

REGULATION DU GENE DE LA SOUS-UNITE CATALYTIQUE DE LA M-CALPAÏNE (*CAPN2*) PAR LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION SPECIFIQUES DU MUSCLE AU COURS DE LA MYOGENESE.

S. DEDIEU, G. MAZERES, P. COTTIN, J-J. BRUSTIS.

Laboratoire Biosciences de l'Aliment, ISTAB-USC-INRA 429, Université Bordeaux I, Avenue des
Facultés, 33405 Talence Cedex, France

Les calpaïnes constituent une famille de cystéines protéases calcium-dépendantes ubiquitaires et tissus spécifiques. Les isoformes ubiquitaires (μ - et m-calpaïne) sont des protéines hétérodimériques composées de sous-unités catalytiques distinctes (respectivement CAPN1 et 2, de masse moléculaire 80kDa) et d'une sous-unité régulatrice commune (CAPN4, de masse moléculaire 28kDa), codées respectivement par les gènes *capn1*, *capn2* et *capn4*. L'activité des calpaïnes est régulée par différents facteurs, incluant le calcium, les phospholipides et la calpastatine, un inhibiteur protéique spécifique.

Plusieurs études réalisées au laboratoire ont montré que les calpaïnes sont impliquées, d'une part, *ante-mortem*, dans la croissance et le développement du muscle, d'autre part, *post-mortem*, dans la tendreté de la viande. Dans le but de comprendre le rôle exact de la m-calpaïne pendant la myogenèse et par conséquent durant la croissance et le développement musculaire, nous avons analysé une possible régulation de cette protéase par les facteurs de régulation myogéniques.

La myogenèse est régulée par les membres de la famille des facteurs de régulation myogénique (MRF). Les quatre facteurs de transcription spécifiques du muscle MyoD, myogénine, Myf5 et MRF4, peuvent agir à différentes étapes du processus de différenciation en contrôlant l'expression de gènes spécifiques du muscle. Ces facteurs de transcription se lient à des séquences consensus conservées, les *E-box* (CANNTG), présentes dans les régions promotrices de nombreux gènes musculaires. Il a été montré que les MRF formaient des complexes avec d'autres protéines de type *Helix-Loop-Helix* comme MEF-2 ou p300. La surexpression de chacun des MRF convertit des cellules non musculaires en cellules myogéniques capables de fusionner et d'exprimer des gènes spécifiques du muscle. Bien que ces facteurs possèdent des fonctions redondantes durant la différenciation, de récents travaux ont mis en évidence que chacun d'entre eux occupait des fonctions uniques et non lors de la myogenèse. MyoD et Myf5 sont actifs dès la détermination des myoblastes et participe à la régulation du cycle cellulaire, tandis que myogénine contribue à la formation des myotubes; MRF4 semble intervenir plus tardivement, principalement durant la myofibrillogenèse.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, des nombreuses études faites au laboratoire ont souligné le rôle clef de la m-calpaïne au cours de la myogenèse, notamment lors de la fusion des myoblastes, principalement par son implication lors du clivage de protéines du cytosquelette, incluant la desmine, la filamine, la tropomyosine, la troponine, la taline, la nébuline, la vimentine, la gelsoline et la vinculine. Alors que la régulation de la m-calpaïne par son interaction avec la calpastatine ou par les flux de calcium aient été bien étudiés, rien n'est connu concernant la régulation du gène de la protéase au cours de la myogenèse. L'expression de la m-calpaïne, comme pour de nombreuses protéines spécifiques du muscle, est modulée par des facteurs capables de stimuler ou d'inhiber la myogenèse. Pour ces raisons, nous avons émis l'hypothèse que *capn2* serait régulé transcriptionnellement par les facteurs de régulation myogénique lors de la myogenèse.

Pour ce travail, la séquence promotrice codant pour *capn2* a été analysée, cinq séquences consensus pour les MRF et un site de fixation pour MEF-2 ont été identifiés. Dans le but de comprendre le mécanisme de régulation de ce gène, ces séquences ont été testées grâce à des constructions contenant des gènes rapporteurs. Ces expérimentations ont révélé que MyoD présentait une forte activité transcriptionnelle pour ces régions, particulièrement pour la séquence contenant "MEF-2/E4 box". De plus, la surexpression de ces facteurs a permis de démontrer que MyoD et myogénine étaient tous les deux capables de réguler positivement *capn2*, seuls ou en combinaisons, alors que Myf5 n'avait aucun effet. En outre, la stratégie antisens a démontré que MyoD présentait un rôle crucial et spécifique pour la régulation de ce gène et que ce rôle ne pouvait être compensé ni par myogénine, ni par Myf5.