

Remaniements du muscle strié après injection intramusculaire chez le porc : analyse du transcriptome et étude cinétique

Laurence LIAUBET (1), Pierre J. FERRE (2), Didier CONCORDET (2), Magali SAN CRISTOBAL (1),
Gwenola TOSSER-KLOPP (1), Agnès BONNET (1), Pierre-Louis TOUTAIN (2),
François HATEY (1) et Hervé P. LEFEBVRE (2)

(1) INRA, Laboratoire de Génétique Cellulaire, Castanet-Tolosan
(2) INRA/ENVT, UMR Physiopathologie et Toxicologie expérimentale, Toulouse

Remaniements du muscle strié après injection intramusculaire chez le porc : analyse du transcriptome et étude cinétique

La voie intramusculaire est très largement utilisée pour l'administration des médicaments, mais elle peut induire des lésions du muscle squelettique qui peuvent laisser des traces sur la carcasse et induire son rejet partiel à l'abattoir. Les injections dans le muscle strié induisent une phase de nécrose des cellules musculaires adultes, présentant les caractères d'une inflammation aiguë, suivie d'une détersion par les cellules de l'inflammation et d'une régénération par la prolifération des cellules satellites, leur fusion en myotubes et la recolonisation du foyer lésionnel entre 10 et 30 jours après l'injection.

L'objectif de cette expérimentation est de décrire, par une approche globale, l'expression des gènes (transcriptome) dans le muscle strié squelettique à différents temps après induction d'une lésion locale. Les injections sont effectuées avec du propylène glycol (PG), excipient très utilisé dans les formulations à usage intramusculaire. Les microarrays ont été réalisés à partir de 3456 produits PCR obtenus à partir des séquences porcines extraites d'une banque d'ADNc multi-tissus (Agenae) et d'une banque d'ADNc du tissu musculaire. L'analyse statistique que nous avons développée nous a permis de caractériser 14 cinétiques d'expression différentes et d'observer l'expression différentielle de 131 gènes impliqués dans l'inflammation, la dégénérescence musculaire et la régénération.

Modification in striated muscle after intramuscular injection in pig: transcriptome analysis and kinetic study

The intramuscular route is widely used for drug administration but can often induce skeletal muscle damage. There are also chronic outcomes with local fibrosis of the muscles that can lead to elimination of some parts of the carcass at slaughter. Injection in striated muscle first leads to necrosis of muscle cells with acute inflammation, followed by cleaning with phagocytosis through the inflammatory process and a regeneration process with the proliferation of the satellite cells, their fusion into myotubes and a colonisation of the lesional site between 10 and 30 days after injection.

The aim of this experimentation was to describe, by a global, high throughput approach, the gene expression (transcriptome) in striated skeletal muscle at various times after intramuscular injection. The injections were carried out with propylene glycol (PG), a widely used pharmaceutical vehicle for intramuscular administration. Microarrays were constructed with 3456 PCR products obtained by amplification of pig sequences of the AGENAE multi-tissues cDNA library (INRA library) and of a muscle specific cDNA library. The statistical analysis allowed to characterize 14 different temporal expression patterns and to observe the differential expression of 131 genes involved in inflammatory events, muscle degeneration and regeneration.

INTRODUCTION

La voie intramusculaire est très largement utilisée pour l'administration des médicaments, mais elle peut induire des lésions du muscle squelettique. Les pertes économiques entraînées par les saisies partielles à l'abattage ou à la découpe sont importantes pour la filière de production porcine. Même si les observations macroscopiques permettent d'évaluer l'étendue et la sévérité des lésions induites par différentes formulations, il existe peu de données sur les mécanismes physiopathologiques sous-jacents. Une analyse au niveau moléculaire du développement des lésions musculaires permettrait d'en comprendre les mécanismes et d'apporter des informations utiles au développement de nouvelles formulations mieux tolérées.

En tirant parti des approches de génomique qui permettent une analyse à haut débit des événements moléculaires, l'objectif de ce travail a été de décrire les modifications du profil d'expression des gènes musculaires au cours d'une cinétique de réponse à une injection intramusculaire chez le porc. Le propylène glycol (PG), solvant organique fréquemment utilisé dans les formulations, est connu pour sa mauvaise tolérance ; il a été choisi pour induire des lésions musculaires.

