultats viennent confirmer les résultats obtenus sur le muscle cardiaque et squelettique par Johnson et Hammer en 1993 et sur des érythrocytes humains par Scharwz-Benmeir et collaborateurs en 1994.

Ce travail ayant été réalisé sur des muscles de pattes arrières de rats jeunes et vieux (3 et 24 mois respectivement), il ne nous permettait pas d'étudier la phase de vieillissement à proprement parler. Afin d'être plus fin dans notre analyse, des muscles de rats de 10 mois

(stade adulte) ont donc été inclus dans les expérimentations. Nous avons alors entamé l'identification des protéines clés (substrats ou régulateurs) interagissant avec les calpaïnes au cours de l'âge grâce à des expériences d'immunoprécipitation couplées à une analyse protéomique. Parmi les protéines identifiées, certaines sont localisées dans la mitochondrie (la sous unité α de l'ATP synthase), dans le réticulum sarcoplasmique (une calcium ATPase :Serca1, le récepteur à la ryanodyne et la calséquestrine), dans le sarcomère (la nebuline, l' α -actinine 3 et la chaîne lourde de la myosine) ou au niveau membranaire (la dysferline). Il est à noter que toutes ces protéines participent à des processus physiologiques fortement altérés lors de la sarcopénie (régulation de l'homéostasie calcique, maintien de l'intégrité du tissu musculaire et production d'énergie). Ces résultats ont été confirmés par des co-immunoprécipitations inverses et des colocalisations cellulaires observées en microscopie confocale. De plus, le récepteur à la ryanodyne 1, la sous-unité α de l'ATP synthase et l' α -actinine 3 ont aussi été identifiés comme des substrats des calpaïnes *in vitro*

Des études réalisées précédemment et montrant une interaction et une localisation des calpaïnes au niveau des mitochondries (Kar *et al.*, 2008 ; Badugu *et al.*, 2008) confortent la mise en évidence de l'interaction des calpaïnes avec la sous-unité α de l'ATP synthase. La mitochondrie, de par sa fonction de fournisseur principal d'énergie, est très importante au bon fonctionnement du muscle squelettique. Cependant, au cours de l'âge, une augmentation de la concentration myoplasmique en Ca^{2+} entraînerait une augmentation de sa capture par la mitochondrie, ce mécanisme entraînant la mort cellulaire (Chabi *et al.*, 2008). Parallèlement, une baisse de l'activité de la chaîne de transport d'électrons (Hagen *et al.*, 2004) et de la synthèse d'ATP (Drew *et al.*, 2003) ont été mises en évidence au cours du vieillissement. Le fait que la sous-unité α soit un substrat des calpaïnes suggère une possible implication des protéases dans la régulation du bon fonctionnement mitochondrial durant le vieillissement musculaire conduisant à la mort cellulaire.

L'identification de l' α -actinine 3 parmi les protéines interagissant avec les calpaïnes, ainsi que la confirmation de sa dégradation par les protéases *in vitro*, renforcent la localisation et le rôle important des calpaïnes au niveau de la strie Z (Raynaud *et al.*, 2005, Walker *et al.*, 2008). Par ailleurs, nous avons pu montrer une diminution du niveau d'expression de l' α -actinine 3 au cours du vieillissement musculaire (résultat non présenté). L'ensemble de ces résultats suggère que l'activité protéolytique des calpaïnes sur l' α -actinine 3 pourrait diminuer sa capacité de liaison à l'actine et désorganiser l'intégrité du sarcomère. Les

calpaïnes pourraient alors être impliquées dans le défaut de contraction du sarcomère observé durant l'âge (Weisdeler & Ma, 2008).

Nos résultats couplés aux observations faites dans d'autres études mettent en évidence un lien fort entre les calpaïnes et le sarcomère. En effet, des études ont montré l'intervention des calpaïnes dans l'initiation de la dégradation de plusieurs protéines sarcomériques en amont du protéasome dans diverses atrophies musculaires (Solomon & Goldbert, 1996 ; Huang & Forsberg, 1998 ; Solomon et al., 1998). Les calpaïnes pourraient donc également être à l'origine de la perte de masse musculaire observée lors du vieillissement en provoquant une protéolyse accrue des protéines de structure.

Le relargage du calcium dans le sarcoplasme au niveau de Ryr1 est également indispensable au couplage excitation/contraction (Bellinger *et al.*, 2008). Il a déjà été montré un clivage de Ryr 1 par la calpaïne 3 (Shevchenko *et al.*, 1998), et l'interaction entre Ryr 1 et les calpaïnes ubiquitaire est un résultat qui doit être approfondi afin de mieux définir le rôle exact des calpaïnes dans la régulation calcique.

Par ailleurs une dérégulation de Ryr1 peut entraîner l'apoptose (Hajnoczky *et al.*, 2000). Ainsi, la dérégulation de Ryr 1 par les calpaïnes pourrait entraîner une augmentation de Ca^{2+} sarcoplasmique conduisant aux dommages cellulaires observés dans le muscle âgé (Gommans *et al.*, 2002).

Une autre conséquence de cette interaction serait de positionner les calpaïnes à proximité des flux de calcium favorables à leur activation.

Ces hypothèses suggèrent que les calpaïnes pourraient jouer un rôle dans le couplage excitation/contraction, entraînant une diminution de la résistance à l'effort (Bellinger *et al.*, 2008) durant la sarcopénie. La dégradation de Ryr1 et la désorganisation du sarcomère pourraient également être deux éléments déclencheurs de la signalisation conduisant à la mort cellulaire.

Perspectives

✓ *La confirmation de l'interaction existant entre les deux calpaïnes ubiquitaires et certaines des autres protéines identifiées dans cette étude constituerait une première étape dans la continuité de ce travail. Des protéines comme la nebuline, la dysferline, la calsequestrine pourraient être étudiées pour mieux définir les mécanismes calpaïno-*

dépendants agissant lors du vieillissement musculaire. Parmi celles-ci, la dysferline semble particulièrement intéressante. Cette dernière est impliquée dans la réparation membranaire (Han & Campbell, 2007) et est indispensable à la résistance de la cellule musculaire vis-à-vis du stress mécanique. De plus elle est connue pour interagir avec la calpaïne 3 (Anderson et al., 2000) et des dysferlinopathies d'origine génétique conduisent à de sévères myopathies (Urtizberea et al., 2008).

✓ Dans les expériences de colocalisation par microscopie confocale, nous avons utilisé des coupes transversales de fibres musculaires afin de confirmer *in vivo* les interactions entre les calpaïnes et leurs partenaires potentiels. Mais ces observations ne nous ont pas permis de localiser précisément les sites d'interaction. L'utilisation de coupes longitudinales couplée à l'utilisation de marqueurs d'organites intracellulaires pourrait nous renseigner plus en détails sur la localisation subcellulaire des calpaïnes et de leurs partenaires et serait un bon moyen de compléter ce travail.

✓ Les résultats obtenus dans cette étude semblent indiquer que la m-calpaïne pourrait réguler l'ATP synthase au cours du vieillissement musculaire. D'après des données récentes, seule la μ -calpaïne a été clairement localisée au niveau de la membrane interne des mitochondries (Kar et al., 2008). Cependant, des travaux réalisés au laboratoire ont mis en évidence une interaction entre la milli-calpaïne et la sous unité α de l'ATP synthase au niveau des cavéoles (Goudenège et al., 2007). De plus, les cavéoles présentent de nombreuses interactions avec les mitochondries. Il serait donc intéressant dans ce contexte de déterminer la localisation exacte de l'interaction entre la m-calpaïne et la sous-unité α de l'ATP synthase afin de pouvoir émettre des hypothèses quant à la fonctionnalité de cette interaction. Des expériences de fractionnement cellulaire, complétées par des colocalisations en microscopie confocale permettraient vraisemblablement de répondre à cette question.

✓ Un dosage de la concentration en ATP intracellulaire sur des myotubes en condition de stress après inhibition ou suractivation des calpaïnes nous permettrait de confirmer le rôle de ces dernières dans la mise en place d'un déficit énergétique.

Augmentation de la protéolyse neutre calcium-dépendante dans des myoblastes humains après induction d'un stress oxydant

Les évènements cellulaires conduisant à la régénération musculaire sont étroitement liés à la fonctionnalité des cellules satellites, à savoir leur prolifération, migration et fusion avec des fibres matures endommagées. Des travaux antécédents ont mis en évidence que l'activité des calpaïnes jouait un rôle important dans les évènements associés à la régénération (prolifération, migration, fusion). L'apoptose induite par un stress oxydant serait en partie responsable de la dégénérescence des cellules satellites au cours de l'âge. Les calpaïnes pourraient être impliquées dans ce processus et l'objectif de cette étude était de définir l'incidence du stress oxydant sur la régulation de ces protéases. Des cellules myoblastiques humaines, les LHCN-M2 ont été utilisées comme modèle.

Ainsi, nous avons montré qu'un stress oxydant entraîne une augmentation de l'activité et de l'expression des calpaïnes au cours de la prolifération des cellules satellites humaines de façon corrélée à une augmentation de l'apoptose. Cette activation pourrait donc contribuer à la diminution du nombre de cellules satellites observée lors de la sarcopénie, tout ceci contribuant à la perte de la masse musculaire (Verdijk *et al.*, 2007). L'induction de l'apoptose par un stress oxydant est médiée par la voie p38-MAPK (Kefaloyianni *et al.*, 2006). Ce résultat a été confirmé dans notre étude, le traitement à l'eau oxygénée conduit à l'augmentation du niveau de forme active (phosphorylée) de la p38. Il est intéressant de noter que les calpaïnes sont également régulées par des cascades de phosphorylation médiées par des MAPK (Glading *et al.*, 2004).

Notre étude montre qu'un stress oxydant possède également la capacité d'activer les calpaïnes et qu'un inhibiteur des calpaïnes (la calpeptine) permet de prévenir de l'apoptose induite par l'eau oxygénée. Ces résultats suggèrent donc que parmi les nombreuses voies conduisant à l'apoptose, une implique probablement les calpaïnes.

Le stress oxydant entraîne également une augmentation de la concentration calcique intracellulaire qui pourrait être responsable de la sur-activation des calpaïnes. Cette hypothèse est à nuancer car les calpaïnes peuvent être régulées par une pléiade d'autres facteurs tels que leur localisation, leur niveau d'expression, leur état de phosphorylation (Goll *et al.*, 2003)...

Mais nous avons également observé que le stress oxydant entraîne la relocalisation des calpaïnes de façon périnucléaire et vésiculaire. En revanche, des études complémentaires (expériences de fractionnement, co-localisation avec des marqueurs) doivent être mises en place afin de déterminer vers quels organelles précisément les calpaïnes sont transloquées en condition de stress oxydant. Une des pistes probables de relocalisation des calpaïnes serait la mitochondrie. En effet, la dégradation calpaïno-dépendante lors du stress oxydant de la sous unité α de l'ATP synthase, pourrait en partie indiquer une relocalisation mitochondriale des calpaïnes et donc expliquer la baisse de fonction de la mitochondrie entraînant l'induction de l'apoptose lors de la sarcopénie. Par ailleurs, les calpaïnes pourraient être impliquées dans le déclenchement de l'apoptose *via* le relargage par la mitochondrie de facteurs pro-apoptotiques lors de la sarcopénie (Dupont-Versteegden, 2005).

Enfin nous avons observé qu'un traitement préventif par un antioxydant naturel extrait d'écorce de pin (Oligopin®) permettait de réduire les effets de l'eau oxygénée sur la viabilité cellulaire et de bloquer complètement l'induction de l'apoptose. Ce même antioxydant prévient également l'activation des calpaïnes par l'eau oxygénée, protégeant ainsi la cellule des phénomènes de protéolyse anarchique entraînant la nécrose et/ou l'apoptose.

Perspectives

✓ *L'ensemble des résultats que nous avons obtenus tend à montrer que l'induction d'un stress oxydant dans les cellules satellites humaines conduit à la mise en place de l'apoptose via des mécanismes impliquant les calpaïnes. L'étude de l'activité des caspases effectrices (et plus précisément les caspases 3, 6 et 7), nous permettrait de déterminer la voie d'induction de l'apoptose impliquée ici.*

Cet aspect pourrait d'ailleurs être vérifié en sous/suractivant les calpaïnes dans des myoblastes humains et en focalisant notre attention sur des facteurs pro-apoptotiques relâchés par la mitochondrie (par exemple l'AIF ou le cytochrome C). La quantification du ratio Bax/Bcl2 en conditions de stress après inhibition des calpaïnes avec des siRNA pourrait aussi être envisagée.

✓ *En revanche, des études complémentaires doivent être menées afin de définir les mécanismes d'action de l'Oligopin® sur les calpaïnes. Des expérimentations en présence d'Oligopin® après induction d'un stress avec de l'eau oxygénée en présence ou non*

d'inhibiteurs spécifiques des calpaïnes permettrait de donner un élément de réponse sur les voies calpaïno-dépendantes ciblées par cet antioxydant.

✓ Pour compléter l'étude des calpaïnes sur ces myoblastes humains, une étude protéomique a été initiée afin de définir des cibles des calpaïnes en condition de stress oxydant. Divers traitements (eau oxygénée, calpeptine, Oligopin®...) ont été testés et l'identification des protéines dont l'expression est susceptible d'être calpaïno-dépendante et/ou Oligopin® -dépendante est en cours. A partir de là, il serait intéressant de situer les calpaïnes dans les cascades de signalisation du stress oxydant et ainsi de définir des points clés de ces dernières afin de lutter contre la sarcopénie.

✓ Une approche nutritionnelle basée sur l'apport d'Oligopin dans le contexte de la sarcopénie pourra aussi être envisagée.

✓ Il serait aussi intéressant de tester d'autres antioxydants connus pour prévenir du vieillissement tel le resveratrol

Enfin en perspective générale, il serait particulièrement intéressant de reproduire l'ensemble de ces expériences sur des cellules en différenciation après induction d'un stress oxydant. Dans le même temps l'inhibition/suractivation des calpaïnes et/ou de leurs partenaires permettrait de disséquer les mécanismes moléculaires impliquant les calpaïnes dans la mise en place de la sarcopénie.

La simulation d'un vieillissement répliatif (Bigot et al., 2008) sur les cellules satellites constituerait un modèle complémentaire à celui du stress oxydant et donnerait probablement des réponses quant à l'implication des calpaïnes dans les dysfonctionnements des phénomènes régénératifs associés au vieillissement.

En conclusion, l'ensemble de ce travail a permis de mettre en évidence le rôle crucial des calpaïnes dans les phénomènes moléculaires impliqués dans le développement du vieillissement musculaire. Tous ces mécanismes ont été intégrés dans la figure 24.

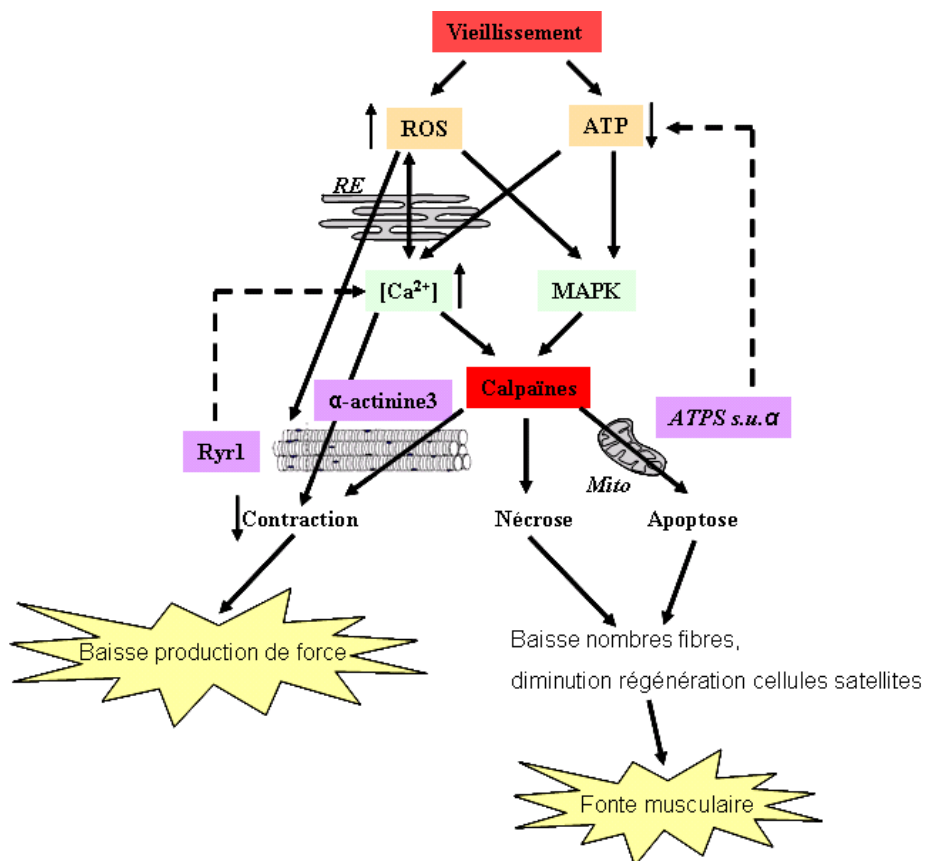


Figure 24 : Modèle récapitulatif des différents résultats et hypothèses émises au cours de cette étude

Références bibliographiques

- A -

- Alderton, J.M., Steinhardt, R.A., 2000. Calcium influx through calcium leak channels is responsible for the elevated levels of calcium-dependent proteolysis in dystrophic myotubes. *J Biol Chem* 275, 9452-9460.
- Alison, M.R., Sarraf, C.E., 1992. Apoptosis: a gene-directed programme of cell death. *J R Coll Physicians Lond* 26, 25-35.
- Anderson, L.V., Harrison, R.M., Pogue, R., Vafiadaki, E., Pollitt, C., Davison, K., Moss, J.A., Keers, S., Pyle, A., Shaw, P.J., Mahjneh, I., Argov, Z., Greenberg, C.R., Wrogemann, K., Bertorini, T., Goebel, H.H., Beckmann, J.S., Bashir, R., Bushby, K.M., 2000. Secondary reduction in calpain 3 expression in patients with limb girdle muscular dystrophy type 2B and Miyoshi myopathy (primary dysferlinopathies). *Neuromuscul Disord* 10, 553-559.
- Andrade, F.H., Reid, M.B., Westerblad, H., 2001. Contractile response of skeletal muscle to low peroxide concentrations: myofibrillar calcium sensitivity as a likely target for redox-modulation. *Faseb J* 15, 309-311.
- Andresen, K., Tom, T.D., Strand, M., 1991. Characterization of cDNA clones encoding a novel calcium-activated neutral proteinase from *Schistosoma mansoni*. *J Biol Chem* 266, 15085-15090.
- Arber, S., Halder, G., Caroni, P., 1994. Muscle LIM protein, a novel essential regulator of myogenesis, promotes myogenic differentiation. *Cell* 79, 221-231.
- Atchley, W.R., Fitch, W.M., Bronner-Fraser, M., 1994. Molecular evolution of the MyoD family of transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 11522-11526.
- Attaix, D., Ventadour, S., Codran, A., Bechet, D., Taillandier, D., Combaret, L., 2005. The ubiquitin-proteasome system and skeletal muscle wasting. *Essays Biochem* 41, 173-186.
- Averna, M., De Tullio, R., Capini, P., Salamino, F., Pontremoli, S., Melloni, E., 2003. Changes in calpastatin localization and expression during calpain activation: a new mechanism for the regulation of intracellular Ca(2+)-dependent proteolysis. *Cell Mol Life Sci* 60, 2669-2678.
- 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, 25-30.
- Averna, M., De Tullio, R., Salamino, F., Melloni, E., Pontremoli, S., 1999. Phosphorylation of rat brain calpastatins by protein kinase C. *FEBS Lett* 450, 13-16.

