



HAL
open science

Implication du système protéolytique neutre calcium-dépendant au cours de l'adhésion et de la migration des cellules myogéniques et lors de l'invasion tumorale

Ludovic Leloup

► **To cite this version:**

Ludovic Leloup. Implication du système protéolytique neutre calcium-dépendant au cours de l'adhésion et de la migration des cellules myogéniques et lors de l'invasion tumorale. Sciences du Vivant [q-bio]. Université des Sciences et Technologies (Bordeaux 1), 2007. Français. NNT: . tel-02819353

HAL Id: tel-02819353

<https://hal.inrae.fr/tel-02819353v1>

Submitted on 12 Dec 2024

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

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

Thèse n° 3365

THÈSE
PRESENTÉE À
L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DU VIVANT, GÉOSCIENCES
ET SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

Par Monsieur **Ludovic LELOUP**

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : SCIENCES DES ALIMENTS ET NUTRITION

**Implication du système protéolytique neutre calcium-dépendant
au cours de l'adhésion et de la migration des cellules myogéniques
et lors de l'invasion tumorale**

Soutenue le 27 avril 2007

Après avis de :

Mme A. BONNIEU, Chargée de Recherche (I.N.R.A. de Montpellier)

Mr D. BECHET, Directeur de Recherche (I.N.R.A. de Theix)

Devant la commission d'examen formée de Mme et MM.

P. COTTIN, Professeur à l'Université Bordeaux 1

Président du jury

V. MOULY, Chargé de Recherche C.N.R.S.

Rapporteur de soutenance

D. BECHET, Directeur de Recherche (I.N.R.A. de Theix)

Rapporteur

A. BONNIEU, Chargée de Recherche (I.N.R.A. de Montpellier)

Rapporteur

P. THIEBAUD, Chargé de Recherche C.N.R.S., Université Bordeaux 2

Examineur

J.-J. BRUSTIS, Professeur à l'Université Bordeaux 1

Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer toute ma reconnaissance à Monsieur le professeur Jean-Jacques BRUSTIS qui m'a accepté au sein de son équipe, malgré mon DEA de microbiologie. Son soutien, son encadrement et sa gentillesse m'ont été précieux au cours de ces quatre années de thèse.

J'exprime également ma gratitude à Monsieur le professeur Patrick COTTIN pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire ainsi que pour ses conseils et sa gentillesse.

Je remercie sincèrement Madame Anne BONNIEU (chargée de recherche INRA) et Monsieur Daniel BECHET (directeur de recherche INRA) pour avoir pris le temps de lire et de juger mon travail de thèse. Je remercie également Messieurs Vincent MOULY et Pierre THIEBAUD (chargés de recherche CNRS) pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

J'exprime ma reconnaissance à Madame Laetitia DAURY-JOUCLA pour sa gentillesse et pour l'aide et les conseils qu'elle m'a apportés tout au long de ma thèse. J'ai pris beaucoup de plaisir à travailler avec elle au sein de la même équipe.

Je tiens également à remercier Madame Elise DARGELOS pour son aide lors des TP de microbiologie mais aussi et surtout pour ses conseils linguistiques. Thank you very much for your advices and your kindness.

J'adresse ma sympathie à Amélie PIRES-ALVES et à Cindy MERLET. J'ai beaucoup apprécié leur gentillesse et leur bonne humeur.

Je remercie Pierre LOCHET pour son aide informatique, sa bonne humeur et ses nombreuses blagues, bien que je ne les ai pas encore toutes comprises !

Un grand merci à tous les autres membres du laboratoire, Jean-Louis AZANZA, Cynthia DUBOURG, Sylvie POUSSARD, Jacques RAYMOND, Abdessatar Hadj SASSI et Philippe VESCHAMBRE, avec qui j'ai pris beaucoup de plaisir à travailler.

J'exprime toute ma gratitude et ma sympathie à Matenin KONE (dite Maât), à Pascal STUELSATZ et à Cédric BRULE pour leur gentillesse, leur amitié et leur soutien. Je leur souhaite de réussir leurs différents projets, scientifiques ou non.