1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

1.1. Animaux

Dix porcelets mâles croisés, de 23 à 32 kg lors de leur entrée en période d'acclimatation ont été utilisés. L'expérimentation a été conduite à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse, après approbation du protocole par le comité d'éthique régional pour l'expérimentation animale.

1.2. Protocole expérimental

Chaque animal a reçu 4 administrations intramusculaires de PG selon un protocole standardisé. Cinq zones ont été individualisées sur les muscles *Longissimus dorsi* droit et gauche, et attribuées par tirage au sort aux 4 injections et à un site témoin ne recevant aucune injection.

Les injections ont été réalisées à des temps correspondant aux différents stades lésionnels. Les travaux préliminaires ont permis de déterminer que des périodes de 6 heures, 2, 7 et 21 jours après injection IM permettaient de couvrir les stades de l'inflammation aiguë, de la dégénérescence et de la régénération.

A la fin de l'expérimentation, les animaux ont été euthanasiés et les échantillons de muscle prélevés rapidement, congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C.

1.3. Analyses

1.3.1. ARN

Après broyage dans l'azote liquide, les ARN totaux ont été extraits à l'aide d'un kit commercial (RNeasy Fibrous Tissue

Midi kit, Qiagen France SA). Les ARN ont été élués dans 300 µl d'eau RNase-free, contrôlés à l'aide du Bioanalyzer Agilent (Agilent Technologies France) et conservés à -80°C.

1.3.2. Réseaux d'ADNc

Les protocoles d'amplification, de dépôt et de traitement des membranes ont été adaptés de ceux du laboratoire TAGC (TAGC INSERM-ERM, 206 Parc Scientifique de Luminy, 13288 Marseille cedex 09, France) et sont disponibles sur le site Web de ce laboratoire (http://tagc.univ-mrs.fr/oncogenomics/Nylon_microarrays.php).

Une collection de produits d'amplification PCR issue de 3456 clones d'ADNc a été déposée à haute densité sur des membranes de nylon de petit format (18x72 mm ; Immobilon Ny+, Millipore, USA). Ces 3456 clones correspondent à 1908 gènes différents.

Les clones provenaient de deux banques normalisées distinctes : 1056 clones sont issus d'une banque multi-tissus construite dans le cadre du projet Agenae, 2208 clones sont issus d'une banque de muscle construite par C. Bendixen (Département d'Élevage et de Génétique Animales, Institut Danois des Sciences de l'Agriculture, centre de recherches de Foulum, Tjele, Danemark), 192 clones constituent des contrôles appropriés.

L'amplification a été réalisée par PCR en plaques de 96 puits, dans un volume de 100 µl en utilisant des amorces M13 universelles avec 40 cycles (30 sec à 94°C ; 40 sec à 60°C ; 2 min à 72°C).

Les dépôts ont été effectués en double par un Microgrid II (Genomic Solutions, UK). Les dépôts ont un diamètre de 100 µm et sont séparés de 300 µm. Après dépôt, les produits PCR ont été dénaturés en milieu alcalin et fixés par pontage aux ultraviolets.

1.3.3. Hybridation des réseaux

La qualité des membranes a été vérifiée par hybridation avec un oligonucléotide correspondant à une partie de la séquence du vecteur présente dans les produits d'amplification. L'oligonucléotide a été marqué au ³³P puis hybridé pendant 12 heures à 42°C. Après lavage, la membrane a été placée contre un écran sensible pendant 2 heures puis celui-ci a été analysé avec un système d'acquisition d'image permettant une résolution de 25 µm (FUJIFILM BAS-5000, Fujifilm, Raytest France S.A.R.L.).

Après déshybridation, les réseaux ont été hybridés avec les ADNc radioactifs synthétisés à partir des ARN par une transcriptase inverse (SuperScript™ II RNase H- Reverse Transcriptase, Invitrogen, France) en présence de dCT³³P (activité spécifique > 3 TBq.m⁻¹, Perkin Elmer, France). L'hybridation est réalisée pendant 24 heures à 68°C.

Les images des hybridations ont été quantifiées par la mesure de l'intensité de chaque spot à l'aide d'un logiciel semi-automatique (BZScan ; LOPEZ et al, 2004).