- B -

- Babcock, G.G., Fowler, V.M., 1994. Isoform-specific interaction of tropomodulin with skeletal muscle and erythrocyte tropomyosins. *J Biol Chem* 269, 27510-27518.
- Badugu, R., Garcia, M., Bondada, V., Joshi, A., Geddes, J.W., 2008. N terminus of calpain 1 is a mitochondrial targeting sequence. *J Biol Chem* 283, 3409-3417.
- Balcerzak, D., Cottin, P., Poussard, S., Cucuron, A., Brustis, J.J., Ducastaing, A., 1998. Calpastatin-modulation of m-calpain activity is required for myoblast fusion. *Eur J Cell Biol* 75, 247-253.
- Balcerzak, D., Poussard, S., Brustis, J.J., 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), 2077-2082.
- Baldwin, K.M., Haddad, F., 2002. Skeletal muscle plasticity: cellular and molecular responses to altered physical activity paradigms. *Am J Phys Med Rehabil* 81, S40-51.
- Bansal, D., Campbell, K.P., 2004. Dysferlin and the plasma membrane repair in muscular dystrophy. *Trends Cell Biol* 14, 206-213.
- Barani, A.E., Durieux, A.C., Sabido, O., Freyssenet, D., 2003. Age-related changes in the mitotic and metabolic characteristics of muscle-derived cells. *J Appl Physiol* 95, 2089-2098.
- Barnoy, S., Kosower, N.S., 2003. Caspase-1-induced calpastatin degradation in myoblast differentiation and fusion: cross-talk between the caspase and calpain systems. *FEBS Lett* 546, 213-217.
- Barnoy, S., Maki, M., Kosower, N.S., 2005. Overexpression of calpastatin inhibits L8 myoblast fusion. *Biochem Biophys Res Commun* 332, 697-701.
- Bartoli, M., Richard, I., 2005. Calpains in muscle wasting. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 2115-2133.
- Bashir, R., Britton, S., Strachan, T., Keers, S., Vafiadaki, E., Lako, M., Richard, I., Marchand, S., Bourg, N., Argov, Z., Sadeh, M., Mahjneh, I., Marconi, G., Passos-Bueno, M.R., Moreira Ede, S., Zatz, M., Beckmann, J.S., Bushby, K., 1998. A gene related to *Caenorhabditis elegans* spermatogenesis factor *fer-1* is mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 2B. *Nat Genet* 20, 37-42.
- Baumgartner, R.N., Koehler, K.M., Gallagher, D., Romero, L., Heymsfield, S.B., Ross, R.R., Garry, P.J., Lindeman, R.D., 1998. Epidemiology of sarcopenia among the elderly in New Mexico. *Am J Epidemiol* 147, 755-763.

- Bayne, A.C., Mockett, R.J., Orr, W.C., Sohal, R.S., 2005. Enhanced catabolism of mitochondrial superoxide/hydrogen peroxide and aging in transgenic *Drosophila*. *Biochem J* 391, 277-284.
- Beauchamp, J.R., Heslop, L., Yu, D.S., Tajbakhsh, S., Kelly, R.G., Wernig, A., Buckingham, M.E., Partridge, T.A., Zammit, P.S., 2000. Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. *J Cell Biol* 151, 1221-1234.
- Beausejour, C.M., Krtolica, A., Galimi, F., Narita, M., Lowe, S.W., Yaswen, P., Campisi, J., 2003. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *Embo J* 22, 4212-4222.
- Bechet, D., Tassa, A., Taillandier, D., Combaret, L., Attaix, D., 2005. Lysosomal proteolysis in skeletal muscle. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 2098-2114.
- Beckman, K.B., Ames, B.N., 1998. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 78, 547-581.
- Beckmann, J.S., Spencer, M., 2008. Calpain 3, the "gatekeeper" of proper sarcomere assembly, turnover and maintenance. *Neuromuscul Disord* 18, 913-921.
- Beere, H.M., 2004. "The stress of dying": the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *J Cell Sci* 117, 2641-2651.
- Bejma, J., Ji, L.L., 1999. Aging and acute exercise enhance free radical generation in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol* 87, 465-470.
- Bellinger, A.M., Reiken, S., Dura, M., Murphy, P.W., Deng, S.X., Landry, D.W., Nieman, D., Lehnart, S.E., Samaru, M., LaCampagne, A., Marks, A.R., 2008. Remodeling of ryanodine receptor complex causes "leaky" channels: a molecular mechanism for decreased exercise capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 2198-2202.
- Berkes, C.A., Tapscott, S.J., 2005. MyoD and the transcriptional control of myogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 16, 585-595.
- Bellinger, A.M., Reiken, S., Dura, M., Murphy, P.W., Deng, S.X., Landry, D.W., Nieman, D., Lehnart, S.E., Samaru, M., LaCampagne, A., Marks, A.R., 2008. Remodeling of ryanodine receptor complex causes "leaky" channels: a molecular mechanism for decreased exercise capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 2198-2202.
- Biesiada, E., Hamamori, Y., Kedes, L., Sartorelli, V., 1999. Myogenic basic helix-loop-helix proteins and Sp1 interact as components of a multiprotein transcriptional complex required for activity of the human cardiac alpha-actin promoter. *Mol Cell Biol* 19, 2577-2584.

- Bigelow, D.J., Squier, T.C., 2005. Redox modulation of cellular signaling and metabolism through reversible oxidation of methionine sensors in calcium regulatory proteins. *Biochim Biophys Acta* 1703, 121-134.
- Bigot, A., Jacquemin, V., Debacq-Chainiaux, F., Butler-Browne, G.S., Toussaint, O., Furling, D., Mouly, V., 2008. Replicative aging down-regulates the myogenic regulatory factors in human myoblasts. *Biol Cell* 100, 189-199.
- Bitko, V., Barik, S., 2001. An endoplasmic reticulum-specific stress-activated caspase (caspase-12) is implicated in the apoptosis of A549 epithelial cells by respiratory syncytial virus. *J Cell Biochem* 80, 441-454.
- Black, B.L., Molkentin, J.D., Olson, E.N., 1998. Multiple roles for the MyoD basic region in transmission of transcriptional activation signals and interaction with MEF2. *Mol Cell Biol* 18, 69-77.
- Blokzijl, A., Dahlqvist, C., Reissmann, E., Falk, A., Moliner, A., Lendahl, U., Ibanez, C.F., 2003. Cross-talk between the Notch and TGF-beta signaling pathways mediated by interaction of the Notch intracellular domain with Smad3. *J Cell Biol* 163, 723-728.
- Bokov, A., Chaudhuri, A., Richardson, A., 2004. The role of oxidative damage and stress in aging. *Mech Ageing Dev* 125, 811-826.
- Brack, A.S., Conboy, I.M., Conboy, M.J., Shen, J., Rando, T.A., 2008. A temporal switch from notch to Wnt signaling in muscle stem cells is necessary for normal adult myogenesis. *Cell Stem Cell* 2, 50-59.
- Brack, A.S., Conboy, M.J., Roy, S., Lee, M., Kuo, C.J., Keller, C., Rando, T.A., 2007. Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis. *Science* 317, 807-810.
- Brocardo, P.S., Pandolfo, P., Takahashi, R.N., Rodrigues, A.L., Dafre, A.L., 2005. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in the cerebral cortex and hippocampus following acute exposure to malathion and/or zinc chloride. *Toxicology* 207, 283-291.
- Brustis, J.J., Elamrani, N., Balcerzak, D., Safwate, A., Soriano, M., Poussard, S., Cottin, P., Ducastaing, A., 1994. Rat myoblast fusion requires exteriorized m-calpain activity. *Eur J Cell Biol* 64, 320-327.
- Bruton, J.D., Lannergren, J., Westerblad, H., 1998. Mechanisms underlying the slow recovery of force after fatigue: importance of intracellular calcium. *Acta Physiol Scand* 162, 285-293.

- C -

- Campbell, K.P., Kahl, S.D., 1989. Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. *Nature* 338, 259-262.
- Campion, D.R., 1984. The muscle satellite cell: a review. *Int Rev Cytol* 87, 225-251.
- Campion, D.R., Richardson, R.L., Reagan, J.O., Kraeling, R.R., 1981. Changes in the satellite cell population during postnatal growth of pig skeletal muscle. *J Anim Sci* 52, 1014-1018.
- Cao, Z., Wanagat, J., McKiernan, S.H., Aiken, J.M., 2001. Mitochondrial DNA deletion mutations are concomitant with ragged red regions of individual, aged muscle fibers: analysis by laser-capture microdissection. *Nucleic Acids Res* 29, 4502-4508.
- Carragher, N.O., Westhoff, M.A., Riley, D., Potter, D.A., Dutt, P., Elce, J.S., Greer, P.A., Frame, M.C., 2002. v-Src-induced modulation of the calpain-calpastatin proteolytic system regulates transformation. *Mol Cell Biol* 22, 257-269.
- Carlson, M.E., Conboy, I.M., 2007. Regulating the Notch pathway in embryonic, adult and old stem cells. *Curr Opin Pharmacol* 7, 303-309.
- Catterall, W.A., 1991. Excitation-contraction coupling in vertebrate skeletal muscle: a tale of two calcium channels. *Cell* 64, 871-874.
- Cesari, M., Penninx, B.W., Pahor, M., Lauretani, F., Corsi, A.M., Rhys Williams, G., Guralnik, J.M., Ferrucci, L., 2004. Inflammatory markers and physical performance in older persons: the InCHIANTI study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 59, 242-248.
- Chabi, B., Ljubcic, V., Menzies, K.J., Huang, J.H., Saleem, A., Hood, D.A., 2008. Mitochondrial function and apoptotic susceptibility in aging skeletal muscle. *Aging Cell* 7, 2-12.
- Chae, J., Minami, N., Jin, Y., Nakagawa, M., Murayama, K., Igarashi, F., Nonaka, I., 2001. Calpain 3 gene mutations: genetic and clinico-pathologic findings in limb-girdle muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 11, 547-555.
- Chakrabarti, A.K., Dasgupta, S., Gadsden, R.H., Sr., Hogan, E.L., Banik, N.L., 1996. Regulation of brain m calpain Ca²⁺ sensitivity by mixtures of membrane lipids: activation at intracellular Ca²⁺ level. *J Neurosci Res* 44, 374-380.
- Charge, S.B., Rudnicki, M.A., 2004. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 84, 209-238.
- Chaudhari, A.A., Seol, J.W., Kim, S.J., Lee, Y.J., Kang, H.S., Kim, I.S., Kim, N.S., Park, S.Y., 2007. Reactive oxygen species regulate Bax translocation and mitochondrial

- transmembrane potential, a possible mechanism for enhanced TRAIL-induced apoptosis by CCCP. *Oncol Rep* 18, 71-76.
- Cherednichenko, G., Zima, A.V., Feng, W., Schaefer, S., Blatter, L.A., Pessah, I.N., 2004. NADH oxidase activity of rat cardiac sarcoplasmic reticulum regulates calcium-induced calcium release. *Circ Res* 94, 478-486.
- Childs, T.E., Spangenburg, E.E., Vyas, D.R., Booth, F.W., 2003. Temporal alterations in protein signaling cascades during recovery from muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* 285, C391-398.
- Christov, C., Chretien, F., Abou-Khalil, R., Bassez, G., Vallet, G., Authier, F.J., Bassaglia, Y., Shinin, V., Tajbakhsh, S., Chazaud, B., Gherardi, R.K., 2007. Muscle satellite cells and endothelial cells: close neighbors and privileged partners. *Mol Biol Cell* 18, 1397-1409.
- Chua, B.T., Guo, K., Li, P., 2000. Direct cleavage by the calcium-activated protease calpain can lead to inactivation of caspases. *J Biol Chem* 275, 5131-5135.
- Chung, H.Y., Kim, H.J., Kim, J.W., Yu, B.P., 2001. The inflammation hypothesis of aging: molecular modulation by calorie restriction. *Ann N Y Acad Sci* 928, 327-335.
- Chung, H.Y., Sung, B., Jung, K.J., Zou, Y., Yu, B.P., 2006. The molecular inflammatory process in aging. *Antioxid Redox Signal* 8, 572-581.
- Clark, K.A., McElhinny, A.S., Beckerle, M.C., Gregorio, C.C., 2002. Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18, 637-706.
- Collins, C.A., Partridge, T.A., 2005. Self-renewal of the adult skeletal muscle satellite cell. *Cell Cycle* 4, 1338-1341.
- Collins, C.A., 2006. Satellite cell self-renewal. *Curr Opin Pharmacol* 6, 301-306.
- Combaret, L., Taillandier, D., Voisin, L., Samuels, S.E., Boespflug-Tanguy, O., Attaix, D., 1996. No alteration in gene expression of components of the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway in dystrophin-deficient muscles. *FEBS Lett* 393, 292-296.
- Conboy, I.M., Rando, T.A., 2002. The regulation of Notch signaling controls satellite cell activation and cell fate determination in postnatal myogenesis. *Dev Cell* 3, 397-409.
- Coolican, S.A., Hathaway, D.R., 1984. Effect of L-alpha-phosphatidylinositol on a vascular smooth muscle Ca²⁺-dependent protease. Reduction of the Ca²⁺ requirement for autolysis. *J Biol Chem* 259, 11627-11630.
- Cormio, A., Milella, F., Vecchiet, J., Felzani, G., Gadaleta, M.N., Cantatore, P., 2005. Mitochondrial DNA mutations in RRF of healthy subjects of different age. *Neurobiol Aging* 26, 655-664.

- Cornelison, D.D., Wold, B.J., 1997. Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. *Dev Biol* 191, 270-283.
- Cottin, P., Vidalenc, P.L., Merdaci, N., Ducastaing, A., 1983. Evidence for non-competitive inhibition between two calcium-dependent activated neutral proteinases and their specific inhibitor. *Biochim Biophys Acta* 743, 299-302.
- Cottin, P., Brustis, J.J., Poussard, S., Elamrani, N., Broncard, S., Ducastaing, A., 1994. Ca(2+)-dependent proteinases (calpains) and muscle cell differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1223, 170-178.
- Cottin, P., Poussard, S., Dargelos, E., Balcerzak, D., Aragon, B., Brustis, J.J., Ducastaing, A., 2000. Calpains and myogenesis. *Methods Mol Biol* 144, 173-180.
- Cottin, P., Thompson, V.F., Sathe, S.K., Szpacenko, A., Goll, D.E., 2001. Autolysis of mu- and m-calpain from bovine skeletal muscle. *Biol Chem* 382, 767-776.
- Croall, D.E., DeMartino, G.N., 1991. Calcium-activated neutral protease (calpain) system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev* 71, 813-847.

- D -

- Dahlqvist, C., Blokzijl, A., Chapman, G., Falk, A., Dannaeus, K., Ibanez, C.F., Lendahl, U., 2003. Functional Notch signaling is required for BMP4-induced inhibition of myogenic differentiation. *Development* 130, 6089-6099.
- Danial, N.N., Korsmeyer, S.J., 2004. Cell death: critical control points. *Cell* 116, 205-219.
- Dargelos, E., Poussard, S., Brule, C., Daury, L., Cottin, P., 2008. Calcium-dependent proteolytic system and muscle dysfunctions: a possible role of calpains in sarcopenia. *Biochimie* 90, 359-368.
- David, L.L., Shearer, T.R., Shih, M., 1993. Sequence analysis of lens beta-crystallins suggests involvement of calpain in cataract formation. *J Biol Chem* 268, 1937-1940.
- Dayton, W.R., Reville, W.J., Goll, D.E., Stromer, M.H., 1976. A Ca²⁺-activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Partial characterization of the purified enzyme. *Biochemistry* 15, 2159-2167.
- 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, 175-184.

- Dear, T.N., Boehm, T., 1999. Diverse mRNA expression patterns of the mouse calpain genes *Capn5*, *Capn6* and *Capn11* during development. *Mech Dev* 89, 201-209.
- Dear, T.N., Boehm, T., 2001. Identification and characterization of two novel calpain large subunit genes. *Gene* 274, 245-252.
- Decary, S., Mouly, V., Hamida, C.B., Sautet, A., Barbet, J.P., Butler-Browne, G.S., 1997. Replicative potential and telomere length in human skeletal muscle: implications for satellite cell-mediated gene therapy. *Hum Gene Ther* 8, 1429-1438.
- Dedieu, S., Mazeret, G., Poussard, S., Brustis, J.J., Cottin, P., 2003. Myoblast migration is prevented by a calpain-dependent accumulation of MARCKS. *Biol Cell* 95, 615-623.
- Dela, F., Kjaer, M., 2006. Resistance training, insulin sensitivity and muscle function in the elderly. *Essays Biochem* 42, 75-88.
- Delmas, C., Aragou, N., Poussard, S., Cottin, P., Darbon, J.M., Manenti, S., 2003. MAP kinase-dependent degradation of p27Kip1 by calpains in choroidal melanoma cells. Requirement of p27Kip1 nuclear export. *J Biol Chem* 278, 12443-12451.
- Dirks, A.J., Hofer, T., Marzetti, E., Pahor, M., Leeuwenburgh, C., 2006. Mitochondrial DNA mutations, energy metabolism and apoptosis in aging muscle. *Ageing Res Rev* 5, 179-195.
- Dirks, A.J., Leeuwenburgh, C., 2004. Aging and lifelong calorie restriction result in adaptations of skeletal muscle apoptosis repressor, apoptosis-inducing factor, X-linked inhibitor of apoptosis, caspase-3, and caspase-12. *Free Radic Biol Med* 36, 27-39.
- Doberstein, S.K., Fetter, R.D., Mehta, A.Y., Goodman, C.S., 1997. Genetic analysis of myoblast fusion: blown fuse is required for progression beyond the prefusion complex. *J Cell Biol* 136, 1249-1261.
- Dourdin, N., Balcerzak, D., Brustis, J.J., Poussard, S., Cottin, P., Ducastaing, A., 1999. Potential m-calpain substrates during myoblast fusion. *Exp Cell Res* 246, 433-442.
- Dourdin, N., Brustis, J.J., Balcerzak, D., Elamrani, N., Poussard, S., Cottin, P., Ducastaing, A., 1997. Myoblast fusion requires fibronectin degradation by exteriorized m-calpain. *Exp Cell Res* 235, 385-394.
- Dreyer, H.C., Volpi, E., 2005. Role of protein and amino acids in the pathophysiology and treatment of sarcopenia. *J Am Coll Nutr* 24, 140S-145S.
- Drew, B., Phaneuf, S., Dirks, A., Selman, C., Gredilla, R., Lezza, A., Barja, G., Leeuwenburgh, C., 2003. Effects of aging and caloric restriction on mitochondrial energy production in gastrocnemius muscle and heart. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284, R474-480.

- Dulong, S., Goudenege, S., Vuillier-Devillers, K., Manenti, S., Poussard, S., Cottin, P., 2004. Myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) is involved in myoblast fusion through its regulation by protein kinase Calpha and calpain proteolytic cleavage. *Biochem J* 382, 1015-1023.
- Dupont-Versteegden, E.E., 2005. Apoptosis in muscle atrophy: relevance to sarcopenia. *Exp Gerontol* 40, 473-481.
- Duris, M.P., Renand, G., Picard, B., 1999. Genetic variability of foetal bovine myoblasts in primary culture. *Histochem J* 31, 753-760.