Un très grand merci à Hélène ROUMES (prononcer « roume » et pas « roumesse » !) et à Claire MALAUZAT qui m'ont supporté (dans tous les sens du terme) pendant ma dernière année de thèse. Je les remercie pour leur soutien, leur sympathie et pour avoir su repérer les (quelques) fautes d'orthographe que j'avais soigneusement cachées dans ma thèse. Je remercie également Laure, Dalila et Benoît qui, bien qu'ils aient travaillé avec moi, ont réussi à terminer leur stage au laboratoire.

Une mention spéciale à Monsieur GOUDENEGE, ou plutôt docteur GOUDENEGE (alias Seb). Je souhaite le remercier pour tous les conseils qu'il m'a donnés, quel que soit le sujet, pour sa gentillesse, sa sympathie et sa bonne humeur. J'ai beaucoup apprécié les débats que l'on a eus au cours de nos thèses. Nous étions rarement d'accord mais il faut noter que j'avais (presque) toujours raison !!! Bon vent mister Goudenege !

Pour terminer, je tiens à remercier ma famille ainsi que mes amis qui, malgré leur dégoût des Sciences (n'est-ce pas Sarah !), ont su me soutenir tout au long de ces quatre années. Merci beaucoup.

Sommaire

AVANT-PROPOS	1
INTRODUCTION	3
Chapitre 1 : La protéolyse neutre calcium-dépendante	3
1. Les systèmes protéolytiques	3
1.1. Le système protéolytique ATP-dépendant	4
1.2. La voie lysosomale	5
1.3. La voie des caspases	7
2. Le système protéolytique neutre calcium-dépendant	9
2.1. Les calpaïnes	10
2.1.1. Nomenclature	10
2.1.2. Les calpaïnes ubiquitaires	12
2.1.3. Les calpaïnes tissu-spécifiques	17
2.2. Activation des calpaïnes ubiquitaires	19
2.2.1. Mécanismes d'activation	19
2.2.2. Problèmes liés aux concentrations calciques	22
2.3. Régulation de l'activité et de l'expression des calpaïnes	23
2.3.1. La calpastatine	23
2.3.2. Les phosphorylations	26
2.3.3. Régulation par les MRF	26
2.4. Localisation des calpaïnes ubiquitaires	27
2.5. Substrats des calpaïnes ubiquitaires	28
2.6. Fonctions physiologiques des calpaïnes ubiquitaires	29
2.7. Pathologies liées aux calpaïnes – « Calpaïnopathies »	30
Chapitre 2 : Adhésion et migration au cours du développement du muscle squelettique	33
1. La myogenèse	33
1.1. Description de la myogenèse	33
1.2. Les MRF	35

1.2.1. Régulation des MRF	36
1.2.2. Gènes cibles des MRF	37
1.3. La fusion des myoblastes	37
1.4. Implication des calpaïnes	38
2. L'adhésion	39
2.1. Composition des plaques d'adhésion	39
2.1.1. Les protéines transmembranaires	40
2.1.2. Les protéines cytoplasmiques	41
2.2. Formation des plaques d'adhésion	42
2.3. L'étalement cellulaire	44
2.4. Implication des calpaïnes dans les phénomènes d'adhésion	44
3. La migration cellulaire	45
3.1. Principe et étapes de la migration	45
3.2. Rôle du cytosquelette dans la migration cellulaire	48
3.2.1. Le cytosquelette d'actine	48
3.2.2. Les microtubules	50
3.3. Implication des calpaïnes	51
3.4. Implication des facteurs de croissance	53
Chapitre 3 : Invasion tumorale et rhabdomyosarcomes	56
1. Caractéristiques de l'invasion tumorale	56
1.1. Les podosomes et les invadopodes	58
1.2. Implication des calpaïnes dans l'invasion tumorale	59
2. Les rhabdomyosarcomes	60
2.1. Caractéristiques générales	60
2.2. Caractéristiques génétiques	61
2.3. Développement métastatique des rhabdomyosarcomes	63
RÉSULTATS	65
Chapitre 1 : Implication des calpaïnes ubiquitaires dans l'adhésion et l'étalement des cellules myogéniques	65
➤ Article 1 : Myoblast attachment and spreading are regulated by different patterns by ubiquitous calpains (<i>Cell Motility and the Cytoskeleton</i> ; 2006)	68