1.3.4. Traitement des données

Pour chaque spot, les données issues de BZScan ont été transformées en logarithmes puis normalisées par la médiane des intensités de chaque membrane pour permettre les comparaisons entre membranes.

Pour décrire la cinétique de réponse de chacun des transcrits interrogés par le réseau, nous avons calculé, pour chaque animal, la différence d'intensité entre 2 temps consécutifs, puis la moyenne et l'écart type de ces valeurs pour l'ensemble des animaux. Nous avons ensuite comparé les valeurs de deux intervalles consécutifs par un test de Student avec un seuil de significativité de 0,0125 (soit un seuil global de 0,05 pour un gène, réparti à 0,0125 pour chaque intervalle de temps). Parmi les différences significatives, nous avons calculé le rapport des valeurs de deux intervalles consécutifs et fixé un seuil arbitraire de 1,5 pour affirmer l'existence d'une diminution ou d'une augmentation de l'expression. Par ailleurs, nous avons défini les différents profils d'évolution possibles au cours des 5 prélèvements successifs, le niveau d'expression pouvant être stable, diminuer ou augmenter entre 2 prélèvements.

L'expérimentation, son implémentation et le traitement des données sont conformes aux standards MIAME (BRAZMA et al, 2001).

2. RÉSULTATS ET DISCUSSION

L'analyse des données montre que 131 gènes présentent une modification de leur expression dans au moins l'un des intervalles considérés, soit en baisse (sous-exprimés), soit en hausse (sur-exprimés). Ainsi, 63 gènes varient au cours de la première période (0-6h), 47 au cours de la deuxième (6h-48h), 17 au cours de la troisième (2-7j), et 3 au cours de la dernière période (7-21 j). Il s'agit principalement de gènes codant pour des protéines de structure, d'inflammation ou du métabolisme.

Les différents profils d'expression sont présentés dans les tableaux 1 à 3. Pour chacun d'entre eux, les gènes sont regroupés selon leur fonction biologique principale.

Mises à part les données d'analyse histologique et des études de tolérance, peu de choses sont connues sur les mécanismes impliqués dans le développement d'une lésion musculaire iatrogène. L'originalité de ce travail réside dans l'étude cinétique de modification de l'expression de 1908 gènes dans le muscle *Longissimus dorsi* du porc, à 5 temps différents chez le même animal, avant et après injection IM de PG. À notre connaissance, cette étude est la première concernant l'analyse à haut débit de l'expression des gènes dans un modèle de lésion iatrogène du muscle squelettique. Nous avons observé que ce modèle induit des variations importantes de l'expression des gènes :

- Au moins 7 % des gènes analysés présentent une variation de leur expression entre 2 périodes consécutives ;
- Les modifications sont plus nombreuses au cours des premières 48 heures après l'injection ;
- Les gènes impliqués dans la contraction musculaire, le

métabolisme général et mitochondrial sont globalement réprimés ;

- L'expression des gènes des protéines ribosomales est augmentée entre 6 et 48 heures.

2.1. Modèle expérimental

Nous avons choisi le porc comme modèle animal de grande taille pour cette analyse du transcriptome essentiellement pour deux raisons : l'homogénéité du muscle *Longissimus dorsi* dans la région para vertébrale permet de réaliser plusieurs injections IM chez le même animal et surtout, il s'agit d'une espèce cible dans la problématique des lésions au point d'injection. Nous avons par ailleurs choisi le propylène glycol comme substance test car il est mal toléré alors qu'il est utilisé comme excipient dans de nombreuses formulations.

Nous avons répété les expériences avec des animaux très homogènes de manière à limiter la variabilité inter-individuelle. La comparaison de l'expression entre deux périodes consécutives a été faite intra-animal, la différence entre les 10 porcelets étant alors la seule source de variation introduite.

2.2. Physiopathologie de la lésion musculaire

2.2.1. Dégénérescence

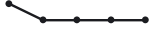
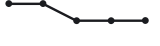
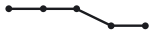
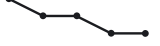
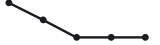
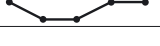
Nos résultats montrent que la protéolyse intracellulaire débute tôt, avec une augmentation de l'expression de la carboxypeptidase D (à 6 h), suivie à 48 h de l'induction des transcrits de la calpaïne et de la legumaine (cystéine protéases). En parallèle avec la protéolyse, la transcription des gènes codant pour les principales protéines impliquées dans la structure et la contraction musculaires (myosine, actine, troponine, actinine, tropomyosine...) est réprimée, de même que celle des gènes du métabolisme cellulaire et mitochondrial. Cette répression peut être interprétée comme une diminution de la demande musculaire en énergie liée à l'activité contractile puisque le début de la lésion est marqué par une phase de dégénérescence. De fait, le gène de la créatine kinase M est régulé négativement (LEFEBVRE et al, 1996 ; FERRE et al, 2001).