- E -

- Ebashi, S., Kodama, A., 1966. Interaction of troponin with F-actin in the presence of tropomyosin. *J Biochem* 59, 425-426.a
- Ebashi, S., Kodama, A., 1966. Native tropomyosin-like action of troponin on trypsin-treated myosin B. *J Biochem* 60, 733-734.b
- Ebashi, S., 1966. [New structural proteins of the muscle]. *Seikagaku* 38, 325-334.c
- Eckner, R., Ewen, M.E., Newsome, D., Gerdes, M., DeCaprio, J.A., Lawrence, J.B., Livingston, D.M., 1994. Molecular cloning and functional analysis of the adenovirus E1A-associated 300-kD protein (p300) reveals a protein with properties of a transcriptional adaptor. *Genes Dev* 8, 869-884.
- Elce, J.S., Hegadorn, C., Arthur, J.S., 1997. Autolysis, Ca²⁺ requirement, and heterodimer stability in m-calpain. *J Biol Chem* 272, 11268-11275.
- 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, 2364-2370.
- Ervasti, J.M., 2007. Dystrophin, its interactions with other proteins, and implications for muscular dystrophy. *Biochim Biophys Acta* 1772, 108-117.
- Evans, A.C., Ireland, J.L., Winn, M.E., Lonergan, P., Smith, G.W., Coussens, P.M., Ireland, J.J., 2004. Identification of genes involved in apoptosis and dominant follicle development during follicular waves in cattle. *Biol Reprod* 70, 1475-1484.
- Evans, W.J., 1995. What is sarcopenia? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 50 Spec No, 5-8.

- F -

- Fanin, M., Nascimbeni, A.C., Fulizio, L., Trevisan, C.P., Meznaric-Petrusa, M., Angelini, C., 2003. Loss of calpain-3 autocatalytic activity in LGMD2A patients with normal protein expression. *Am J Pathol* 163, 1929-1936.
- Farout, L., Friguet, B., 2006. Proteasome function in aging and oxidative stress: implications in protein maintenance failure. *Antioxid Redox Signal* 8, 205-216.
- Ferrucci, L., Harris, T.B., Guralnik, J.M., Tracy, R.P., Corti, M.C., Cohen, H.J., Penninx, B., Pahor, M., Wallace, R., Havlik, R.J., 1999. Serum IL-6 level and the development of disability in older persons. *J Am Geriatr Soc* 47, 639-646.
- Fridovich, I., 2004. Mitochondria: are they the seat of senescence? *Aging Cell* 3, 13-16.
- Friguet, B., 2002. Protein repair and degradation during aging. *ScientificWorldJournal* 2, 248-254.
- Friguet, B., 2006. Oxidized protein degradation and repair in ageing and oxidative stress. *FEBS Lett* 580, 2910-2916.
- Fukada, S., Uezumi, A., Ikemoto, M., Masuda, S., Segawa, M., Tanimura, N., Yamamoto, H., Miyagoe-Suzuki, Y., Takeda, S., 2007. Molecular signature of quiescent satellite cells in adult skeletal muscle. *Stem Cells* 25, 2448-2459.
- Fukami, K., Furuhashi, K., Inagaki, M., Endo, T., Hatano, S., Takenawa, T., 1992. Requirement of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate for alpha-actinin function. *Nature* 359, 150-152.

- G -

- Gafni, J., Ellerby, L.M., 2002. Calpain activation in Huntington's disease. *J Neurosci* 22, 4842-4849.
- Garret, C., Cottin, P., Dufourcq, J., Ducastaing, A., 1988. Evidence for a Ca²⁺-independent association between calpain II and phospholipid vesicles. *FEBS Lett* 227, 209-214.
- Garvey, S.M., Rajan, C., Lerner, A.P., Frankel, W.N., Cox, G.A., 2002. The muscular dystrophy with myositis (mdm) mouse mutation disrupts a skeletal muscle-specific domain of titin. *Genomics* 79, 146-149.

- Geesink, G.H., 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, 19-24.
- Gianni, P., Jan, K.J., Douglas, M.J., Stuart, P.M., Tarnopolsky, M.A., 2004. Oxidative stress and the mitochondrial theory of aging in human skeletal muscle. *Exp Gerontol* 39, 1391-1400.
- Giresi, P.G., Stevenson, E.J., Theilhaber, J., Koncarevic, A., Parkington, J., Fielding, R.A., Kandarian, S.C., 2005. Identification of a molecular signature of sarcopenia. *Physiol Genomics* 21, 253-263.
- Glading, A., Chang, P., Lauffenburger, D.A., Wells, A., 2000. Epidermal growth factor receptor activation of calpain is required for fibroblast motility and occurs via an ERK/MAP kinase signaling pathway. *J Biol Chem* 275, 2390-2398.
- Glading, A., Uberall, F., Keyse, S.M., Lauffenburger, D.A., Wells, A., 2001. Membrane proximal ERK signaling is required for M-calpain activation downstream of epidermal growth factor receptor signaling. *J Biol Chem* 276, 23341-23348.
- Glading, A., Lauffenburger, D.A., Wells, A., 2002. Cutting to the chase: calpain proteases in cell motility. *Trends Cell Biol* 12, 46-54.
- Glading, A., Bodnar, R.J., Reynolds, I.J., Shiraha, H., Satish, L., Potter, D.A., Blair, H.C., Wells, A., 2004. Epidermal growth factor activates m-calpain (calpain II), at least in part, by extracellular signal-regulated kinase-mediated phosphorylation. *Mol Cell Biol* 24, 2499-2512.
- Goll, D.E., Thompson, V.F., Li, H., Wei, W., Cong, J., 2003. The calpain system. *Physiol Rev* 83, 731-801.
- Gommans, I.M., Vlak, M.H., de Haan, A., van Engelen, B.G., 2002. Calcium regulation and muscle disease. *J Muscle Res Cell Motil* 23, 59-63.
- Goudenege, S., Poussard, S., Dulong, S., Cottin, P., 2005. Biologically active milli-calpain associated with caveolae is involved in a spatially compartmentalised signalling involving protein kinase C alpha and myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS). *Int J Biochem Cell Biol* 37, 1900-1910.
- Goudenege, S., Dargelos, E., Claverol, S., Bonneu, M., Cottin, P., Poussard, S., 2007. Comparative proteomic analysis of myotube caveolae after milli-calpain deregulation. *Proteomics* 7, 3289-3298.
- Gregorio, C.C., Granzier, H., Sorimachi, H., Labeit, S., 1999. Muscle assembly: a titanic achievement? *Curr Opin Cell Biol* 11, 18-25.
- Gregorio, C.C., 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, 1013-1027.

Grune, T., Merker, K., Jung, T., Sitte, N., Davies, K.J., 2005. Protein oxidation and degradation during postmitotic senescence. *Free Radic Biol Med* 39, 1208-1215.

Grynspan, F., Griffin, W.R., Cataldo, A., Katayama, S., Nixon, R.A., 1997. Active site-directed antibodies identify calpain II as an early-appearing and pervasive component of neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *Brain Res* 763, 145-158.

Guroff, G., 1964. A Neutral, Calcium-Activated Proteinase From The Soluble Fraction Of Rat Brain. *J Biol Chem* 239, 149-155.

- H -

Haddad, F., Roy, R.R., Zhong, H., Edgerton, V.R., Baldwin, K.M., 2003. Atrophy responses to muscle inactivity. II. Molecular markers of protein deficits. *J Appl Physiol* 95, 791-802.

Hagen, J.L., Krause, D.J., Baker, D.J., Fu, M.H., Tarnopolsky, M.A., Hepple, R.T., 2004. Skeletal muscle aging in F344BN F1-hybrid rats: I. Mitochondrial dysfunction contributes to the age-associated reduction in VO₂max. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 59, 1099-1110.

Hajnoczky, G., Csordas, G., Madesh, M., Pacher, P., 2000. Control of apoptosis by IP(3) and ryanodine receptor driven calcium signals. *Cell Calcium* 28, 349-363.

Halestrap, A.P., 2009. What is the mitochondrial permeability transition pore? *J Mol Cell Cardiol* 46, 821-831.

Halevy, O., Novitch, B.G., Spicer, D.B., Skapek, S.X., Rhee, J., Hannon, G.J., Beach, D., Lassar, A.B., 1995. Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD. *Science* 267, 1018-1021.

Hamilton, M.L., Van Remmen, H., Drake, J.A., Yang, H., Guo, Z.M., Kewitt, K., Walter, C.A., Richardson, A., 2001. Does oxidative damage to DNA increase with age? *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10469-10474.

Han, R., Campbell, K.P., 2007. Dysferlin and muscle membrane repair. *Curr Opin Cell Biol* 19, 409-416.

Hardie, D.G., 2004. AMP-activated protein kinase: a key system mediating metabolic responses to exercise. *Med Sci Sports Exerc* 36, 28-34.

Harris, S.L., Levine, A.J., 2005. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene* 24, 2899-2908.

- Hartley, R.S., Bandman, E., Yablonka-Reuveni, Z., 1992. Skeletal muscle satellite cells appear during late chicken embryogenesis. *Dev Biol* 153, 206-216.
- Hata, S., Koyama, S., Kawahara, H., Doi, N., Maeda, T., Toyama-Sorimachi, N., Abe, K., Suzuki, K., Sorimachi, H., 2006. Stomach-specific calpain, nCL-2, localizes in mucus cells and proteolyzes the beta-subunit of coatamer complex, beta-COP. *J Biol Chem* 281, 11214-11224.
- Hawke, T.J., Garry, D.J., 2001. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol* 91, 534-551.
- Heller, H., Bengal, E., 1998. TFIID (TBP) stabilizes the binding of MyoD to its DNA site at the promoter and MyoD facilitates the association of TFIIB with the preinitiation complex. *Nucleic Acids Res* 26, 2112-2119.
- Hirai, S., Kawasaki, H., Yaniv, M., Suzuki, K., 1991. Degradation of transcription factors, c-Jun and c-Fos, by calpain. *FEBS Lett* 287, 57-61.
- Hoffman, E.P., Brown, R.H., Jr., Kunkel, L.M., 1987. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51, 919-928.
- Holtzer, H., Marshall, J.M., Jr., Finck, H., 1957. An analysis of myogenesis by the use of fluorescent antimyosin. *J Biophys Biochem Cytol* 3, 705-724.
- Hong, D.H., Forsberg, N.E., 1995. Effects of dexamethasone on protein degradation and protease gene expression in rat L8 myotube cultures. *Mol Cell Endocrinol* 108, 199-209.
- Hood, J.L., Brooks, W.H., Roszman, T.L., 2004. Differential compartmentalization of the calpain/calpastatin network with the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *J Biol Chem* 279, 43126-43135.
- Horikawa, Y., Oda, N., Cox, N.J., Li, X., Orho-Melander, M., Hara, M., Hinokio, Y., Lindner, T.H., Mashima, H., Schwarz, P.E., del Bosque-Plata, L., Horikawa, Y., Oda, Y., Yoshiuchi, I., Colilla, S., Polonsky, K.S., Wei, S., Concannon, P., Iwasaki, N., Schulze, J., Baier, L.J., Bogardus, C., Groop, L., Boerwinkle, E., Hanis, C.L., Bell, G.I., 2000. Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet* 26, 163-175.
- Huang, J., Forsberg, N.E., 1998. Role of calpain in skeletal-muscle protein degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 12100-12105.
- Huang, Y., Verheesen, P., Roussis, A., Frankhuizen, W., Ginjaar, I., Haldane, F., Laval, S., Anderson, L.V., Verrips, T., Frants, R.R., de Haard, H., Bushby, K., den Dunnen, J., van der Maarel, S.M., 2005. Protein studies in dysferlinopathy patients using llama-derived antibody fragments selected by phage display. *Eur J Hum Genet* 13, 721-730.

Huang, Y., Wang, K.K., 2001. The calpain family and human disease. *Trends Mol Med* 7, 355-362.

- I -

Ikemoto, N., Ronjat, M., Meszaros, L.G., Koshita, M., 1989. Postulated role of calsequestrin in the regulation of calcium release from sarcoplasmic reticulum. *Biochemistry* 28, 6764-6771.

Illa, I., Serrano-Munuera, C., Gallardo, E., Lasa, A., Rojas-Garcia, R., Palmer, J., Gallano, P., Baiget, M., Matsuda, C., Brown, R.H., 2001. Distal anterior compartment myopathy: a dysferlin mutation causing a new muscular dystrophy phenotype. *Ann Neurol* 49, 130-134.

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* 99, 1281-1284.

Inomata, M., Kawashima, S., 1995. The possible self-down-regulation of calpain triggered by cell membranes. *Biochim Biophys Acta* 1235, 107-114.

Inomata, M., Saito, Y., Kon, K., Kawashima, S., 1990. Binding sites for calcium-activated neutral protease on erythrocyte membranes are not membrane phospholipids. *Biochem Biophys Res Commun* 171, 625-632.

Izumov, D.S., Avetisyan, A.V., Pletjushkina, O.Y., Sakharov, D.V., Wirtz, K.W., Chernyak, B.V., Skulachev, V.P., 2004. "Wages of fear": transient threefold decrease in intracellular ATP level imposes apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1658, 141-147.

- J -

Jackman, R.W., Kandarian, S.C., 2004. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* 287, C834-843.

Johnson, P., Hammer, J.L., 1993. Cardiac and skeletal muscle enzyme levels in hypertensive and aging rats. *Comp Biochem Physiol B* 104, 63-67.

- K -

- Kahn, E.B., Simpson, S.B., Jr., 1974. Satellite cells in mature, uninjured skeletal muscle of the lizard tail. *Dev Biol* 37, 219-223.
- Kapprell, H.P., Goll, D.E., 1989. Effect of Ca²⁺ on binding of the calpains to calpastatin. *J Biol Chem* 264, 17888-17896.
- Kar, P., Chakraborti, T., Samanta, K., Chakraborti, S., 2008. Submitochondrial localization of associated mu-calpain and calpastatin. *Arch Biochem Biophys* 470, 176-186.
- Karin, M., Liu, Z., Zandi, E., 1997. AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9, 240-246.
- Kato, M., Nonaka, T., Maki, M., Kikuchi, H., Imajoh-Ohmi, S., 2000. Caspases cleave the amino-terminal calpain inhibitory unit of calpastatin during apoptosis in human Jurkat T cells. *J Biochem* 127, 297-305.
- 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* 106, 274-281.
- Kefaloyianni, E., Gaitanaki, C., Beis, I., 2006. ERK1/2 and p38-MAPK signalling pathways, through MSK1, are involved in NF-kappaB transactivation during oxidative stress in skeletal myoblasts. *Cell Signal* 18, 2238-2251.
- Kifor, O., Kifor, I., Moore, F.D., Jr., Butters, R.R., Jr., Brown, E.M., 2003. m-Calpain colocalizes with the calcium-sensing receptor (CaR) in caveolae in parathyroid cells and participates in degradation of the CaR. *J Biol Chem* 278, 31167-31176.
- Kitzmann, M., Bonnieu, A., Duret, C., Vernus, B., Barro, M., Laoudj-Chenivresse, D., Verdi, J.M., Carnac, G., 2006. Inhibition of Notch signaling induces myotube hypertrophy by recruiting a subpopulation of reserve cells. *J Cell Physiol* 208, 538-548.
- Koenig, M., Monaco, A.P., Kunkel, L.M., 1988. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* 53, 219-228.
- Kong, Y., Flick, M.J., Kudla, A.J., Konieczny, S.F., 1997. Muscle LIM protein promotes myogenesis by enhancing the activity of MyoD. *Mol Cell Biol* 17, 4750-4760.
- Kramerova, I., Kudryashova, E., Tidball, J.G., Spencer, M.J., 2004. Null mutation of calpain 3 (p94) in mice causes abnormal sarcomere formation in vivo and in vitro. *Hum Mol Genet* 13, 1373-1388.

- Kramerova, I., Kudryashova, E., Venkatraman, G., Spencer, M.J., 2005. Calpain 3 participates in sarcomere remodeling by acting upstream of the ubiquitin-proteasome pathway. *Hum Mol Genet* 14, 2125-2134.
- Kramerova, I., Kudryashova, E., Wu, B., Spencer, M.J., 2006. Regulation of the M-cadherin-beta-catenin complex by calpain 3 during terminal stages of myogenic differentiation. *Mol Cell Biol* 26, 8437-8447.
- Kretsinger, R.H., Nockolds, C.E., Coffee, C.J., Bradshaw, R.A., 1972. The structure of a calcium-binding protein from carp muscle. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 36, 217-220.
- Kruger, M., Wright, J., Wang, K., 1991. Nebulin as a length regulator of thin filaments of vertebrate skeletal muscles: correlation of thin filament length, nebulin size, and epitope profile. *J Cell Biol* 115, 97-107.
- Kuang, S., Kuroda, K., Le Grand, F., Rudnicki, M.A., 2007. Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. *Cell* 129, 999-1010.
- Kuang, D., Zhao, X., Xiao, G., Ni, J., Feng, Y., Wu, R., Wang, G., 2008a. Stem cell factor/c-kit signaling mediated cardiac stem cell migration via activation of p38 MAPK. *Basic Res Cardiol* 103, 265-273.
- Kuang, S., Gillespie, M.A., Rudnicki, M.A., 2008b. Niche regulation of muscle satellite cell
- Kuang, S., Rudnicki, M.A., 2008. The emerging biology of satellite cells and their therapeutic potential. *Trends Mol Med* 14, 82-91.
- Kuboki, M., Ishii, H., Kazama, M., 1987. Procalpain is activated on the plasma membrane and the calpain acts on the membrane. *Biochim Biophys Acta* 929, 164-172.
- Kumamoto, T., Kleese, W.C., Cong, J.Y., Goll, D.E., Pierce, P.R., Allen, R.E., 1992. Localization of the Ca(2+)-dependent proteinases and their inhibitor in normal, fasted, and denervated rat skeletal muscle. *Anat Rec* 232, 60-77.

- L -

- Labeit, S., Kolmerer, B., 1995. Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science* 270, 293-296.
- Langen, R.C., Schols, A.M., Kelders, M.C., Wouters, E.F., Janssen-Heininger, Y.M., 2001. Inflammatory cytokines inhibit myogenic differentiation through activation of nuclear factor-kappaB. *Faseb J* 15, 1169-1180.

- Larsen, N.B., Rasmussen, M., Rasmussen, L.J., 2005. Nuclear and mitochondrial DNA repair: similar pathways? *Mitochondrion* 5, 89-108.
- Lassar, A.B., Davis, R.L., Wright, W.E., Kadesch, T., Murre, C., Voronova, A., Baltimore, D., Weintraub, H., 1991. Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E47-like proteins in vivo. *Cell* 66, 305-315.
- Lee, H.C., Lim, M.L., Lu, C.Y., Liu, V.W., Fahn, H.J., Zhang, C., Nagley, P., Wei, Y.H., 1999. Concurrent increase of oxidative DNA damage and lipid peroxidation together with mitochondrial DNA mutation in human lung tissues during aging--smoking enhances oxidative stress on the aged tissues. *Arch Biochem Biophys* 362, 309-316.
- Lee, H.J., Sorimachi, H., Jeong, S.Y., Ishiura, S., Suzuki, K., 1998. Molecular cloning and characterization of a novel tissue-specific calpain predominantly expressed in the digestive tract. *Biol Chem* 379, 175-183.
- Lee, W.J., Ma, H., Takano, E., Yang, H.Q., Hatanaka, M., Maki, M., 1992. Molecular diversity in amino-terminal domains of human calpastatin by exon skipping. *J Biol Chem* 267, 8437-8442.
- Leeuwenburgh, C., Gurley, C.M., Strotman, B.A., Dupont-Versteegden, E.E., 2005. Age-related differences in apoptosis with disuse atrophy in soleus muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288, R1288-1296.
- Leloup, L., Mazerès, G., Daury, L., Cottin, P., Brustis, J.J., 2006. Involvement of calpains in growth factor-mediated migration. *Int J Biochem Cell Biol* 38, 2049-2063.
- Leloup, L., Daury, L., Mazerès, G., Cottin, P., Brustis, J.J., 2007. Involvement of the ERK/MAP kinase signalling pathway in milli-calpain activation and myogenic cell migration. *Int J Biochem Cell Biol* 39, 1177-1189.
- Lezza, A.M., Pesce, V., Cormio, A., Fracasso, F., Vecchiet, J., Felzani, G., Cantatore, P., Gadaleta, M.N., 2001. Increased expression of mitochondrial transcription factor A and nuclear respiratory factor-1 in skeletal muscle from aged human subjects. *FEBS Lett* 501, 74-78.
- Li, J.M., Shah, A.M., 2001. Differential NADPH- versus NADH-dependent superoxide production by phagocyte-type endothelial cell NADPH oxidase. *Cardiovasc Res* 52, 477-486.
- Li, L., Zhou, J., James, G., Heller-Harrison, R., Czech, M.P., Olson, E.N., 1992. FGF inactivates myogenic helix-loop-helix proteins through phosphorylation of a conserved protein kinase C site in their DNA-binding domains. *Cell* 71, 1181-1194.
- Linke, W.A., Ivemeyer, M., Mundel, P., Stockmeier, M.R., Kolmerer, B., 1998. Nature of PEVK-titin elasticity in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8052-8057.