Chapitre 2 : Implication des calpaïnes ubiquitaires dans la migration des myoblastes induite par les facteurs de croissance	83
➤ Article 2 : Involvement of calpains in growth factor-mediated migration (<i>The International Journal of Biochemistry & Cell Biology</i> ; 2006)	86
Chapitre 3 : Implication de la voie ERK/MAPK dans l'activation de la m-calpaïne et de la migration par les facteurs de croissance	101
➤ Article 3 : Involvement of ERK/MAP Kinase signalling pathway in m-calpain activation and myogenic cell migration (<i>IJBCB</i> ; <i>en révision</i>)	104
Chapitre 4 : Implication du système protéolytique calcium-dépendant dans l'invasion tumorale des rhabdomyosarcomes	138
➤ Article 4 : <i>En préparation</i>	139
CONCLUSION & PERSPECTIVES	161
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	165

Table des illustrations

➤ **Figures :**

Figure 1 : Assemblage et fonctionnement du protéasome	5
Figure 2 : Fonctionnement de la voie lysosomale	7
Figure 3 : Structure et activation des caspases	9
Figure 4 : Structure schématique de la μ -calpaïne et de la m-calpaïne	12
Figure 5 : Structure en 3D de la m-calpaïne	15
Figure 6 : Structure schématique de la calpaïne 3a	18
Figure 7 : Modèle d'activation des calpaïnes proposé par Suzuki et Sorimachi	21
Figure 8 : Structure schématique de la calpastatine humaine	24
Figure 9 : Représentation schématique du modèle d'interaction calpastatine/calpaïne	25
Figure 10 : Représentation schématique des différentes étapes de la myogenèse	34
Figure 11 : Représentation schématique de la fixation d'un facteur de transcription de type bHLH à l'ADN	35
Figure 12 : Représentation schématique des étapes de la fusion des myoblastes	38
Figure 13 : Représentation schématique des principales interactions possibles entre les protéines composant les plaques d'adhésion	40
Figure 14 : Formation des plaques d'adhésion par recrutement séquentiel des protéines cytoplasmiques par les intégrines	43
Figure 15 : Formation des nouvelles plaques d'adhésion lors de l'étalement cellulaire	44
Figure 16 : Les différentes étapes de la migration cellulaire	46
Figure 17 : Relation entre l'adhésion et la vitesse de migration cellulaire	47
Figure 18 : Les différents modes de polymérisation de l'actine conduisant à la formation des lamellipodes et des filopodes	49
Figure 19 : Modèle d'action des calpaïnes ubiquitaires lors de la migration cellulaire	53
Figure 20 : Représentation schématique des voies de signalisation cellulaire ERK/MAPK (A), PI3K/Akt (B) et Smad (C)	54
Figure 21 : Les différentes étapes de la progression métastatique	57
Figure 22 : Représentation schématique de l'organisation des complexes focaux, des podosomes et des invadopodes	58
Figure 23 : Structure des gènes PAX3 et FKHR ainsi que du produit de fusion PAX3/FKHR dû à la translocation t(2 ; 13)(q35 ; q14), caractéristique des ARMS	62

➤ **Tableaux :**

Tableau I : Nomenclature internationale des calpaïnes

11

Table des abréviations

- ADN** : Acide désoxyribonucléique
- ADNc** : Acide désoxyribonucléique complémentaire
- ARMS** : Alveolar rhabdomyosarcoma
- ARN** : Acide ribonucléique
- ATP** : Adénosine triphosphate
- bHLH** : Basic helix-loop-helix
- EDTA** : Acide éthylène diamine tétraacétique
- EGF** : Epidermal growth factor
- ERK** : Extracellular signal-regulated kinase
- ERMS** : Embryonic rhabdomyosarcoma
- FAK** : Focal adhesion kinase
- FGF** : Fibroblast growth factor
- HGF** : Hepatocyte growth factor
- IGF-1 / -2** : Insulin-like growth factor-1 / -2
- Kd** : Constante de dissociation
- kDa** : Kilodaltons
- LGMD2A** : Limb-girdle muscular dystrophy type 2A
- MAPK** : Mitogen activated protein kinase
- MARCKS** : Myristoylated alanine-rich C kinase substrate
- MEC** : Matrice extracellulaire
- MEK** : MAP/ERK kinase
- MEKK** : MEK kinase
- MMP** : Matrix metalloproteinase
- MRF** : Myogenic regulatory factor
- PDGF** : Platelet-derived growth factor
- pH** : Potentiel hydrogène
- PI3K** : Phosphatidyl inositol 3 kinase
- PIP2** : Phosphatidyl-inositol-diphosphate
- PIP3** : Phosphatidyl-inositol-(3, 4, 5)-triphosphate
- PKA** : Protéine kinase A
- PKB** : Protéine kinase B (également appelée Akt)