2.2.2. Réponse inflammatoire et immune

Dans notre étude, plusieurs gènes sont induits pendant la phase aiguë de la réponse inflammatoire à la blessure, au cours des 2 premiers jours. Ainsi, certains gènes de cyclophiline, connus pour leur activité pro inflammatoire (ANDREEVA et al, 1999), sont induits à 6 h (PPIA) et à 48 h (PPIB). PPIA est sécrété par les macrophages ou les cellules musculaires lisses vasculaires en réponse à un stress oxydatif, provoquant un influx rapide de neutrophiles. PPIB augmente l'adhésion des plaquettes au collagène.

Les niveaux des transcrits des gènes lactotransferrine et ferritine sont augmentés à 6 h et 48 h. Dans les cellules musculaires humaines, la ferritine H (chaîne lourde) est induite par l'interleukine IL-1 qui joue un rôle de premier plan dans la réponse à l'inflammation et aux blessures (WEI et al, 1990).

Tableau 1 - Profils d'expression des gènes sous-exprimés après une administration intramusculaire de propylène glycol. Chaque point du profil représente un temps de prélèvement (0h, 6h, 2j, 7j et 21j). Les clones représentatifs d'un même gène peuvent se trouver dans des profils différents mais ces gènes présentent toujours le même sens de régulation.

Profils	Fonction biologique	Nom du gène (source Swissprot)
	Métabolisme énergétique	Fructose-bisphosphate aldolase A (ALDOA), Creatine kinase M (CKM), Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPD), Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPD1), Pyruvate kinase, isozymes M1/M2 (PKM2), Phosphoglycerate mutase 2 (PGAM2), Glycogen phosphorylase, muscle (PYGM), Phosphofructokinase-like protein (PFKM-like), Triosephosphate isomerase (TPI1)
	Métabolisme mitochondrial	Cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 2 (COX7A2), Cytochrome c oxidase polypeptide VIII-heart (COX8H), Citrate Synthase (CS), NADH-ubiquinone oxidoreductase 19 kDa subunit (NDUFA8)
	Structure / Contraction	Alpha-actin 1 (ACTA1), Actinin alpha 3 (ACTN3), Myosin regulatory light chain 2 (MYRL2), Myosin binding protein C (MYBPC2), Myosin Heavy Chain (MYH1), MYH3, MYH4, MYH7, MYH8, Troponin C (TNNC2), Myozenin 1 (MYOZ1), Myozenin 3 (MYOZ3), Nebulin (NEB), Tropomyosin 1 (alpha) (TPM1), Tropomyosin 2 (beta) (TPM2)
	Transduction du signal	ATPase Ca ⁺⁺ transporting (ATP2A1, Skeletal muscle, fast twitch muscle (type II) fibers)
	Transcription	Carboxy-terminal domain RNA polymerase II polypeptide A small phosphatase 2 (CTDSP2 ou OS4)
	Métabolisme énergétique	ALDOA, CKM, PGAM2, PYGM, Enolase 3 (ENO3), Lactate dehydrogenase B (LDHB),
	Structure / Contraction	ACTA1, TNNC2, MYRL2
	Métabolisme énergétique Métabolisme mitochondrial	ALDOA, ENO3, CKM, GAPD Cytochrome c oxidase I (MTCO1)
	Métabolisme énergétique Structure / Contraction Inconnu	ENO3 MYH8 FKSG26
	Structure / Contraction	ACTN3
	Inconnue	PRO2605 : biomarker of breast cancer cell line

Quatre autres gènes ayant des activités anti-inflammatoires présentent des niveaux de transcrits accrus au cours des premières 48 h : IKBL (inhibiteur de la kappaB-like protéine), à partir de 6 h, BAT1 (Transcrit associé à HLA-B), bêta 4 thymosine et legumaine à partir de 48 h.