- Linkhart, T.A., Clegg, C.H., Hauschika, S.D., 1981. Myogenic differentiation in permanent clonal mouse myoblast cell lines: regulation by macromolecular growth factors in the culture medium. *Dev Biol* 86, 19-30.
- Liu, D., Black, B.L., Derynck, R., 2001. TGF-beta inhibits muscle differentiation through functional repression of myogenic transcription factors by Smad3. *Genes Dev* 15, 2950-2966.
- Liu, K., Li, L., Cohen, S.N., 2000. Antisense RNA-mediated deficiency of the calpain protease, nCL-4, in NIH3T3 cells is associated with neoplastic transformation and tumorigenesis. *J Biol Chem* 275, 31093-31098.
- Liu, J., Aoki, M., Illa, I., Wu, C., Fardeau, M., Angelini, C., Serrano, C., Urtizbera, J.A., Hentati, F., Hamida, M.B., Bohlega, S., Culper, E.J., Amato, A.A., Bossie, K., Oeltjen, J., Bejaoui, K., McKenna-Yasek, D., Hosler, B.A., Schurr, E., Arahata, K., de Jong, P.J., Brown, R.H., Jr., 1998. Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nat Genet* 20, 31-36.
- Liu, K., Li, L., Cohen, S.N., 2000. Antisense RNA-mediated deficiency of the calpain protease, nCL-4, in NIH3T3 cells is associated with neoplastic transformation and tumorigenesis. *J Biol Chem* 275, 31093-31098.
- Ludolph, D.C., Konieczny, S.F., 1995. Transcription factor families: muscling in on the myogenic program. *Faseb J* 9, 1595-1604.
- Luz, M.A., Marques, M.J., Santo Neto, H., 2002. Impaired regeneration of dystrophin-deficient muscle fibers is caused by exhaustion of myogenic cells. *Braz J Med Biol Res* 35, 691-695.

- M -

- Ma, H., Shih, M., Hata, I., Fukiage, C., Azuma, M., Shearer, T.R., 1998. Protein for Lp82 calpain is expressed and enzymatically active in young rat lens. *Exp Eye Res* 67, 221-229.
- Ma, H., Yang, H.Q., Takano, E., Hatanaka, M., Maki, M., 1994. Amino-terminal conserved region in proteinase inhibitor domain of α 1-pastatine potentiates its calpain inhibitory activity by interacting with calmodulin-like domain of the proteinase. *J Biol Chem* 269, 24430-24436.
- Machida, S., Booth, F.W., 2004. Increased nuclear proteins in muscle satellite cells in aged animals as compared to young growing animals. *Exp Gerontol* 39, 1521-1525.

- 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, 10254-10261.
- Mamoune, A., Luo, J.H., Lauffenburger, D.A., Wells, A., 2003. Calpain-2 as a target for limiting prostate cancer invasion. *Cancer Res* 63, 4632-4640.
- Martonosi, A.N., Pikula, S., 2003. The network of calcium regulation in muscle. *Acta Biochim Pol* 50, 1-30.
- Maruyama, K., Ebashi, S., 1965. Alpha-actinin, a new structural protein from striated muscle. II. Action on actin. *J Biochem* 58, 13-19.
- Maruyama, K., Murakami, F., Ohashi, K., 1977. Connectin, an elastic protein of muscle. *Comparative Biochemistry. J Biochem* 82, 339-345.
- Marzetti, E., Leeuwenburgh, C., 2006. Skeletal muscle apoptosis, calpastatin and frailty at old age. *Exp Gerontol* 41, 1234-1238.
- Mayans, O., van der Ven, P.F., Wilm, M., Mues, A., Young, P., Furst, D.O., Wilmanns, M., Gautel, M., 1998. Structural basis for activation of the titin kinase domain during myofibrillogenesis. *Nature* 395, 863-869.
- Mazeres, G., Leloup, L., Daury, L., Cottin, P., Brustis, J.J., 2006. Myoblast attachment and spreading are regulated by different patterns by ubiquitous calpains. *Cell Motil Cytoskeleton* 63, 193-207.
- McClung, J.M., Judge, A.R., Talbert, E.E., Powers, S.K., 2009. Calpain-1 is required for hydrogen peroxide-induced myotube atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* 296, C363-371.
- Reid, M.B., 2001. Nitric oxide, reactive oxygen species, and skeletal muscle contraction. *Med Sci Sports Exerc* 33, 371-376.
- McCroskery, S., Thomas, M., Maxwell, L., Sharma, M., Kambadur, R., 2003. Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *J Cell Biol* 162, 1135-1147.
- McElhinny, A.S., Kolmerer, B., Fowler, V.M., Labeit, S., Gregorio, C.C., 2001. The N-terminal end of nebulin interacts with tropomodulin at the pointed ends of the thin filaments. *J Biol Chem* 276, 583-592.
- McFarlane, C., Hennebry, A., Thomas, M., Plummer, E., Ling, N., Sharma, M., Kambadur, R., 2008. Myostatin signals through Pax7 to regulate satellite cell self-renewal. *Exp Cell Res* 314, 317-329.
- Mellgren, R.L., 1987. Calcium-dependent proteases: an enzyme system active at cellular membranes? *Faseb J* 1, 110-115.

- Mellgren, R.L., 1988. On the mechanism of binding of calpastatine, the protein inhibitor of calpains, to biologic membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 150, 170-176.
- Mellgren, R.L., Song, K., Mericle, M.T., 1993. m-Calpain requires DNA for activity on nuclear proteins at low calcium concentrations. *J Biol Chem* 268, 653-657.
- Melloni, E., Averna, M., Salamino, F., Sparatore, B., Minafra, R., Pontremoli, S., 2000. Acyl-CoA-binding protein is a potent m-calpain activator. *J Biol Chem* 275, 82-86.
- Mignon, M., Beaufre, A.M., Combaret, L., Meynial-Denis, D., 2007. Does long-term intermittent treatment with glutamine improve the well-being of fed and fasted very old rats? *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 31, 456-462.
- Moldoveanu, T., Gehring, K., Green, D.R., 2008. Concerted multi-pronged attack by calpastatine to occlude the catalytic cleft of heterodimeric calpains. *Nature* 456, 404-408.
- Moldoveanu, T., Hosfield, C.M., Lim, D., Elce, J.S., Jia, Z., Davies, P.L., 2002. A Ca²⁺ switch aligns the active site of calpain. *Cell* 108, 649-660.
- Moldoveanu, T., Jia, Z., Davies, P.L., 2004. Calpain activation by cooperative Ca²⁺ binding at two non-EF-hand sites. *J Biol Chem* 279, 6106-6114.
- Molgo, J., Colasantei, C., Adams, D.S., Jaimovich, E., 2004. IP₃ receptors and Ca²⁺ signals in adult skeletal muscle satellite cells in situ. *Biol Res* 37, 635-639.
- Morford, L.A., Forrest, K., Logan, B., Overstreet, L.K., Goebel, J., Brooks, W.H., Roszman, T.L., 2002. Calpain II colocalizes with detergent-insoluble rafts on human and Jurkat T-cells. *Biochem Biophys Res Commun* 295, 540-546.
- Morgan, J.E., Partridge, T.A., 2003. Muscle satellite cells. *Int J Biochem Cell Biol* 35, 1151-1156.
- Moss, F.P., Leblond, C.P., 1970. Nature of dividing nuclei in skeletal muscle of growing rats. *J Cell Biol* 44, 459-462.
- Mouatt-Prigent, A., Karlsson, J.O., Yelnik, J., Agid, Y., Hirsch, E.C., 2000. Calpastatin immunoreactivity in the monkey and human brain of control subjects and patients with Parkinson's disease. *J Comp Neurol* 419, 175-192.
- Moyen, C., Goudenege, S., Poussard, S., Sassi, A.H., Brustis, J.J., Cottin, P., 2004. Involvement of micro-calpain (CAPN 1) in muscle cell differentiation. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 728-743.
- Muhle-Goll, C., Habeck, M., Cazorla, O., Nilges, M., Labeit, S., Granzier, H., 2001. Structural and functional studies of titin's fn3 modules reveal conserved surface patterns and binding to myosin S1—a possible role in the Frank-Starling mechanism of the heart. *J Mol Biol* 313, 431-447.

- N -

- Navarro, A., Boveris, A., 2004. Rat brain and liver mitochondria develop oxidative stress and lose enzymatic activities on aging. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287, R1244-1249.
- Navarro, A., Sanchez Del Pino, M.J., Gomez, C., Peralta, J.L., Boveris, A., 2002. Behavioral dysfunction, brain oxidative stress, and impaired mitochondrial electron transfer in aging mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282, R985-992.
- Neumar, R.W., Hagle, S.M., DeGracia, D.J., Krause, G.S., White, B.C., 1996. Brain mu-calpain autolysis during global cerebral ischemia. *J Neurochem* 66, 421-424.
- Nixon, R.A., 2003. The calpains in aging and aging-related diseases. *Ageing Res Rev* 2, 407-418.
- North, K.N., Beggs, A.H., 1996. Deficiency of a skeletal muscle isoform of alpha-actinin (alpha-actinin-3) in merosin-positive congenital muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 6, 229-235.

- O -

- Ohtsuka, H., Yajima, H., Maruyama, K., Kimura, S., 1997. The N-terminal Z repeat 5 of connectin/titin binds to the C-terminal region of alpha-actinin. *Biochem Biophys Res Commun* 235, 1-3.
- Oka, S., Ohno, M., Tsuchimoto, D., Sakumi, K., Furuichi, M., Nakabeppu, Y., 2008. Two distinct pathways of cell death triggered by oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNAs. *Embo J* 27, 421-432.
- Okagaki, T., Weber, F.E., Fischman, D.A., Vaughan, K.T., Mikawa, T., Reinach, F.C., 1993. The major myosin-binding domain of skeletal muscle MyBP-C (C protein) resides in the COOH-terminal, immunoglobulin C2 motif. *J Cell Biol* 123, 619-626.
- Olson, E.N., Perry, W.M., 1992. MyoD and the paradoxes of myogenesis. *Curr Biol* 2, 35-37.
- Ono, Y., Shimada, H., Sorimachi, H., Richard, I., Saïdo, T.C., Beckmann, J.S., 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, 17073-17078.
- Ono, Y., Torii, F., Ojima, K., Doi, N., Yoshioka, K., Kawabata, Y., Labeit, D., Labeit, S., Suzuki, K., Abe, K., Maeda, T., Sorimachi, H., 2006. Suppressed disassembly of autolyzing

p94/CAPN3 by N2A connectin/titin in a genetic reporter system. *J Biol Chem* 281, 18519-18531.

Orho-Melander, M., Klannemark, M., Svensson, M.K., Ridderstrale, M., Lindgren, C.M., Groop, L., 2002. Variants in the calpain-10 gene predispose to insulin resistance and elevated free fatty acid levels. *Diabetes* 51, 2658-2664.

Otsuka, Y., Goll, D.E., 1987. Purification of the Ca²⁺-dependent proteinase inhibitor from bovine cardiac muscle and its interaction with the millimolar Ca²⁺-dependent proteinase. *J Biol Chem* 262, 5839-5851.

Oxenkrug, G.F., Requentina, P.J., 2003. Mating attenuates aging-associated increase of lipid peroxidation activity in C57BL/6J mice. *Ann N Y Acad Sci* 993, 161-167; discussion 195-166.

- P -

Pagano, G., 2002. Redox-modulated xenobiotic action and ROS formation: a mirror or a window? *Hum Exp Toxicol* 21, 77-81.

Pansarasa, O., Bertorelli, L., Vecchiet, J., Felzani, G., Marzatico, F., 1999. Age-dependent changes of antioxidant activities and markers of free radical damage in human skeletal muscle. *Free Radic Biol Med* 27, 617-622.

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, 2806-2815.

Perry, R.L., Rudnick, M.A., 2000. Molecular mechanisms regulating myogenic determination and differentiation. *Front Biosci* 5, D750-767.

Picard, B., Lefaucheur, L., Berri, C., Duclos, M.J., 2002. Muscle fibre ontogenesis in farm animal species. *Reprod Nutr Dev* 42, 415-431.

Piette, J., Piret, B., Bonizzi, G., Schoonbroodt, S., Merville, M.P., Legrand-Poels, S., Bours, V., 1997. Multiple redox regulation in NF-kappaB transcription factor activation. *Biol Chem* 378, 1237-1245.

Polesskaya, A., Seale, P., Rudnicki, M.A., 2003. Wnt signaling induces the myogenic specification of resident CD45⁺ adult stem cells during muscle regeneration. *Cell* 113, 841-852.

- Pollack, M., Phaneuf, S., Dirks, A., Leeuwenburgh, C., 2002. The role of apoptosis in the normal aging brain, skeletal muscle, and heart. *Ann N Y Acad Sci* 959, 93-107.
- Polster, B.M., Basanez, G., Etxebarria, A., Hardwick, J.M., Nicholls, D.G., 2005. Calpain I induces cleavage and release of apoptosis-inducing factor from isolated mitochondria. *J Biol Chem* 280, 6447-6454.
- Pontremoli, S., Viotti, P.L., Michetti, M., Sparatore, B., Salamino, F., Melloni, E., 1990. Identification of an endogenous activator of calpain in rat skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 171, 569-574.
- Popiela, H., 1976. Muscle satellite cells in urodele amphibians: facilitated identification of satellite cells using ruthenium red staining. *J Exp Zool* 198, 57-64.
- Poussard, S., Duvert, M., Balcerzak, D., Ramassamy, S., Brustis, J.J., Cottin, P., Ducastaing, A., 1996. Evidence for implication of muscle-specific calpain (p94) in myofibrillar integrity. *Cell Growth Differ* 7, 1461-1469.
- Primeau, A.J., Adhihetty, P.J., Hood, D.A., 2002. Apoptosis in heart and skeletal muscle. *Can J Appl Physiol* 27, 349-395.
- Pryor, W.A., Houk, K.N., Foote, C.S., Fukuto, J.M., Ignarro, L.J., Squadrito, G.L., Davies, K.J., 2006. Free radical biology and medicine: it's a gas, man! *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291, R491-511.
- Puri, P.L., Sartorelli, V., 2000. Regulation of muscle regulatory factors by DNA-binding, interacting proteins, and post-transcriptional modifications. *J Cell Physiol* 185, 155-173.
- Purintrapiban, J., Wang, M.C., Forsberg, N.E., 2003. Degradation of sarcomeric and cytoskeletal proteins in cultured skeletal muscle cells. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 136, 393-401.

- R -

- 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, 2578-2590.

- Raynaud, P., Jayat-Vignoles, C., Laforet, M.P., Leveziel, H., Amarger, V., 2005. Four promoters direct expression of the calpastatin gene. *Arch Biochem Biophys* 437, 69-77.
- Richard, I., Broux, O., Allamand, V., Fougerousse, 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, 27-40.
- Richard, I., Roudaut, C., Marchand, S., Baghdiguian, S., Herasse, M., Stockholm, D., Ono, Y., Suel, L., Bourg, N., Sorimachi, H., Lefranc, G., Fardeau, M., Sebille, A., Beckmann, J.S., 2000. Loss of calpain 3 proteolytic activity leads to muscular dystrophy and to apoptosis-associated I κ B α /nuclear factor κ B pathway perturbation in mice. *J Cell Biol* 151, 1583-1590.
- Rieger, J.M., Shah, A.R., Gidday, J.M., 2002. Ischemia-reperfusion injury of retinal endothelium by cyclooxygenase- and xanthine oxidase-derived superoxide. *Exp Eye Res* 74, 493-501.
- Riley, P.A., 1994. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* 65, 27-33.
- Ruchaud, S., Korfali, N., Villa, P., Kottke, T.J., Dingwall, C., Kaufmann, S.H., Earnshaw, W.C., 2002. Caspase-6 gene disruption reveals a requirement for lamin A cleavage in apoptotic chromatin condensation. *Embo J* 21, 1967-1977.
- Rundell, K.W., Tullson, P.C., Terjung, R.L., 1992. AMP deaminase binding in contracting rat skeletal muscle. *Am J Physiol* 263, C287-293.

- S -

- Schad, E., Farkas, A., Jekely, G., Tompa, P., Friedrich, P., 2002. A novel human small subunit of calpains. *Biochem J* 362, 383-388.
- Schafer, F.Q., Buettner, G.R., 2001. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 30, 1191-1212.
- Schalbruch, H., Hellhammer, U., 1977. [Satellite cells as myogenic stem cells and their incidence in normal human skeletal muscles]. *Verh Anat Ges*, 1251-1258.

- Schiaffino, S., Gorza, L., Sartore, S., Saggin, L., Ausoni, S., Vianello, M., Gundersen, K., Lomo, T., 1989. Three myosin heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle fibres. *J Muscle Res Cell Motil* 10, 197-205.
- Schmalbruch, H., Lewis, D.M., 2000. Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles. *Muscle Nerve* 23, 617-626.
- Schneider, M.F., 1994. Control of calcium release in functioning skeletal muscle fibers. *Annu Rev Physiol* 56, 463-484.
- Schollmeyer, J.E., 1986a. Possible role of calpain I and calpain II in differentiating muscle. *Exp Cell Res* 163, 413-422.
- Schollmeyer, J.E., 1986b. Role of Ca²⁺ and Ca²⁺-activated protease in myoblast fusion. *Exp Cell Res* 162, 411-422.
- Schoneich, C., Viner, R.I., Ferrington, D.A., Bigelow, D.J., 1999. Age-related chemical modification of the skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase of the rat. *Mech Ageing Dev* 107, 221-231.
- Schrader, M., Fahimi, H.D., 2004. Mammalian peroxisomes and reactive oxygen species. *Histochem Cell Biol* 122, 383-393.
- Schultz, E., 1996. Satellite cell proliferative compartments in growing skeletal muscles. *Dev Biol* 175, 84-94.
- Schwarz-Benmeir, N., Glaser, T., Barnoy, S., Kosower, N.S., 1994. Calpastatin in erythrocytes of young and old individuals. *Biochem J* 304 (Pt 2), 365-370.
- Schwarz, K.B., 1996. Oxidative stress during viral infection: a review. *Free Radic Biol Med* 21, 641-649.
- Shearer, T.R., Ma, H., Shih, M., Fukiage, C., Azuma, M., 2000. Calpains in the lens and cataractogenesis. *Methods Mol Biol* 144, 277-285.
- Sheehan, S.M., Allen, R.E., 1999. Skeletal muscle satellite cell proliferation in response to members of the fibroblast growth factor family and hepatocyte growth factor. *J Cell Physiol* 181, 499-506.
- Shevchenko, S., Feng, W., Varsanyi, M., Shoshan-Barmatz, V., 1998. Identification, characterization and partial purification of a thiol-protease which cleaves specifically the skeletal muscle ryanodine receptor/Ca²⁺ release channel. *J Membr Biol* 161, 33-43.
- Shiraha, H., Glading, A., Gupta, K., Wells, A., 1999. IP-10 inhibits epidermal growth factor-induced motility by decreasing epidermal growth factor receptor-mediated calpain activity. *J Cell Biol* 146, 243-254.

- Shiraha, H., Glading, A., Chou, J., Jia, Z., Wells, A., 2002. Activation of m-calpain (calpain II) by epidermal growth factor is limited by protein kinase A phosphorylation of m-calpain. *Mol Cell Biol* 22, 2716-2727.
- Short, K.R., Bigelow, M.L., Kahl, J., Singh, R., Coenen-Schimke, J., Raghavakaimal, S., Nair, K.S., 2005. Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 5618-5623.
- Shulga, N., Pastorino, J.G., 2006. Acyl coenzyme A-binding protein augments bid-induced mitochondrial damage and cell death by activating mu-calpain. *J Biol Chem* 281, 30824-30833.
- Siriett, V., Platt, L., Salerno, M.S., Ling, N., Kambadur, R., Sharma, M., 2006. Prolonged absence of myostatin reduces sarcopenia. *J Cell Physiol* 209, 866-873.
- Siriett, V., Salerno, M.S., Berry, C., Nicholas, G., Bower, R., Kambadur, R., Sharma, M., 2007. Antagonism of myostatin enhances muscle regeneration during sarcopenia. *Mol Ther* 15, 1463-1470.
- Siu, P.M., Pistilli, E.E., Alway, S.E., 2005. Apoptotic responses to hindlimb suspension in gastrocnemius muscles from young adult and aged rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289, R1015-1026.
- Smith, I.J., Lecker, S.H., Hasselgren, P.O., 2008. Calpain activity and muscle wasting in sepsis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295, E762-771.
- Snow, M.H., 1983. A quantitative ultrastructural analysis of satellite cells in denervated fast and slow muscles of the mouse. *Anat Rec* 207, 593-604.
- Sohal, R.S., Weindruch, R., 1996. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 273, 59-63.
- Solomon, V., Goldberg, A.L., 1996. Importance of the ATP-ubiquitin-proteasome pathway in the degradation of soluble and myofibrillar proteins in rabbit muscle extracts. *J Biol Chem* 271, 26690-26697.
- Solomon, V., Lecker, S.H., Goldberg, A.L., 1998. The N-end rule pathway catalyzes a major fraction of the protein degradation in skeletal muscle. *J Biol Chem* 273, 25216-25222.
- 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., Ishiura, S., Suzuki, K., 1993. A novel tissue-specific calpain species expressed predominantly in the stomach comprises two alternative splicing products with and without Ca(2+)-binding domain. *J Biol Chem* 268, 19476-19482.
- Sorimachi, H., Ishiura, S., Suzuki, K., 1997. Structure and physiological function of calpains. *Biochem J* 328 (Pt 3), 721-732.
- Spencer, M.J., Croall, D.E., Tidball, J.G., 1995. Calpains are activated in necrotic fibers from mdx dystrophic mice. *J Biol Chem* 270, 10909-10914.
- Spencer, M.J., Mellgren, R.L., 2002. Overexpression of a calpastatin transgene in mdx muscle reduces dystrophic pathology. *Hum Mol Genet* 11, 2645-2655.
- Stubgen, J.P., 1994. Limb girdle muscular dystrophy: description of a phenotype. *Muscle Nerve* 17, 1449-1455.
- Suzuki, K., Sorimachi, H., 1998. A novel aspect of calpain activation. *FEBS Lett* 433, 1-4.
- Suzuki, A., Kusakai, G., Kishimoto, A., Shimojo, Y., Miyamoto, S., Ogura, T., Ochiai, A., Esumi, H., 2004. Regulation of caspase-6 and FLIP by the AMPK family member ARK5. *Oncogene* 23, 7067-7075.
- Szulc, P., Duboeuf, F., Marchand, F., Delmas, P.D., 2004. Hormonal and lifestyle determinants of appendicular skeletal muscle mass in men: the MINOS study. *Am J Clin Nutr* 80, 496-503.

- T -

- Takabayashi, F., Tahara, S., Kaneko, T., Harada, N., 2004. Effect of green tea catechins on oxidative DNA damage of hamster pancreas and liver induced by N-Nitrosobis(2-oxopropyl)amine and/or oxidized soybean oil. *Biofactors* 21, 335-337.
- Takano-Ohmuro, H., Goldfine, S.M., Kojima, T., Obinata, T., Fischman, D.A., 1989. Size and charge heterogeneity of C-protein isoforms in avian skeletal muscle. Expression of six different isoforms in chicken muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 10, 369-378.
- Takano, J., Kawamura, T., Murase, M., Hitomi, K., Maki, M., 1999. Structure of mouse calpastatin isoforms: implications of species-common and species-specific alternative splicing. *Biochem Biophys Res Commun* 260, 339-345.
- Takeshima, H., Komazaki, S., Nishi, M., Iino, M., Kangawa, K., 2000. Junctophilins: a novel family of junctional membrane complex proteins. *Mol Cell* 6, 11-22.

- Takeshima, H., Shimuta, M., Komazaki, S., Ohmi, K., Nishi, M., Iino, M., Miyata, A., Kangawa, K., 1998. Mitsugumin29, a novel synaptophysin family member from the triad junction in skeletal muscle. *Biochem J* 331 (Pt 1), 317-322.
- Tang, H., Cheung, W.M., Ip, F.C., Ip, N.Y., 2000. Identification and characterization of differentially expressed genes in denervated muscle. *Mol Cell Neurosci* 16, 127-140.
- Tatsumi, R., Anderson, J.E., Nevoret, C.J., Halevy, O., Allen, R.E., 1998. HGF/SF is present in normal adult skeletal muscle and is capable of activating satellite cells. *Dev Biol* 194, 114-128.
- Tiffin, N., Adi, S., Stokoe, D., Wu, N.Y., Rosenthal, S.M., 2004. Akt phosphorylation is not sufficient for insulin-like growth factor-stimulated myogenin expression but must be accompanied by down-regulation of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase phosphorylation. *Endocrinology* 145, 4991-4996.
- Todd, B., Moore, D., Deivanayagam, C.C., Lin, G.D., Chattopadhyay, D., Maki, M., Wang, K.K., Narayana, S.V., 2003. A structural model for the inhibition of calpain by calpastatin: crystal structures of the native domain VI of calpain and its complexes with calpastatin peptide and a small molecule inhibitor. *J Mol Biol* 328, 131-146.
- Tompa, P., Emori, Y., Sorimachi, H., Suzuki, K., Friedrich, P., 2001. Domain III of calpain is a Ca^{2+} -regulated phospholipid-binding domain. *Biochem Biophys Res Commun* 280, 1333-1339.
- Tortora, G.J., Grabowski, S.R., & al., 1994. *Principe d'anatomie et de physiologie*. Anjou, CEC collégial et universitaire.
- Treisman, R., Ammerer, G., 1992. The SRF and MCM1 transcription factors. *Curr Opin Genet Dev* 2, 221-226.
- Turner, M.D., Cassell, P.G., Hitman, G.A., 2005. Calpain-10: from genome search to function. *Diabetes Metab Res Rev* 21, 505-514.
- Turner, P.R., Westwood, T., Regen, C.M., Steinhardt, R.A., 1988. Increased protein degradation results from elevated free calcium levels found in muscle from mdx mice. *Nature* 335, 735-738.

- U -

- Urtizbera, J.A., Bassez, G., Leturcq, F., Nguyen, K., Krahn, M., Levy, N., 2008. Dysferlinopathies. *Neurol India* 56, 289-297.

- V -

- Vanderklish, P.W., Bahr, B.A., 2000. The pathogenic activation of calpain: a marker and mediator of cellular toxicity and disease states. *Int J Exp Pathol* 81, 323-339.
- Van der Ven, P.F., Wiesner, S., Salmikangas, P., Auerbach, D., Himmel, M., Kempa, S., Hayess, K., Pacholsky, D., Taivainen, A., Schroder, R., Carpen, O., Furst, D.O., 2000. Indications for a novel muscular dystrophy pathway. gamma-filamin, the muscle-specific filamin isoform, interacts with myotilin. *J Cell Biol* 151, 235-248.
- Vandervoort, A.A., 2002. Aging of the human neuromuscular system. *Muscle Nerve* 25, 17-25.
- Vasyutina, E., Lenhard, D.C., Birchmeier, C., 2007. Notch function in myogenesis. *Cell Cycle* 6, 1451-1454.
- Verdijk, L.B., Koopman, R., Schaart, G., Meijer, K., Savelberg, H.H., van Loon, L.J., 2007. Satellite cell content is specifically reduced in type II skeletal muscle fibers in the elderly. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292, E151-157.
- Visser, M., Pahor, M., Taaffe, D.R., Goodpaster, B.H., Simonsick, E.M., Newman, A.B., Nevitt, M., Harris, T.B., 2002. Relationship of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha with muscle mass and muscle strength in elderly men and women: the Health ABC Study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 57, M326-332.
- Voisin, L., Breuille, D., Combaret, L., Pouyet, C., Taillandier, D., Arousseau, E., Obled, C., Attaix, D., 1996. Muscle wasting in a rat model of long-lasting sepsis results from the activation of lysosomal, Ca²⁺-activated, and ubiquitin-proteasome proteolytic pathways. *J Clin Invest* 97, 1610-1617.

- W -

- Wakelam, M.J., 1985. The fusion of α -alpastati. *Biochem J* 228, 1-12.
- Walling, A.D., 1999. Amyotrophic lateral sclerosis: Lou Gehrig's disease. *Am Fam Physician* 59, 1489-1496.
- Walker, M.P., Rajendra, T.K., Saieva, L., Fuentes, J.L., Pellizzoni, L., Matera, A.G., 2008. SMN complex localizes to the sarcomeric Z-disc and is a proteolytic target of calpain. *Hum Mol Genet* 17, 3399-3410.

- Walsh, K., 1997. Coordinate regulation of cell cycle and apoptosis during myogenesis. *Prog Cell Cycle Res* 3, 53-58.
- Walsh, K., Perlman, H., 1997. Cell cycle exit upon myogenic differentiation. *Curr Opin Genet Dev* 7, 597-602.
- Ward, W.F., Qi, W., Van Remmen, H., Zackert, W.E., Roberts, L.J., 2nd, Richardson, A., 2005. Effects of age and caloric restriction on lipid peroxidation: measurement of oxidative stress by F2-isoprostane levels. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 60, 847-851.
- Wasserman, W.W., Fickett, J.W., 1998. Identification of regulatory regions which confer muscle-specific gene expression. *J Mol Biol* 278, 167-181.
- Watt, F., Molloy, P.L., 1993. Specific cleavage of transcription factors by the thiol protease, m-calpain. *Nucleic Acids Res* 21, 5092-5100.
- Wegner, A., 1979. Equilibrium of the actin-tropomyosin interaction. *J Mol Biol* 131, 839-853.
- Weisleder, N., Ma, J., 2008. Altered Ca²⁺ sparks in aging skeletal and cardiac muscle. *Ageing Res Rev* 7, 177-188.
- Wendt, A., Thompson, V.F., Goll, D.E., 2004. Interaction of μ -calpastatine with calpain: a review. *Biol Chem* 385, 465-472.
- Willcox, J.K., Ash, S.L., Catignani, G.L., 2004. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit Rev Food Sci Nutr* 44, 275-295.
- Williams, A.B., Decourten-Myers, G.M., Fischer, J.E., Luo, G., Sun, X., Hasselgren, P.O., 1999. Sepsis stimulates release of myofilaments in skeletal muscle by a calcium-dependent mechanism. *Faseb J* 13, 1435-1443.

- X -

- Xiao, Y.Y., Wang, M.C., Purintrapiban, J., Forsberg, N.E., 2003. Roles of mu-calpain in cultured L8 muscle cells: application of a skeletal muscle-specific gene expression system. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 134, 439-450.

- Y -

Yaglom, J.A., Ekhterae, D., Gabai, V.L., Sherman, M.Y., 2003. Regulation of necrosis of H9c2 myogenic cells upon transient energy deprivation. Rapid deenergization of mitochondria precedes necrosis and is controlled by reactive oxygen species, stress kinase JNK, HSP72 and ARC. *J Biol Chem* 278, 50483-50496.

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, 459-463.

- Z -

Zangar, R.C., Davydov, D.R., Verma, S., 2004. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicol Appl Pharmacol* 199, 316-331.

Zhang, W., Lu, Q., Xie, Z.J., Mellgren, R.L., 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, 255-263.

Annexes

Publications:

Borges, J.P., Jauneau, A., **Brule, C.**, Culerrier, R., Barre, A., Didier, A., Rouge, P., 2006. The lipid transfer proteins (LTP) essentially concentrate in the skin of Rosaceae fruits as cell surface exposed allergens. *Plant Physiol Biochem* 44, 535-542.

Dargelos, E., **Brule, C.**, Combaret, L., Hadj-Sassi, A., Dulong, S., Poussard, S., Cottin, P., 2007. Involvement of the calcium-dependent proteolytic system in skeletal muscle aging. *Exp Gerontol* 42, 1088-1098.

Dargelos, E., Poussard, S., **Brule, C.**, Daury, L., Cottin, P., 2008. Calcium-dependent proteolytic system and muscle dysfunctions: a possible role of calpains in sarcopenia. *Biochimie* 90, 359-368.

Dargelos, E., **Brule, C.**, Stuelsatz, P., Mouly, V., Veschambre, P., Cottin, P., Poussard, S., 2009. Up-regulation of calcium-dependent proteolysis in human myoblasts under acute oxidative stress.

Exp Cell Res. doi:10.1016/j.yexcr.2009.07.025

Communications internationales:

Oxidative stress consequences on age-related loss of muscle mass could be mediated by calcium-dependent proteolysis. E. Dargelos, **C. Brulé**, P. Cottin, S. Poussard. Gordon Research Conference, Oxidative Stress & Disease Role of Oxidative Stress in Aging and Age-Related Disease March 8-13, 2009, Lucca (Barga), Italy.

Muscle ageing and calcium-dependent proteolytic system. **C. Brulé**, E. Dargelos, P. Cottin, S. Poussard. International congress of Myology, Myology 2008. Marseille, May 26-30 2008.

Encadrement :

J'ai eu l'honneur d'encadrer au cours de ma thèse plusieurs étudiants : 2 M2R, 1 M1R et 3 BTS

Review

Calcium-dependent proteolytic system and muscle dysfunctions: A possible role of calpains in sarcopenia

E. Dargelos*, S. Poussard, C. Brulé, L. Daury, P. Cottin

Université Bordeaux I, INRA USC-2009, Unité Protéolyse Croissance et Développement Musculaire,
ISTAB, avenue des facultés, 33405 Talence cedex, France

Received 14 June 2007; accepted 20 July 2007

Available online 31 July 2007

Abstract

The calcium-dependent proteolytic system is composed of cysteine proteases named calpains. They are ubiquitous or tissue-specific enzymes. The two best characterised isoforms are the ubiquitously expressed μ - and m-calpains. Besides its regulation by calcium, calpain activity is tightly controlled by calpastatin, the specific endogenous inhibitor, binding to phospholipids, autoproteolysis and phosphorylation. Calpains are responsible for limited proteolytic events. Among the multitude of substrates identified so far are cytoskeletal and membrane proteins, enzymes and transcription factors. Calpain activity is involved in a large number of physiological and pathological processes. In this review, we will particularly focus on the implication of the calcium-dependent proteolytic system in relation to muscle physiology.

Because of their ability to remodel cytoskeletal anchorage complexes, calpains play a major role in the regulation of cell adhesion, migration and fusion, three key steps of myogenesis. Calcium-dependent proteolysis is also involved in the control of cell cycle. In muscle tissue, in particular, calpains intervene in the regeneration process. Another important class of calpain substrates belongs to apoptosis regulating factors. The proteases may thus play a role in muscle cell death, and as a consequence in muscle atrophy. The relationships between calcium-dependent proteolysis and muscle dysfunctions are being further developed in this review with a particular emphasis on sarcopenia.

© 2007 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Calpain; Muscle; Aging; Apoptosis; Atrophy

1. The calcium-dependent proteolytic system

1.1. Introduction

Calpains are calcium-dependent cysteine proteinases active at neutral pH, first identified by Guroff et al. [1] in 1964 in rat brain. They are characterised by a typical cysteine protease catalytic triad also found in papain and cathepsin: Cys, Asn, and His. Two isoforms of this proteolytic system have been

extensively studied, μ - and m-calpains [2]. Their names refer to the calcium concentration they both require for their activation *in vitro*, 30–50 and 400–800 μ M for micro- and millicalpain, respectively. Early studies also identified calpastatin as the endogenous calpain inhibitor [3].

During the last three decades, more than 14 genes coding for calpains have been identified in mammals [2]. Two different classifications have been proposed for this family of proteases. One is based on the presence of EF-hand structures, which aid in distinguishing between typical and atypical calpains. The other classifies the proteases according to their expression pattern either ubiquitous or tissue-specific calpains. Calpain 3, for example, was thought to be exclusively expressed in skeletal muscle [4,5]. However, recent data have identified the protease in other tissues [6,7]. Although calpain 3 is highly homologous to the large subunit of μ - and m-calpain (see below), it contains

Abbreviations: ER, endoplasmic reticulum; GA, golgi apparatus; MARCKS, myristoylated alanine rich C-kinase substrate; TNF, tumor necrosis factor; ROS, reactive oxygen species; AIF, apoptosis inducing factor; EndoG, endonuclease G; mtDNA, mitochondrial DNA.

* Corresponding author. Tel.: +33 5 40 00 87 57; fax: +33 5 40 00 84 96.

E-mail address: e.dargelos@istab.u-bordeaux1.fr (E. Dargelos).

several specific regions that confer its unique functions [4,8,9]. Moreover, unlike μ - and m-calpains, calpain 3 has a monomeric structure of 94 kDa.

Micro- and milli-calpains, which are the best characterised isoforms of calpains, belong to the ubiquitous and typical classes. Both are heterodimers composed of a large subunit (80 kDa) and a small subunit (28 kDa). The 80 kDa subunit is encoded by two different genes, *capn1* and *capn2*, for μ - and m-calpain, respectively [10]. Until recently, the small subunit has been thought to be unique and common to both isoforms, however, a study has shown that two different small subunits (Css1 and Css2) can equally dimerise with the large subunit to form either the μ - or m-calpain [11].

The large subunit is also called the catalytic subunit since it contains the catalytic site. It is composed of four domains (Fig. 1). Domain I on the N-terminal part of the protein is unique and contains a site of autolysis. Domain II harbors the active site of the protease with the catalytic triad. Domain III contains a C2-like region involved in membrane phospholipid interaction [12] and an EF-hand structure at the junction with domain II [13]. It has also been shown that this domain can interact with calpastatin, the endogenous calpain inhibitor [14]. At the C-terminal part of the protein, domain IV is a calmodulin-like domain containing five EF-hand structures. While four EF-hand motifs are responsible for calcium binding, the fifth one, on the C-terminal edge, is involved in hetero-dimerisation with the small subunit [2].

The small subunit is composed of two domains (Fig. 1). Domain V, on the N-terminal part of the protein, is a glycine rich region which may be responsible for membrane interaction. Similar to domain I, domain V possesses a site of autolysis. Domain VI, highly homologous to domain IV, contains five EF-hands, and the fifth one is involved in the dimerisation with the catalytic subunit.