2.2.3. Régénération

La régénération du muscle débute en général rapidement puisque les macrophages phagocytent les fibres musculaires

nécrosées dès les 2 premiers jours (HURME et al, 1991). De fait, une élévation du niveau des transcrits correspondant aux différentes sous unités ribosomales est détectée dès 48 heures après l'injection IM. Cette augmentation résulte probablement de l'activation des cellules satellites quiescentes et elle précède la mise en route de la synthèse protéique qui se produit plus tardivement, pendant la phase de régénération.

Les fibroblastes semblent également être impliqués dans la formation du tissu cicatriciel au point d'injection puisque l'on

Tableau 2 - Profils d'expression des gènes surexprimés (profils monotones) après une administration intramusculaire de propylène glycol (cf. tableau 1).



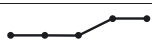





Profils	Fonction biologique	Nom du gène (source Swissprot)
	Inflammation, réaction immune Métabolisme Transport vésiculaire Cytosquelette Matrice extracellulaire Transduction du signal Transcription Conformation protéique Interaction protéique Protéolyse Prolifération cellulaire Interaction avec l'ADN ? Inconnue	NF-kappaB inhibitor-like protein 1 (NFKBIL1), Lactotransferrin (LTF), Major seminal plasma glycoprotein (PSP1) Cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1 (CYP19A1) Synaptophysin-like protein (SYPL) Actin beta (ACTB), Collagen type VI alpha 1 (COL6A1) Annexin A6 (ANXA6), Guanine nucleotide binding protein (GNB2, protéine G), Glia maturation factor gamma (GMFG), ATPase Ca ⁺⁺ transporting plasma membrane 2 (ATP2B2), Nucleoprotein (TPR), Tensin (TNS, voie de signalisation JNK et p38 MAPK) Glycyl-tRNA synthetase Purine (GARS) Peptidylprolyl isomerase A, Cyclophilin A (PPIA), Heat shock 70kDa protein 1 (HSPA1A) Ankyrin repeat domain 6 (ANKRD6) Carboxypeptidase D (CPD) FYN oncogene related to SRC (FYN), BCL2-associated athanogene (BAG3, antiapoptotique) « Zn finger prot (FLJ31121) » C6orf134, C20orf160, KIAA0644
	Inflammation, réaction immune Métabolisme mitochondrial Cytosquelette Transduction du signal Synthèse protéique Conformation protéique Protéolyse Inconnue	Beta-2 microglobulin (B2M), Thymosin beta-4 (TMSB4), HLA-B associated transcript 1 (BAT1), Ferritin heavy polypeptide (FTH), Ferritin light polypeptide (FLH) Cytochrome c oxidase III (MTCO3), ATP synthase alpha chain, mitochondrial (ATP5A1) Tubulin alpha 1 (TUBA1), Vimentin (VIM), Cofilin 1 (CFL1) Heat shock protein HSP 90-alpha (HSPCA), Follicle stimulating hormone beta polypeptide (FSHB) Ribosomal proteins L8, L11, L18, L19, L23, L28, S3, S5, S11, S15, S19, S26, Translation elongation factor 1 alpha 1 (EEF1A1) Cyclophilin B (PPIB) Calpain small subunit 1 (CAPNS1), Legumain, protease cystein (LGMN) C20orf178
	Inflammation, réaction immune Croissance cellulaire	Complement cytolysis inhibitor ou Clusterin (CLU) Osteonectin (SPARC), H19
	Métabolisme Protéolyse	Pyruvate kinase (PKM) Matrix metalloproteinase 2 (MMP2)
	Structure	Collagen type 1 alpha 1 (COL1A1), Collagen type 1 alpha 2 (COL1A2), Fibronectin (FN)
	Matrice extracellulaire	Collagen type 1 alpha 2 (COL1A2)

Tableau 3 - Profils d'expression des gènes surexprimés (profils biphasiques) après une administration intramusculaire de propylène glycol (cf. tableau 1).

Profils	Fonction biologique	Nom du gène (source Swissprot)
	Synthèse protéique Transport de l'oxygène Interaction protéique Transduction du signal	18S ribosomal subunit Hemoglobin beta chain (HBB) Ankyrin repeat domain 2 (ANKRD2) Ras-related associated with diabetes (RRAD)
	Structure	Desmin (DES)

observe, dès 48 heures, une augmentation de la transcription des différentes sous unités du collagène.