Crystallography experiments, carried out on rat and human m-calpain in the absence of calcium, have indicated that the structure of the protease is indeed more complex, which has been previously proposed [15]. Domain I is indeed shorter than has been described and interacts with domain VI of the

small subunit. The catalytic domain can be cleaved into two sub-domains: IIa which contains the Cys of the active site, and IIb which harbors the other two amino acids of the triad. In the absence of calcium, these two sub-domains are too far apart from each other to allow the formation of a functionally active site. Finally, domain III contains a linker region (18 aa) never before characterised. Further experiments carried out by Moldoveanu et al. [16] in 2002 compared the crystallographic structure of the protease both with and without calcium. This work, as illustrated by Benyamin [17] in 2006, clearly showed an intimate interaction between both subunits in the absence of calcium. Domain I is linked to domain VI, allowing the anchorage of domain II to the small subunit, while interaction between domains II and III is maintained by strong electrostatic bonds. Upon calcium binding, all these constraints are lost and result in bridging between sub-domains IIa and IIb thereby allowing the formation of an active site. Interestingly, these studies showed for the first time that calcium can bind domains I and II, thus suggesting a possible mechanism for activation of atypical calpains.

1.2. Regulation of calpain activity

While calpain structure is now well characterised, the activation model and regulation of calpain activity still remain topical issues. The calcium concentrations required by m- and μ -calpains in order for them to be activated have been clearly identified *in vitro*, however, how these high concentrations can be achieved *in vivo* has yet to be determined. To answer this question, several hypotheses have been proposed by the research groups working within the calpain field.

In 1981, autolysis was indicated to play a role in calpain activation [18]. In the presence of calcium, autolysis occurs at the N-terminal part of both subunits and this leads to the formation of a 76 kDa and 78 kDa large subunit for μ - and m-calpain, respectively. The autolysed regulatory subunit is 18 kDa [19,20]. The main consequence of this proteolytic event is a reduction of the calcium concentration necessary for calpain activation. This mechanism would suggest that calpains, like many other proteases, are synthesised as pro-enzymes and require a proteolytic step to become activated. However, the calcium levels necessary for the autolytic process are nevertheless still above physiological calcium concentrations. Moreover, mutation experiments to inhibit autolysis did not affect calpain activity [21], and calpain oxidation treatment abolished the protease activity without affecting the autolytic process [22]. Furthermore, the crystallographic structure of m-calpain clearly showed that the peptide cleaved during autolysis cannot be considered as a pro-peptide *per se* since it does not block the active site of the protease in the absence of calcium [23].

In 1984, interactions with phospholipids (phosphatidylinositol, phosphatidylserine) were shown to reduce the calcium concentration necessary for calpain activation and increase the hydrolysis rate of a calpain substrate [24,25]. However, in these experiments, the ratios of phospholipids/calpain used were again high above that which is encountered *in vivo*.

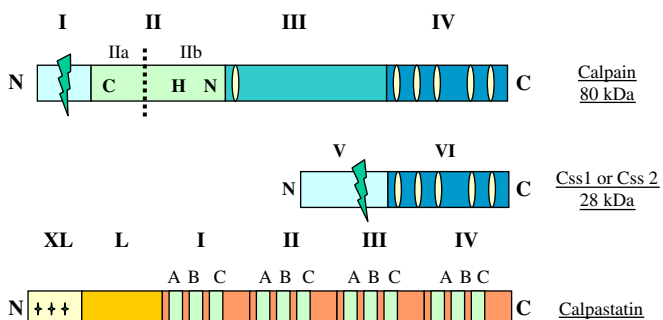


Fig. 1. Schematic diagram of the μ - and m-calpain catalytic subunit (80 kDa), regulatory subunit (28 kDa) and calpastatin. EF-hand structures are shown as yellow discs. Sites of autolysis are represented by green lightning bolts. Sub-domains IIa and IIb are indicated and separated by a dotted line. C, H and N are the amino acids constituting the catalytic triad. The three stars in the calpastatin XL domain schematise the PKA-dependent phosphorylation sites.

One main role in the regulation of calpain activity is probably played by the small subunit. In the study of a mouse knock-out model, the absence of protein was shown to be lethal at the embryonic stage, clearly demonstrating the major importance of the small subunit for calpain activity [26]. However, the exact role played by the 28 kDa protein still remains elusive. According to some researchers, it could be involved in the regulation of calpain activity or act as a guarantor of correct folding of the catalytic subunit as a chaperone [27]. During the last 30 years, different opinions have been discussed regarding the role of subunit dissociation in calpain activation [2]. However, the most recent data tend to indicate that calpain heterodimers constitute the active form of the proteases [28].

Phosphorylation events have also been shown to play a role in the regulation of calpain activity. Milli- and micro-calpains can indeed be phosphorylated on two Tyr, three Ser and three or four Thr residues depending on the isoform [2]. These post-translational modifications can have opposing effects on the activity of the protease. For example, m-calpain phosphorylation of Ser 50 by the ERK/MAPK pathway leads to the protease activation [29]. On the other side, PKA can inhibit m-calpain activity by phosphorylation on Ser 369/Thr 370 [30].

At last, some authors have identified, in different tissues, small proteins (isovalerylcarnitine or acyl-CoA binding protein) able to interact with m- or μ -calpain and reduce the calcium concentration required for their activation [31,32]. The existence of such activators still remains controversial.

1.3. Calpastatin

Calpastatin plays a central role in the regulation of calpain activity. This protein is heat stable and resistant to urea and SDS treatment [33,34]. A single gene encodes for calpastatin. However, due to alternate RNA splicing and the presence of several promoters, more than eight different isoforms of calpastatin have been identified so far in mammals [35–37]. Calpastatin has a non-globular structure and this results in abnormal migration in SDS-PAGE. Consequently, the molecular weight of calpastatin is widely overestimated and varies from 20 kDa to 145 kDa, depending on the isoforms.

Calpastatin contains six domains (Fig. 1). XL domain is located at the N-terminus part of the protein. This region is absent from the protein in some variants. It contains phosphorylation sites for PKA [38]. Phosphorylation could be involved in the regulation of calpastatin activity and localisation [39]. Domain L harbors alternative promoters and multiple splice sites. A recent study also showed that domain L mediates interactions with calpains in a calcium-independent manner [40]. Calpastatin also contains four homologous domains, named inhibitor domains I–IV. Each of these regions is able to inhibit one molecule of calpain, so that in theory one molecule of calpastatin should be able to inhibit four molecules of calpains. However, each domain has a different affinity for calpain and the dissociation constant (K_d) is lowest (<3 nM) for the whole molecule [41]. Each of these domains is composed of three small repeat regions named A, B and C.

Region B possesses inhibitory activity, regions A and C do not have any inhibitory activity but act to potentiate region B [42].

In the presence of calcium, region A interacts with domain IV and region C with domain VI, thereby positioning the inhibitory region B in the vicinity of the active site of calpains [42,43]. Since calpastatin interaction with both calpain subunits is required for proper inhibition, only heterodimeric isoforms of calpain can be regulated by calpastatin.

1.4. Localisation

Although μ - and m-calpains are ubiquitously expressed, their relative expression levels are tightly regulated between different tissue types [44]. Usually, calpains and calpastatin co-localise in the cytoplasm, however, the proteases are able to translocate to several intracellular domains such as ER, GA, caveolae and plasma membranes [45,46]. Calpains have also been identified in the nucleus of myogenic cells [47,48]. In 2003, Gil-Parrado et al. [28] showed that following the induction of a calcium influx, μ -calpain relocated to the plasma membrane of the cells while calpastatin remained in the cytoplasm. This translocation allowed μ -calpain to move away from its endogenous inhibitor and therefore also accounted for activation.

1.5. Substrates

Calpains are responsible for limited proteolytic events. The proteases hydrolyse their substrates at a limited number of sites, which lead to the regulation of their activity rather than their degradation. Substrate specificity is homologous for both calpain isoforms. It is mainly influenced by the three-dimensional structure of the proteins rather than the primary sequence as has been proposed in the past [49]. Moreover the phosphorylation status of calpain substrates also has an impact on cleavage by the proteases [50].

More than a hundred proteins have been identified as calpain targets *in vitro*. Among these are cytoskeletal proteins (talin, vinculin, MARCKS, etc.) [51–53], proteins involved in signal transduction (PKC, FAK, etc.) [54,55] or transcription factors (C/EBP, p53, etc.) [56,57]. This broad spectrum of calpain substrates, together with their regulation by calcium, phospholipids and phosphorylation, place the calcium-dependent proteolytic system at the centre of multiple cell signal pathways.

Consequently, calpain activity is involved in a large number of physiological processes. In this review, we will particularly focus on the implication of the calcium-dependent proteolytic system in relation with muscle physiology.

1.6. Synthetic calpain inhibitors

Since calpains are involved in a wide range of cellular processes, a deregulation of their activity is associated with numerous diseases (Alzheimer disease, stroke, cataract formation, type 2 diabetes mellitus, muscular dystrophies, etc.). Therefore, the proteases have a major therapeutic potential and a lot of effort has been made in the search of synthetic calpain inhibitors.

Inhibitors can be divided into two groups of compounds: peptidic and non-peptidic inhibitors [58]. Among the peptidic molecules, some are reversible inhibitors and others are irreversible. On the other side, non-peptidic compounds are all reversible non-competitive inhibitors [59].

One major drawback, shared by all these molecules, is a lack of specificity. Indeed, most of these inhibitors have also a potential inhibitory effect on other proteases (cathepsins, proteasome, and caspases) [2]. However, the new generation of non-peptidic compounds seems to have a greater specificity for calpains [60].

Many of the calpain inhibitors have been tested *in vitro* and *in vivo* for their neuroprotective potential [58]. In muscle, up-regulation of calpain activity has been largely involved in the pathogenesis of DMD. Several studies, carried out in dystrophic muscle, have shown a significant reduction of muscle degeneration after calpain inhibitors' administration. In 1986, Komatsu et al. [61] observed the efficiency of the administration of E-64d to mdx mice. Similar observation has been made using leupeptin treatment [62]. More recently, a new generation of calpain inhibitors has been tested as potential treatment for muscle dystrophy, with great results in mdx mice [63,64].

In conclusion, development of powerful specific calpain inhibitor represents a major challenge for the treatment of many diseases in the future.

2. Calcium-dependent proteolytic system and muscle physiology

2.1. Cell motility

Calpains have been largely involved in the remodelling of cytoskeletal anchorage complexes [65]. This phenomenon plays a major role in the regulation of cell adhesion, migration and even fusion, three key steps of myogenesis.

The relationship between calpain activity and myogenesis has been extensively studied and the requirement of calpain activity during each stage of muscle cell differentiation has been clearly demonstrated. First, Balcerzak et al. [66] showed that m-calpain activity was imperative for correct myoblast fusion. These data confirmed earlier work carried out in 1986 by Schollmeyer et al. [67]. Cleavage of desmin, talin, MARCKS and fibronectin by the protease was shown to modify membrane fluidity and cytoskeletal organisation thereby allowing myoblasts to fuse [68,53]. The precise timing of m-calpain activity seems to be very important during this process. In the same regard, the protease activity is tightly regulated by calpastatin expression levels during myogenesis [69,70].

One crucial step in myogenesis preceding fusion is the migration of myoblasts. Several studies have shown involvement of the calcium-dependent proteolytic system in this process. Inhibition of both ubiquitous calpains, for example, leads to the reduction of myoblast migration in cell culture [71]. Migration can be considered as the succession of the process of adhesion and de-adhesion. Both calpains play distinct roles in each of these steps which culminate in the correct migration of myogenic cells. At the leading edge of the cell, μ -calpain controls

the adhesion step *via* the regulation of Rho GTPases, proteins involved in the formation of lamellipodes, focal adhesions and stress fibres [72]. At the rear edge of the cell, m-calpain is responsible for the de-adhesion step and accomplishes this by cleaving talin, paxillin, FAK, cortactin and spectrin. The result is the disorganisation of focal adhesions [51,73].

2.2. Cell cycle

As mentioned above, calpains are able to cleave various transcription factors. Among these proteins are regulatory members of cell cycle control. Indeed several studies have shown that ubiquitous calpains are involved in this important cellular event. In 2004, Honda et al. [74] demonstrated that m-calpain is required for correct chromosome alignment during mitosis. Others have observed that MAPK-dependent degradation of p27Kip1 is mediated by calpains [75]. Moreover, numerous transcription factors involved in cell cycle control are known to be inactivated by calpain cleavage, for example: cyclin D1, c-jun, c-fos, p53, etc. [76,77,57].

In the context of muscle cell biology, a role of calpains in cell cycle regulation would have a major impact on muscle regeneration. Recent observations clearly demonstrate that inhibition of calpain activity repress the progression of myogenic cells through the G1 stage of the cell cycle [48]. After induction of regeneration, the same authors showed a translocation of m-calpain to the nucleus of satellite cells. Altogether, these data indicate that the protease probably plays a major role in the initiation of muscle regeneration.

2.3. Apoptosis

Another important class of calpain substrates is involved in apoptosis. Two major pathways lead to cellular apoptosis (Fig. 2). The extrinsic pathway is activated by the interaction between a cell death signal (TNF) and its membrane receptor on the cell surface. This signal induces an initiator caspase (8 or 10), and consequently an executioner caspase (3, 6 or 7), which will then mediate apoptosis [78]. The intrinsic pathway, triggered by ER stress, can induce apoptosis *via* different routes. Initially, intracellular calcium concentration increases, leading to the m-calpain (or caspase 7)-dependent activation of caspase 12 and then apoptosis *via* an executioner caspase [79,80]. In parallel, increasing calcium levels induces calpain-dependent activation of proteins involved in mitochondrial membrane permeability (Bid, Bax). As a result and depending on the relative level of Bcl2 regulators, pro-apoptotic factors are released from the mitochondria [81]. Two distinct pathways can then be activated, one is caspase-independent and involves AIF, which will directly trigger apoptosis [80]. The second one requires formation of the apoptosome (cytochrome *c*/Apaf1/caspase 9), which will then activate caspase 3-dependent apoptosis [82].

Many of the aforementioned proteins are potential calpain substrates. Depending on the signal received by the cell, calpains will behave as pro- or anti-apoptotic factors. For example, calpain-dependent hydrolysis of caspase 12, caspase 3, Bid,

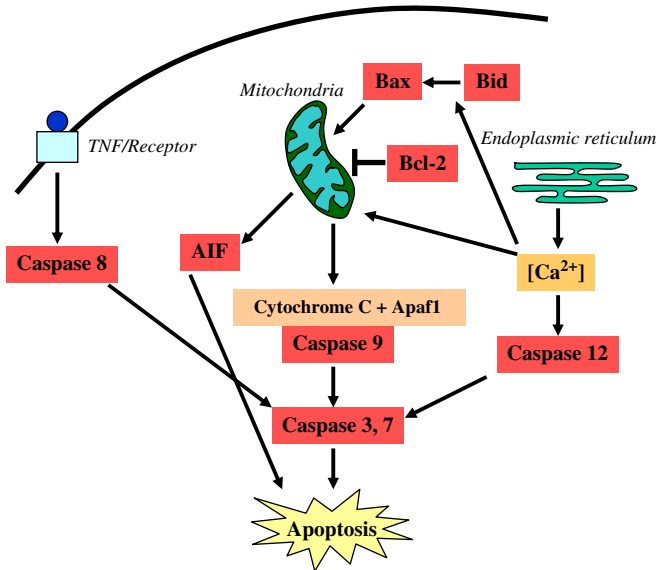


Fig. 2. Simplified scheme showing the potential pathways leading to apoptosis in skeletal muscle. The “extrinsic pathway” is switched on after the interaction of a death signal receptor with its ligand, it involves a caspase-dependent cascade. The “intrinsic pathway” is mediated by the endoplasmic reticulum and can lead to apoptosis through mitochondria-dependent or independent mechanisms. Proteins pictured in red squares are known calpain substrates.

Bax, Bcl2 and AIF has been found to induce apoptosis [83–86] while cleavage of caspase 3, 7, 8, 9 by the proteases has anti-apoptotic consequences [87,88].

Due to the broad involvement of calpain activity in the regulation of physiological processes, any alteration of this proteolytic system will result in severe dysfunctions.

3. Calcium-dependent proteolytic system and muscle atrophies

Calcium-dependent proteolysis has been largely involved in different types of muscle atrophies [89]. In this review, we will focus solely on muscular dystrophy and sarcopenia.

3.1. Duchenne muscular dystrophy (DMD)

Duchenne muscular dystrophy (DMD) (and the mice model *mdx*) occurs as a result of the inheritance of mutations in the dystrophin gene [90]. The 427 kDa protein links actin to the sarcoglycans proteins forming a complex termed dystrophin glycoprotein complex (DGC) [91]. This complex is responsible for maintaining membrane integrity and structural stability. Upon dystrophin alteration, both functions are impaired and this leads to an increased efflux of calcium [92]. As a consequence, calpain expression and activity are increased in addition to increased levels of protein degradation [93–95]. Over-expression of calpastatin in *mdx* muscle was shown to reduce the dystrophic phenotype, thus clearly demonstrating that indeed calpains play a central role in the aetiology of this disease [96]. However, several hypotheses can be proposed concerning the effect of calcium-dependent proteolysis during muscular dystrophy. The proteases could trigger unregulated

proteolysis thereby leading to necrosis. Alternatively they can also influence gene regulation. Calpains have been shown to cleave calcium leak channels, thus increasing the calcium influx. Moreover, *via* apoptosis induction, increased calpain activity could also account for a reduction in the number of satellite cells, observed in the dystrophic muscle [97].

3.2. LGMD2A

Most of the limb-girdle muscular dystrophies are myopathies caused by gene mutations which affect structural proteins. However, LGMD2A is due to mutations affecting *capn3* gene coding for the skeletal muscle specific isoform of calpain, calpain 3 [98]. More than 200 different mutations have been mapped, and most of these result in the loss of proteolytic activity [99,100]. Since calpain 3 expression is confined to skeletal muscle, no reports involving cardiac muscle have been found. From a cellular point of view, biopsies from patients are characterised by fibres with necrosis/regeneration, myofibrillar disorganisation and altered mitochondria [101].

Like μ - and m -calpains, calpain 3 is thought to be involved in many intracellular processes. One of the early functions proposed for calpain 3 was sarcomere remodelling. Poussard et al. [5] showed, for example, that partial inhibition of calpain 3 expression by antisense oligonucleotides leads to the disorganisation of the sarcomeres. Similar results were later observed in C3KO mice myotubes [102]. Calpain 3 is strongly associated with a giant cytoskeletal protein, titin, which plays a major role in sarcomere assembly and function [103]. One of the main characteristics of calpain 3 is its rapid autolysis; making it very difficult to analyse *in vitro* [104]. Recent data indicate that calpain 3 interaction with titin can stabilise it and prevent autolysis *in vivo* [105]. One possibility would be that mutations affecting the interaction capacity of the protease with titin would then result in impaired proteolytic activity. Another protein which interacts with calpain 3 is dysferlin [106]. Interestingly, mutations affecting this protein are responsible for LGMD2B and reduction of calpain 3 has been observed in this myopathy [107]. Dysferlin is a transmembrane protein involved in membrane repair. However, to date no data have been presented which clearly demonstrate a role of calpain 3 in that process. Similar to ubiquitous calpains, calpain 3 is able to cleave many cytoskeletal proteins and can thus intervene in cytoskeleton regulation, particularly during processes such as adaptive response to exercise or regeneration after muscle wasting. Filamin C, a protein linking the sarcolemma with Z-disk appears to be a good candidate as one calpain 3 target during LGMD2A. Indeed, mutations in the filamin gene lead to a phenotype very close to the LGMD phenotype [108]. During sarcomere remodelling, calpain 3 would cleave several myofibrillar proteins, making them accessible for further degradation by the ubiquitin–proteasome pathway. A lack of calpain 3 activity would thus result in the alteration of myofibrillar turnover and probably lead to LGMD2A [109]. Finally, one known calpain 3 substrate is I κ B α . This protein is involved in the sequestration of NF κ B in the cytoplasm, thus preventing the activation of genes important for

cell survival. As a consequence, in the case of LGMD2A, a drop in calpain 3 activity would result in increased apoptosis events [110].

In conclusion, calpain 3 proteolysis impairment leads to LGMD2A. However, which intracellular pathway is altered and therefore results in muscular dystrophy still remains controversial.

3.3. Sarcopenia

Aging is associated with the progressive and involuntary loss of muscle mass also known as sarcopenia [111]. This condition, which reduces the number and the size of muscle fibres [112], affects all aged people independent of their overall health status. Because of the severe muscle loss observed, sarcopenia has a major impact on the quality of life of a senior as a result of an increased incidence of falls and bone fractures.

The aetiology of sarcopenia still remains obscure and this condition is probably a multifactorial process, involving inactivity, malnutrition, hormonal changes and acute chronic inflammation [113].

From a cellular point of view, sarcopenia is characterised by two major modifications: ROS accumulation and the reduction of cellular ATP content [114].

One major characteristic of aged muscle, known to consume high levels of oxygen, is the accumulation of mutations in mtDNA [115]. Since components of the respiratory chain are encoded by mtDNA, these mutations result in its dysfunction. Consequently, as a result of a positive feedback loop on mtDNA mutations, ROS would accumulate and ATP production would be impaired (Fig. 3).

ROS accumulation is known to cause deleterious effects on proteins, lipids and DNA. Interestingly, oxidative stress can regulate calcium-dependent proteolysis. Experiments carried

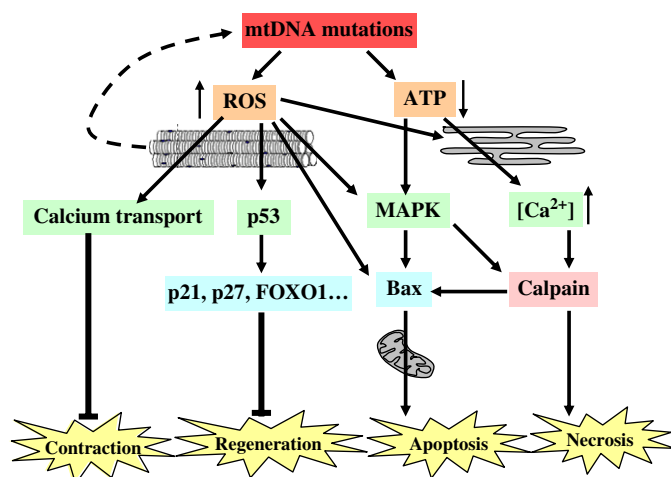


Fig. 3. Simplified scheme showing the hypothetical pathways responsible for the sarcopenic phenotype. Accumulation of mtDNA mutations triggers ROS production and ATP-depletion. Consequently, oxidative stress damages proteins, leading to impaired muscle contraction, regeneration and also cell death. In a similar way, the reduction of ATP level activates various signalling pathways resulting in apoptosis or necrosis.

out on chick myotubes indicate that H₂O₂ is able to up-regulate cathepsin and proteasome in addition to calpain activities [116].

In sarcoplasmic reticulum, oxidation of proteins involved in calcium transport results in dysfunctional excitation/contraction coupling and impaired muscle contraction [117].

Proteins involved in cell cycle regulation have also been shown to be affected by ROS accumulation. In satellite cells, oxidative stress results in p53 accumulation and subsequent up-regulation of p21, p27 and FOXO1, transcription factors involved in the control of the cell cycle arrest [118]. It thus appears that oxidative stress is able to interfere with muscle regeneration. At this stage, it is necessary to be mindful of two different facts: first calpains are closely linked to myogenic cell proliferation, migration and differentiation [48,71,53]; second, the aforementioned transcription factors are known to be substrates of the proteases [57,75]. It thus appears that calpains surely participate in these mechanisms.

ROS accumulation can also play a role in cell death and apoptosis *via* oxidation of MAPKs (ERKs and p38-MAPK), Bax or by inducing calcium release from the ER [119–121]. Interestingly, calpain activity, known to be regulated by MAPK-dependent pathways [29,30], could therefore be affected by oxidative stress. The drop in ATP levels would also cause major disturbances in the cells leading to necrosis or apoptosis depending on the level of ATP. If the critical threshold is not reached, accumulating AMP will activate AMPK pathway leading to apoptosis [122]. Even if the exact mechanism has yet to be demonstrated, ATP-depletion induces a mitochondrial-dependent apoptosis process *via* Bax translocation [122]. The drop of energy can also trigger a stress in ER, which results in apoptosis [123].

According to some researchers, apoptosis associated with sarcopenia could involve calpain-dependent proteolysis rather than caspase-dependent mechanisms [124]. Strengthening this idea, μ -calpain has been localised to mitochondria [125] and in addition several calpain substrates have been recently identified among components of the respiratory chain [126,127]. AIF and EndoG pro-apoptotic factors, which can be released from mitochondria by calpain activity, have been shown to be up-regulated in the sarcopenic muscle [124,128]. Furthermore, caspase 12, known to be activated by m-calpain cleavage, was found to be more active in aged muscle [124].

Finally it is important to highlight that aging muscle is associated with the modification of calcium homeostasis. Resting calcium concentrations have indeed been shown to increase with age [129,130]. As a result, abnormal increase in calpain activity could account for myofibril degradation and necrosis, but also for the impairment in satellite cells' proliferation and migration observed in sarcopenic muscle [130,121]. Little information has been gathered concerning a potential role for calcium-dependent proteolysis in relation to sarcopenia. However, increased calpain activity has already been reported in the aging process of several different tissues [131–133].

In the light of these data and personal data, the calcium-dependent proteolytic system undoubtedly plays a pivotal role in the appearance of the sarcopenic phenotype. However,

which intracellular calpain-dependent pathway is being affected during muscle aging remains to be elucidated.

Acknowledgements

The authors acknowledge Dr. Deborah Farmer for English correction and Pascal Stuelsatz for his critical input, particularly concerning LGMD2A.

References

- [1] G. Guroff, A neutral calcium-activated proteinase from the soluble fraction of rat brain, *J. Biol. Chem.* 269 (1964) 30457–30460.
- [2] D.E. Goll, V.F. Thompson, H. Li, W. Wei, J. Cong, The calpain system, *Physiol. Rev.* 83 (2003) 731–801.
- [3] W.R. Dayton, D.E. Goll, M.G. Zeece, R.M. Robson, W.J. Reville, A Ca^{2+} -activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Purification from porcine muscle, *Biochemistry* 15 (1976) 2150–2158.
- [4] H. Sorimachi, N. Toyama-Sorimachi, T.C. Saïdo, H. Kawasaki, H. Sugita, M. Miyasaka, K. Arahata, S. Ishiura, K. Suzuki, Molecular cloning of a novel mammalian calcium-dependent protease distinct from both m- and μ -types. Specific expression of the mRNA in skeletal muscle, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 20106–20111.
- [5] S. Poussard, M. Duvert, D. Balcerzak, S. Ramassamy, J.J. Brustis, P. Cottin, A. Ducastaing, Evidence for implication of muscle-specific calpain (p94) in myofibrillar integrity, *Cell. Growth Differ.* 7 (1996) 1461–1469.
- [6] N. König, F. Raynaud, H. Feane, M. Durand, N. Mestre-Frances, M. Rossel, A. Ouali, Y. Benyamin, Calpain 3 is expressed in specific glial cells of the rodent and primate brain, *J. Chem. Neuroanat.* 25 (2003) 129–136.
- [7] A. Marcilhac, F. Raynaud, I. Clerc, Y. Benyamin, Detection and localization of calpain 3-like protease in a neuronal cell line: possible regulation of apoptotic cell death through degradation of nuclear I κ B α , *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38 (2006) 2128–2140.
- [8] L.V.B. Anderson, K. Davidson, J.A. Moss, I. Richard, M. Fardeau, F.M. Tome, C. Hubner, A. Lasa, J. Colomer, J.S. Beckmann, 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 (1998) 1169–1179.
- [9] B.G. Diaz, T. Moldoveanu, M.J. Kuiper, R.L. Campbell, P.L. Davies, Insertion sequence 1 of muscle-specific calpain, p94, acts as an internal propeptide, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 27656–27666.
- [10] S. Ohno, S. Minoshima, J. Kudoh, R. Fukuyama, Y. Shimizu, S. Ohmi-Imajoh, N. Shimizu, K. Suzuki, Four genes for the calpain family locate on four distinct human chromosomes, *Cytogenet. Cell Genet.* 33 (1990) 225–229.
- [11] E. Schäd, A. Farkas, G. Jekely, P. Tompa, P. Friedrich, A novel human small subunit of calpains, *Biochem. J.* 362 (2002) 383–388.
- [12] P. Tompa, R. Toth-Boconadi, P. Friedrich, Frequency decoding of fast calcium oscillations by calpain, *Cell Calcium* 29 (2001) 161–170.
- [13] K. Andresen, T.D. Tom, M. Strand, Characterization of cDNA clones encoding a novel calcium-activated neutral proteinase from *Schistosoma mansoni*, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 15085–15090.
- [14] A. Wendt, V.F. Thompson, D.E. Goll, Interaction of calpastatin with calpain: a review, *Biol. Chem.* 385 (2004) 465–472.
- [15] D. Reverter, S. Strobl, C. Fernandez-Catalan, H. Sorimachi, K. Suzuki, W. Bode, Structural basis for possible calcium-induced activation mechanisms of calpains, *Biol. Chem.* 382 (2001) 753–766.
- [16] T. Moldoveanu, C.M. Hosfield, D. Lim, J.S. Elce, Z. Jia, P.L. Davies, A Ca^{2+} switch aligns the active site of calpain, *Cell* 108 (2002) 649–660.
- [17] Y. Benyamin, The structural basis of calpain behavior, *FEBS J.* 273 (2006) 3413–3414.
- [18] K. Suzuki, S. Tsuji, S. Ishiura, Y. Kimura, S. Kubota, K. Imahori, Autolysis of calcium-activated neutral protease of chicken skeletal muscle, *J. Biochem. (Tokyo)* 90 (1981) 787–793.
- [19] U.J. Zimmerman, W.W. Schlaepfer, Two-stage autolysis of the catalytic subunit initiates activation of calpain I, *Biochim. Biophys. Acta* 1078 (1991) 192–198.
- [20] N. Brown, C. Crawford, Structural modifications associated with the change in Ca^{2+} sensitivity on activation of m-calpain, *FEBS Lett.* 322 (1993) 65–68.
- [21] J.S. Elce, C. Hegadorn, J.S.C. Arthur, Autolysis, Ca^{2+} -requirement, and heterodimer stability in m-calpain, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 11268–11275.
- [22] R.P. Guttman, J.S. Elce, P.D. Bell, J.C. Isbell, G.V.W. Johnson, Oxidation inhibits substrate proteolysis by calpain I but not autolysis, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 2005–2012.
- [23] S. Strobl, C. Fernandez-Catalan, M. Braun, R. Huber, H. Masumoto, K. Nakagawa, A. Irie, H. Sorimachi, G. Bourenkow, H. Bartunik, K. Suzuki, W. Bode, 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 (2000) 588–592.
- [24] S.A. Coolican, D.R. Hathaway, Effect of $\text{L-}\alpha$ -phosphatidylinositol on a vascular smooth muscle Ca^{2+} -dependent protease, *J. Biol. Chem.* 259 (1984) 11627–11630.
- [25] T.C. Saïdo, M. Shibata, W.A. Takenawa, H. Murofushi, K. Suzuki, Positive regulation of mu-calpain action by phosphoinositides, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 24585–24590.
- [26] J.S. Arthur, J.S. Elce, C. Hegadorn, K. Williams, P.A. Greer, Disruption of the murine calpain small subunit gene, *Capn4*: calpain is essential for embryonic development but not for cell growth and division, *Mol. Cell. Biol.* 20 (2000) 4474–4481.
- [27] T. Yoshizawa, H. Sorimachi, S. Tomioka, S. Ishiura, K. Suzuki, A catalytic subunit of calpain possesses full proteolytic activity, *FEBS Lett.* 358 (1995) 101–103.
- [28] S. Gil-Parrado, O. Popp, T.A. Knoch, S. Zahler, F. Bestvater, M. Felgentrager, A. Holloschi, A. Fernandez-Montalvan, E.A. Auerswald, H. Fritz, P. Fuentes-Prior, W. Machleidt, E. Spiess, Subcellular localization and in vivo subunit interactions of ubiquitous mu-calpain, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 16336–16346.
- [29] A. Glading, R.J. Bodnar, I.J. Reynolds, H. Shihara, L. Satish, D.A. Potter, H.C. Blair, A. Wells, Epidermal growth factor activates m-calpain (calpain II), at least in part, by extracellular signal-mediated phosphorylation, *Mol. Cell. Biol.* 24 (2004) 2499–2512.
- [30] H. Shiraha, A. Glading, J. Chou, Z. Jia, A. Wells, Activation of m-calpain (calpain II) by epidermal growth factor is limited by protein kinase A phosphorylation of m-calpain, *Mol. Cell. Biol.* 22 (2002) 2716–2727.
- [31] S. Pontremoli, P.L. Viotti, M. Michetti, B. Sparatore, F. Salamino, E. Melloni, Identification of an endogenous activator of calpain in rat skeletal muscle, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 171 (1990) 569–574.
- [32] E. Melloni, M. Averna, F. Salamino, B. Sparatore, R. Minafra, S. Pontremoli, Acyl-CoA-binding protein is a potent m-calpain activator, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 82–86.
- [33] A. Okitani, D.E. Goll, M.H. Stromer, R.M. Robson, Intracellular inhibitor of a Ca^{2+} -activated protease involved in myofibrillar protein turnover, *Fed. Proc.* 35 (1976) 1746.
- [34] Y. Otsuka, D.E. Goll, Purification of the Ca^{2+} -dependent proteinase inhibitor from bovine cardiac muscle and its interaction with the millimolar Ca^{2+} -dependent proteinase, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 5839–5851.
- [35] G.H. Geesink, D. Nonneman, M. Koohmaraie, An improved purification protocol for heart and skeletal muscle calpastatin reveals two isoforms resulting from alternative splicing, *Arch. Biochem. Biophys.* 356 (1998) 19–24.
- [36] T. Parr, P.L. Sensky, R.G. Bradley, P.J. Buttery, Calpastatin expression in porcine cardiac and skeletal muscle and partial gene structure, *Arch. Biochem. Biophys.* 395 (2001) 1–13.
- [37] J. Takano, M. Watanabe, K. Hitomi, M. Maki, Four types of calpastatin isoforms with distinct amino-terminal sequences are identified by alternative first exons and differentially expressed in mouse tissues, *J. Biochem.* 128 (2000) 83–92.
- [38] M. Cong, V.F. Thompson, D.E. Goll, P. Antin, 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 (1998) 660–666.
- [39] M. Averna, R. De Tullio, P. Capini, F. Salamino, S. Pontremoli, E. Melloni, Changes in calpastatin localization and expression during calpain activation: a new mechanism for the regulation of intracellular Ca²⁺-dependent proteolysis, *Cell. Mol. Life Sci.* 60 (2003) 2669–2678.
- [40] E. Melloni, M. Averna, R. Stifanese, R. De Tullio, E. Defranchi, F. Salamino, S. Pontremoli, Association of calpastatin with inactive calpain. A novel mechanism to control the activation of the protease? *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 24945–24954.
- [41] C. Crawford, Protein and peptide inhibitors of calpains, in: *Intracellular Calcium-dependent Proteolysis*, CRC, Boca Raton, FL, 1990, pp. 75–89.
- [42] B. Todd, D. Moore, C.C. Deivanayagam, G.D. Lin, D. Chattopadhyay, M. Maki, K.K. Wang, S.V. Narayana, A structural model for the inhibition of calpain by calpastatin: crystal structures of the native domain VI of calpain and its complexes with calpastatin peptide and a small molecule inhibitor, *J. Mol. Biol.* 328 (2003) 131–146.
- [43] P. Cottin, P.L. Vidalenc, A. Ducastaing, A Ca²⁺-dependent association between a Ca²⁺-activated neutral protease (CaANP) and its specific inhibitor, *FEBS Lett.* 136 (1981) 221–224.
- [44] S. Kawashima, S. Hayashi, Y. Saito, Y. Kasai, K. Imahori, Tissue distribution of calcium-activated neutral proteinases in rat, *Biochem. Biophys. Acta* 965 (1988) 130–135.
- [45] S. Goudenege, S. Poussard, S. Dulong, P. Cottin, Biologically active milli-calpain associated with caveolae is involved in a spatially compartmentalised signalling involving protein kinase C alpha and myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS), *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37 (2005) 1900–1910.
- [46] J.L. Hood, W.H. Brooks, T.L. Roszman, Subcellular mobility of the calpain/calpastatin network: an organelle transient, *Bioessays* 28 (2006) 850–859.
- [47] J. Moraczewski, E. Piekarska, S. Bonavaud, K. Wosinska, B. Chazaud, G. Barlovatz-Meimon, Differential intracellular distribution and activities of mu- and m-calpains during the differentiation of human myogenic cells in culture, *C. R. Acad. Sci. III* 319 (1996) 681–686.
- [48] F. Raynaud, G. Carnac, A. Marcihac, Y. Benyamin, m-Calpain implication in cell cycle during muscle precursor cell activation, *Exp. Cell Res.* 298 (2004) 48–57.
- [49] P.R. Stabach, C.D. Cianci, S.B. Glantz, Z. Zhang, J.S. Morrow, Site-directed mutagenesis of α IIspectrin at codon 1175 modulates its μ -calpain susceptibility, *Biochemistry* 36 (1997) 57–65.
- [50] M. Elvira, J.A. Diez, K.K. Wang, A. Vilalobo, Phosphorylation of connexin-32 by protein kinase C prevents its proteolysis by mu-calpain and m-calpain, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 14294–14300.
- [51] S.J. Franco, M.A. Rodgers, B.J. Perrin, J. Han, D.A. Bennis, D.R. Critchley, A. Huttenlocher, Calpain-mediated proteolysis of talin regulates adhesion dynamics, *Nat. Cell Biol.* 6 (2004) 977–983.
- [52] K. Serrano, D.V. Devine, Vinculin is proteolyzed by calpain during platelet aggregation: 95 kDa cleavage fragment associates with the platelet cytoskeleton, *Cell Motil. Cytoskeleton* 58 (2004) 242–252.
- [53] S. Dulong, S. Goudenege, K. Vuiller-Devillers, S. Manenti, S. Poussard, P. Cottin, Myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) is involved in myoblast fusion through its regulation by protein kinase C alpha and calpain proteolytic cleavage, *Biochem. J.* 382 (2004) 1015–1023.
- [54] B. Aragon, S. Poussard, S. Dulong, K. Touyarot, E. Dargelos, J.J. Brustis, D. Levieux, A. Ducastaing, P. Cottin, Protein kinase C alpha is a calpain target in cultured embryonic muscle cells, *Mol. Cell. Biochem.* 231 (2002) 97–106.
- [55] P. Cooray, Y. Yuan, S.M. Schoewaedler, C.A. Mitchell, H.H. Salem, S.P. Jackson, Focal adhesion kinase (pp125^{FAK}) cleavage and regulation by calpain, *Biochem. J.* 318 (1996) 41–47.
- [56] W. Wei, H. Yang, P. Cao, M. Menconi, C. Chamberlain, V. Petkova, P.O. Hasselgren, Degradation of C/EBP beta in cultured myotubes is calpain-dependent, *J. Cell. Physiol.* 208 (2006) 386–398.
- [57] M. Pariat, S. Carillo, M. Molinari, C. Salvat, L. Debussche, L. Bracco, J. Milner, M. Piechaczyk, Proteolysis by calpains: a possible contribution to degradation of p53, *Mol. Cell. Biol.* 17 (1997) 2806–2815.
- [58] M.E. Saez, R. Ramirez-Lorca, F.J. Moron, A. Ruiz, The therapeutic potential of the calpain family: new aspects, *Drug Discov. Today* 11 (2006) 917–923.
- [59] N.O. Carragher, Calpain inhibition: a therapeutic strategy targeting multiple disease states, *Curr. Pharm. Des.* 12 (2006) 615–638.
- [60] W. Lubisch, H.P. Hofmann, H.J. Treiber, A. Moller, Synthesis and biological evaluation of novel piperidine carboxamide derived calpain inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 10 (2000) 2187–2191.
- [61] K. Komatsu, K. Inazuki, J. Hosoya, S. Satoh, Beneficial effect of new thiol protease inhibitors, epoxide derivatives, on dystrophic mice, *Exp. Neurol.* 91 (1986) 23–29.
- [62] M.A. Badalamente, A. Stracher, Delay of muscle degeneration and necrosis in mdx mice by calpain inhibition, *Muscle Nerve* 23 (2000) 106–111.
- [63] C. Lescop, H. Herzner, H. Siendt, R. Bolliger, M. Henneböhle, P. Weyermann, A. Briguet, I. Courdier-Fruh, M. Erb, M. Foster, T. Meier, J.P. Magyar, A. Von Sprecher, Novel cell-penetrating α -keto-amide calpain inhibitors as potential treatment for muscular dystrophy, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15 (2005) 5176–5181.
- [64] R. Burdi, M.P. Didonna, B. Pignol, B. Nico, D. Mangieri, J.F. Rolland, C. Camerino, A. Zallone, P. Ferro, F. Andretta, P. Confalonieri, A. De Luca, First evaluation of the potential effectiveness in muscular dystrophy of a novel chimeric compound, BN 82270, acting as calpain-inhibitor and anti-oxidant, *Neuromuscul. Disord.* 16 (2006) 237–248.
- [65] M.C. Lebart, Y. Benyamin, Calpain involvement in the remodeling of cytoskeletal anchorage complexes, *FEBS J.* 273 (2006) 3415–3426.
- [66] D. Balcerzak, S. Poussard, J.J. Brustis, M. Soriano, P. Cottin, A. Ducastaing, An antisense oligodeoxynucleotide to m-calpain mRNA inhibits myoblast fusion, *J. Cell. Biol.* 108 (1995) 2077–2082.
- [67] J.E. Schollmeyer, Possible role of calpain I and calpain II in differentiating muscle, *Exp. Cell Res.* 163 (1986) 413–422.
- [68] N. Dourdin, D. Balcerzak, J.J. Brustis, S. Poussard, P. Cottin, A. Ducastaing, Potential m-calpain substrates during myoblast fusion, *Exp. Cell Res.* 246 (1999) 433–442.
- [69] D. Balcerzak, P. Cottin, S. Poussard, A. Cucuron, J.J. Brustis, A. Ducastaing, Calpastatin-modulation of m-calpain activity is required for myoblast fusion, *Eur. J. Cell Biol.* 75 (1998) 247–253.
- [70] S. Barnoy, M. Maki, N.S. Kosower, Overexpression of calpastatin inhibits L8 myoblast fusion, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 332 (2005) 697–701.
- [71] S. Dedieu, S. Poussard, G. Mazeres, F. Grise, E. Dargelos, P. Cottin, J.J. Brustis, Myoblast migration is regulated by calpain through its involvement in cell attachment and cytoskeletal organisation, *Exp. Cell Res.* 292 (2004) 187–200.
- [72] A. Glading, D.A. Lauffenburger, J.S. Elce, Cutting to the chase: calpain proteases in cell motility, *Trends Cell Biol.* 12 (2002) 46–54.
- [73] B.J. Perrin, K.J. Amann, A. Huttenlocher, Proteolysis of cortactin by calpain regulates membrane protrusion during cell migration, *Mol. Biol. Cell* 17 (2006) 239–250.
- [74] S. Honda, T. Marumoto, T. Hirota, M. Nitta, Y. Arima, M. Ogawa, H. Saya, Activation of m-calpain is required for chromosome alignment on the metaphase plate during mitosis, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 10615–10623.
- [75] C. Delmas, N. Aragou, S. Poussard, P. Cottin, J.M. Darbon, S. Manenti, MAP kinase-dependent degradation of p27^{Kip1} by calpains in choroidal melanoma cells, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 12443–12451.
- [76] M. Pariat, C. Salvat, M. Bebien, F. Brockly, E. Altieri, S. Carillo, I. Jariel-Encontre, M. Piechaczyk, The sensitivity of c-Jun and c-Fos proteins to calpains depends on conformational determinants of the monomers and not on formation of dimers, *Biochem. J.* 345 (2000) 129–138.
- [77] Y.H. Choi, S.J. Lee, P. Nguyen, J.S. Jang, J. Lee, M.L. Wu, E. Takano, M. Maki, P.A. Henkart, J.B. Trepel, Regulation of cyclin D1 by calpain protease, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 28479–28484.
- [78] X.M. Sun, M. MacFarlane, J. Zhuang, B.B. Wolf, D.R. Green, G.M. Cohen, Distinct caspase cascades are initiated in receptor-mediated and chemical-induced apoptosis, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 5053–5060.