La tensine, une protéine dont le gène est activé 6 heures après l'induction de la lésion, est impliquée dans la régénération musculaire : l'inactivation du gène entraîne chez la souris un retard de 48 h dans le processus de régénération (ISHII et LO, 2001).

La desmine et la vimentine sont des protéines des filaments intermédiaires. La desmine est spécifique du muscle et son expression dans les myoblastes prolifératifs commence dès 12 heures après l'induction de la lésion pour augmenter ensuite. Elle est utilisée comme index de la régénération musculaire squelettique (RANTANEN et al, 1995 ; ISHII et LO, 2001). La vimentine est également exprimée uniformément dans les myofibres au cours de la régénération, mais également dans les macrophages, les fibrocytes et les mononucléaires ; elle est utilisée comme indice de la fibrose (KASEMKIJWATTANA et al, 1998). Dans nos expériences, l'expression de la desmine et de la vimentine est augmentée à 48 heures, ce qui est en accord avec une régénération musculaire précoce. L'ensemble de ces modifications est révélateur de la mise en place d'un processus de régénération.

CONCLUSION

Cette étude démontre pour la première fois l'intérêt d'une analyse cinétique du transcriptome musculaire pour la compréhension physiopathologique des lésions au point d'injection. L'originalité de ce travail réside également dans l'obtention d'échantillons à différents stades lésionnels sur le même animal. Le rôle physiopathologique des gènes pour lesquels des variations de transcriptome ont été étudiés reste néanmoins hypothétique et nécessite des études complémentaires plus ciblées sur des phases précises du développement lésionnel en relation avec une évaluation histologique de la réponse tissulaire.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient Cécile TONON (Génopole Toulouse, <http://crgs.genopole-toulouse.prd.fr>) pour son aide dans le développement de l'outil transcriptome. Nous remercions aussi Rémi HOULGATTE, du laboratoire TAGC de Marseille, pour ses nombreux conseils et Christian BENDIXEN pour les clones de la banque spécifique muscle. Nos remerciements vont aussi à Francis BENNE et Janine RALLIÈRES pour leur soutien technique.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ANDREEVA L., HEADS R., GREEN C.J., 1999. *Int. J. Exp. Pathol.*, 80, 305-315.
- BRAZMA A., HINGAMP P., QUACKENBUSH J., SHERLOCK G., SPELLMAN P., STOECKERT C., AACH J., ANSORGE W., BALL C.A., CAUSTON H.C., GAASTERLAND T., GLENISSON P., HOLSTEGE F.C., KIM I.F., MARKOWITZ V., MATESE J.C., PARKINSON H., ROBINSON A., SARKANS U., SCHULZE-KREMER S., STEWART J., TAYLOR R., VILO J., VINGRON M., 2001. *Nat. Genet.*, 29, 365-371.
- FERRE P.J., CONCORDET D., LAROUTE V., CHANOIT G.P., FERRE J.P., MANESSE M., LEFEBVRE H.P., 2001. *Am. J. Vet. Res.*, 62, 1698-1705.
- HURME T., KALIMO H., LEHTO M., JARVINEN M., 1991. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 23, 801-810.
- ISHII A., LO S.H., 2001. *Biochem. J.*, 356, 737-745.
- KASEMKIJWATTANA C., MENETREY J., SOMOGYL G., MORELAND M.S., FU F.H., BURANAPANITKIT B., WATKINS S.C., HUARD J., 1998. *Cell Transplant.*, 7, 585-598.
- LEFEBVRE H.P., LAROUTE V., BRAUN J.P., LASSOURD V., TOUTAIN P.L., 1996. *Vet. Res.*, 27, 343-361.
- LOPEZ F., ROUGEMONT J., LORIOD B., BOURGEOIS A., LOI L., BERTUCCI F., HINGAMP P., HOULGATTE R., GRANJEAUD S., 2004. *BMC Genomics*, 5, 38.
- RANTANEN J., HURME T., LUKKA R., HEINO J., KALIMO H., 1995. *Lab. Invest.*, 72, 341-347.
- WEI Y., MILLER S.C., TSUJI Y., TORTI S.V., TORTI F.M., 1990. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 169, 289-296.