- [79] V. Bitko, S. Barik, An endoplasmic reticulum-specific stress-activated caspase (caspase 12) is implicated in the apoptosis of A549 epithelial cells by respiratory syncytial virus, *J. Cell. Biochem.* 80 (2001) 441–454.
- [80] A.J. Primeau, P.J. Adhihetty, D.A. Hood, Apoptosis in heart and skeletal muscle, *Can. J. Appl. Physiol.* 27 (2002) 349–395.
- [81] M. Chen, D.J. Won, S. Krajewski, R.A. Gottlieb, Calpain and mitochondria in ischemia/reperfusion injury, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 29181–29186.
- [82] C. Garrido, L. Galluzzi, M. Brunet, P.E. Puig, C. Didelot, G. Kroemer, Mechanisms of cytochrome *c* release from mitochondria, *Cell. Death Differ.* 13 (2006) 1423–1433.
- [83] T. Nakagawa, J. Yuan, Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis, *J. Cell Biol.* 150 (2000) 887–894.
- [84] K. Blomgren, C. Zhu, X. Wang, J.O. Karlsson, A.L. Leverin, B.A. Bahr, C. Mallard, H. Hagberg, Synergistic activation of caspase-3 by m-calpain after neonatal hypoxia–ischemia: a mechanism of “pathological apoptosis”? *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 10191–10198.
- [85] S. Gil-Parrado, A. Fernandez-Montalvan, I. Assfalg-Machleidt, O. Popp, F. Bestvater, A. Holloschi, T.A. Knoch, E.A. Auerswald, K. Welsh, J.C. Reed, H. Fritz, P. Fuentes-Prior, E. Spiess, G.S. Salvesen, W. Machleidt, Ionomycin-activated calpain triggers apoptosis. A probable role for Bcl-2 family members, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 27217–27226.
- [86] B.M. Polster, G. Basanez, A. Etxebarria, J.M. Hardwick, D.G. Nicholls, Calpain I induces cleavage and release of apoptosis-inducing factor from isolated mitochondria, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 6447–6454.
- [87] N. Bizat, J.M. Hermel, S. Humbert, C. Jacquard, C. Creminon, C. Escartin, F. Saudou, S. Krajewski, P. Hantraye, E. Brouillet, In vivo calpain/caspase cross-talk during 3-nitropropionic acid-induced striatal degeneration: implication of a calpain-mediated cleavage of active caspase-3, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 43245–43253.
- [88] B.T. Chua, K. Guo, P. Li, Direct cleavage by the calcium-activated protease calpain can lead to inactivation of caspases, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 5131–5135.
- [89] M. Bartoli, I. Richard, Calpains in muscle wasting, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37 (2005) 2115–2133.
- [90] E.P. Hoffman, R.H. Brown, L.M. Kunkel, Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus, *Cell* 51 (1987) 919–928.
- [91] K.P. Campbell, S.D. Kahl, Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein, *Nature* 338 (1989) 259–262.
- [92] M.J. Spencer, D.E. Croall, J.G. Tidball, Calpain are activated in necrotic fibers from mdx dystrophic mice, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 10909–10914.
- [93] J.M. Alderton, R.A. Steinhardt, Calcium influx through calcium leak channels is responsible for the elevated levels of calcium-dependent proteolysis in dystrophic myotubes, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 9452–9460.
- [94] L. Combaret, D. Taillandier, L. Voisin, S.E. Samuels, O. Boespflug-Tanguy, D. Attaix, No alteration in gene expression of components of the ubiquitin–proteasome proteolytic pathway in dystrophin-deficient mice, *FEBS Lett.* 393 (1996) 292–296.
- [95] P.R. Turner, T. Westwood, C.M. Regen, R.A. Steinhardt, Increased protein degradation results from elevated free calcium levels found in muscle from mdx mice, *Nature* 335 (1988) 735–738.
- [96] M.J. Spencer, R.L. Mellgren, Overexpression of a calpastatin transgene in mdx muscle reduces dystrophic pathology, *Hum. Mol. Genet.* 11 (2002) 2645–2655.
- [97] M.A. Luz, M.J. Marques, H. Santo Neto, Impaired regeneration of dystrophin-deficient muscle fibers is caused by exhaustion of myogenic cells, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35 (2002) 691–695.
- [98] I. Richard, O. Broux, V. Allamand, F. Fougerousse, N. Chiannikulchai, N. Bourg, L. Brenguier, C. Devaud, P. Pasturaud, C. Roudaut, D. Hillaire, M.R. Passos-Bueno, M. Zatz, J.A. Tischfield, M. Fardeau, C.E. Jackson, D. Cohen, J.S. Beckmann, Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A, *Cell* 81 (1995) 27–40.
- [99] Y. Ono, H. Shimada, H. Sorimachi, I. Richard, T.C. Saido, J.S. Beckmann, S. Ishiura, K. Suzuki, Functional defects of a muscle-specific calpain p94, caused by mutations associated with limb-girdle muscular dystrophy type 2A, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 17073–17078.
- [100] M. Fanin, A.C. Nascimbeni, L. Fulizio, C.P. Trevisan, M. Meznaric-Petrusa, C. Angelini, Loss of calpain-3 autocatalytic activity in LGMD2A patients with normal protein expression, *Am. J. Pathol.* 163 (2003) 1929–1936.
- [101] J. Chae, N. Minami, Y. Jin, M. Nakagawa, K. Murayama, F. Igarashi, I. Nonaka, Calpain 3 gene mutations: genetic and clinico-pathologic findings in limb-girdle muscular dystrophy, *Neuromuscul. Disord.* 11 (2001) 547–555.
- [102] I. Kramerova, E. Kudryashova, J.G. Tidball, M.J. Spencer, Null mutation of calpain 3 (p94) in mice causes abnormal sarcomere formation in vivo and in vitro, *Hum. Mol. Genet.* 13 (2004) 1373–1388.
- [103] C.C. Gregorio, H. Granzier, H. Sorimachi, S. Labeit, Muscle assembly: a titanic achievement? *Curr. Opin. Cell Biol.* 11 (1999) 18–25.
- [104] K. Kinbara, S. Ishiura, S. Tomioka, H. Sorimachi, S.Y. Jeong, S. Amano, H. Kawasaki, B. Kolmerer, S. Kimura, S. Labeit, K. Suzuki, Purification of native p94, a muscle-specific calpain, and characterization of its autolysis, *Biochem. J.* 335 (1998) 589–596.
- [105] S.M. Garvey, C. Rajan, A.P. Lerner, W.N. Frankel, G.A. Cox, The muscular dystrophy with myositis (mdm) mouse mutation disrupts a skeletal muscle-specific domain of titin, *Genomics* 79 (2002) 146–149.
- [106] Y. Huang, P. Verheesen, A. Roussis, W. Frankhuisen, I. Ginjaar, F. Haldane, S. Laval, L.V. Anderson, T. Verrips, R.R. Frants, H. De Haard, K. Bushby, J. Den Dunnen, S.M. Van der Maarel, Protein studies in dysferlinopathy patients using llama-derived antibody fragments selected by phage display, *Eur. J. Hum. Genet.* 13 (2005) 721–730.
- [107] L.V.B. Anderson, R.M. Harrison, R. Pogue, E. Vafiadaki, C. Pollitt, K. Davison, J.A. Moss, S. Keers, A. Pyle, P.J. Shaw, I. Mahjneh, Z. Argov, C.R. Greenberg, K. Wrogemann, T. Bertorini, H.H. Goebel, J.S. Beckmann, R. Bashir, K.M. Bushby, Secondary reduction in calpain 3 expression in patients with limb girdle muscular dystrophy type 2B and Miyoshi myopathy (primary dysferlinopathies), *Neuromuscul. Disord.* 10 (2000) 553–559.
- [108] P.F. Van der Ven, S. Wiesner, P. Salmikangas, D. Auerbach, M. Himmel, S. Kempa, K. Hayess, D. Pacholsky, A. Taivainen, R. Schroder, O. Carpen, D.O. Furst, Indications for a novel muscular dystrophy pathway. Gamma-filamin, the muscle-specific filamin isoform, interacts with myotilin, *J. Cell Biol.* 151 (2000) 235–248.
- [109] I. Kramerova, E. Kudryashova, G. Venkatraman, M.J. Spencer, Calpain 3 participates in muscle remodelling by acting upstream of the ubiquitin-proteasome pathway, *Hum. Mol. Genet.* 14 (2005) 2125–2134.
- [110] I. Richard, C. Roudaut, S. Marchand, S. Baghdiguian, M. Herasse, D. Storchholm, Y. Ono, L. Suel, N. Bourg, H. Sorimachi, G. Lefranc, M. Fardeau, A. Sebille, J.S. Beckmann, Loss of calpain 3 proteolytic activity leads to muscular dystrophy and to apoptosis-associated I κ B α /nuclear factor κ B pathway perturbation in mice, *J. Cell Biol.* 151 (2000) 1583–1590.
- [111] R.N. Baumgartner, K.M. Koehler, D. Gallagher, L. Romerero, S.B. Heymsfield, R.R. Ross, P.J. Garry, R.D. Lindeman, Epidemiology of sarcopenia among the elderly in New Mexico, *Am. J. Epidemiol.* 147 (1998) 755–763.
- [112] E. Marzetti, C. Leeuwenburgh, Skeletal muscle apoptosis, sarcopenia and frailty at old age, *Exp. Gerontol.* 41 (2006) 1234–1238.
- [113] P. Szulc, T.J. Beck, F. Marchand, P.D. Delmas, Low skeletal muscle mass is associated with poor structural parameters of bone and impaired balance in elderly men — the MINOS study, *J. Bone Miner. Res.* 20 (2005) 721–729.
- [114] A.J. Dirks, T. Hofer, E. Marzetti, M. Pahor, C. Leeuwenburgh, Mitochondrial DNA mutations, energy metabolism and apoptosis in aging muscle, *Ageing Res. Rev.* 5 (2006) 179–195.
- [115] V. Pesce, A. Cormio, F. Fracasso, F. Vecchiet, G. Felzani, A.M. Lezza, P. Cantatore, M.N. Gadaleta, Age-related mitochondrial genotypic and

- phenotypic alterations in human skeletal muscle, *Free Radic. Biol. Med.* 30 (2001) 1223–1233.
- [116] K. Nakashima, S. Masaki, M. Yamazaki, H. Abe, Cysteine suppresses oxidative stress-induced myofibrillar proteolysis in chick myotubes, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68 (2004) 2326–2331.
- [117] R.I. Viner, D.A. Ferrington, T.D. Williams, L. Woodhouse, K.E. Yarasheski, C.A. Miller, V. Askansas, W.K. Engel, S. Bhasin, G. Attardi, Protein modification during biological aging: selective tyrosine nitration of the SERCA2a isoform of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase in skeletal muscle, *Biochem. J.* 340 (1999) 657–669.
- [118] S. Machida, F.W. Booth, Increased nuclear proteins in muscle satellite cells in aged animals as compared to young growing animals, *Exp. Gerontol.* 39 (2004) 1521–1525.
- [119] E. Kefaloyianni, C. Gaitanaki, I. Beis, ERK1/2 and p38-MAPK signaling pathways, through MSK1, are involved in NF- κ B transactivation during oxidative stress in skeletal myoblasts, *Cell. Signal.* 18 (2006) 2238–2251.
- [120] A.A. Chaudhari, J.W. Seol, S.J. Kim, Y.J. Lee, H.S. Kang, I.S. Kim, N.S. Kim, S.Y. Park, Reactive oxygen species regulate Bax translocation and mitochondrial transmembrane potential, a possible mechanism for enhanced TRAIL-induced apoptosis by CCCP, *Oncol. Rep.* 18 (2007) 71–76.
- [121] S. Fulle, F. Protasi, G. Di Tano, T. Pietrangelo, A. Beltramin, S. Boncompagni, L. Vecchier, G. Fano, The contribution of reactive oxygen species to sarcopenia and muscle ageing, *Exp. Gerontol.* 39 (2004) 17–24.
- [122] D.S. Izyumov, A.V. Avetisyan, O.Y. Pletjushkina, D.V. Sakharov, K.W. Wirtz, B.V. Chernyak, V.P. Skulachev, “Wages of fear”: transient threefold decrease in intracellular ATP level imposes apoptosis, *Biochim. Biophys. Acta* 1658 (2004) 141–147.
- [123] L. Chung, Y.C. Ng, Age-related alterations in expression of apoptosis regulatory proteins and heat shock proteins in rat skeletal muscle, *Biochim. Biophys. Acta* 1762 (2005) 103–109.
- [124] A.J. Dirks, C. Leeuwenburgh, Aging and longlife caloric restriction result in adaptations of skeletal muscle apoptosis repressor, apoptosis inducing factor, X-linked inhibitor of apoptosis, caspase-3, and caspase-12, *Free Radic. Biol. Med.* 36 (2004) 27–39.
- [125] M. Garcia, V. Bondala, J.W. Geddes, Mitochondrial localization of μ -calpain, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338 (2005) 1241–1247.
- [126] D.D. Arrington, T.R. Van Vleet, R.G. Schnellmann, Calpain 10: a mitochondrial calpain and its role in calcium-induced mitochondrial dysfunction, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 291 (2006) 1159–1171.
- [127] S. Goudenege, E. Dargelos, S. Claverol, M. Bonneu, P. Cottin, S. Pousard, Comparative proteomic analysis of myotube caveolae after millicalpain deregulation, *Proteomics*, in press.
- [128] E.E. Dupont-Versteegden, Apoptosis in muscle atrophy: relevance to sarcopenia, *Exp. Gerontol.* 40 (2005) 473–481.
- [129] B. Fraysse, J.F. Desaphy, J.F. Rolland, S. Pierno, A. Liantonio, V. Giannuzzi, C. Camerino, M.P. Didonna, D. Cocchi, A. De Luca, D. Conte Camerino, Fiber type-related changes in rat skeletal muscle calcium homeostasis during aging and restoration by growth hormone, *Neurobiol. Dis.* 21 (2006) 372–380.
- [130] S. Fulle, S. Di Donna, C. Puglielli, T. Pietrangelo, S. Beccafico, R. Bellomo, F. Protasi, G. Fano, Age-dependent imbalance of the antioxidative system in human satellite cells, *Exp. Gerontol.* 40 (2005) 189–197.
- [131] H. Many, M. Inomata, T. Fujimori, N. Dohmae, Y. Sato, K. Takio, Y. Nabeshima, T. Endo, Klotho protein deficiency leads to overactivation of μ -calpain, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 35503–35508.
- [132] P.J. Romero, V. Salas, C. Hernandez, Calcium pump phosphoenzyme from young and old human red cells, *Cell Biol. Int.* 26 (2002) 945–949.
- [133] J.A. Sloane, J.D. Hinman, M. Lubonia, W. Hollander, C.R. Abraham, Age-dependent myelin degeneration and proteolysis of oligodendrocyte proteins is associated with the activation of calpain-1 in the rhesus monkey, *J. Neurochem.* 84 (2003) 157–168.