PKC : Protéine kinase C

RMS : Rhabdomyosarcomes

SDS : Sodium dodécyl sulfate

SDS-PAGE : Sodium dodécyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis

TGF- β : Transforming growth factor- β

VEGF: Vascular endothelial growth factor

Avant-propos

Avant-propos

La thématique de recherche du laboratoire s'intéresse à l'implication du système protéolytique neutre calcium-dépendant au cours de la croissance et du développement du muscle. Ce système protéolytique est constitué de quatorze enzymes, dont les principales sont la μ - et la m-calpaïne. Ces deux protéases ubiquitaires ainsi que leur inhibiteur endogène, la calpastatine, sont impliqués dans de très nombreux phénomènes biologiques tels que le développement embryonnaire, le cycle cellulaire, l'apoptose, la signalisation cellulaire et la myogenèse. Des dérégulations de l'activité de ces enzymes sont également associées à des pathologies parfois sévères. C'est notamment le cas des dystrophies musculaires, des maladies d'Huntington, de Parkinson et d'Alzheimer ainsi que de la cataracte et du psoriasis.

Les travaux réalisés au laboratoire ont clairement démontré que ces enzymes sont fortement impliquées au cours de la myogenèse et notamment lors des stades précoces de ce phénomène. L'activité des calpaïnes est plus particulièrement requise au cours de la fusion des myoblastes. Ces enzymes permettraient aux cellules de fusionner en dégradant certains substrats tels que la desmine ou la taline. La m-calpaïne extériorisée cliverait également la fibronectine au cours de ce phénomène.

Le nouvel axe de recherche de notre équipe qui s'intègre dans la thématique générale du laboratoire, s'intéresse plus particulièrement à l'implication de la μ - et de la m-calpaïne au cours de l'adhésion et de la migration des cellules myogéniques. Ces phénomènes étroitement liés sont indispensables à la fusion des myoblastes étape clef de la myogenèse. Les résultats obtenus précédemment suggèrent que les deux calpaïnes ubiquitaires sont nécessaires à la migration des myoblastes. En effet, l'inhibition de l'activité et/ou de l'expression de ces enzymes conduit à forte réduction de la motilité des cellules myogéniques et à la désorganisation de leur cytosquelette d'actine (Dedieu *et al.*, 2004).

En nous appuyant sur ces résultats nouveaux, notre objectif a été de compléter et de poursuivre l'étude du rôle des calpaïnes dans les processus conduisant à l'adhésion et à la migration des cellules musculaires. Dans un premier temps, j'ai participé aux travaux concernant l'adhésion des myoblastes et le rôle des calpaïnes au cours de ce processus. Puis, nous avons entrepris de stimuler la migration des cellules myogéniques en agissant directement (par surexpression) ou indirectement (*via* des facteurs de croissance) sur l'activité

des calpaïnes. Les résultats, démontrant le rôle primordial des calpaïnes, ont été complétés par l'étude des voies de signalisation responsables de l'activation de ces protéases après l'addition des facteurs de croissance. Un petit nombre de travaux récents faisant état de l'implication des calpaïnes dans différents types de cancer, nous avons initié une étude concernant le rôle de ces enzymes lors de l'invasion tumorale. Pour cela nous avons comparé les systèmes protéolytiques calcium-dépendant de cellules musculaires tumorales et invasives (les rhabdomyosarcomes) et de cellules musculaires saines.

La partie introductive de ce travail est organisée en trois chapitres intitulés :

- le système protéolytique neutre calcium-dépendant
- adhésion et migration au cours du développement du muscle squelettique
- invasion tumorale et rhabdomyosarcomes

La seconde partie présente, sous forme de publications, les résultats de nos investigations. Pour clore ce mémoire, nous présenterons les conclusions et les perspectives de recherche des travaux réalisés au cours de cette étude.

Introducción

Chapitre 1 : La protéolyse neutre calcium-dépendante

La dégradation des protéines cellulaires, ou protéolyse intracellulaire, est un phénomène indispensable à la vie de la cellule. En effet, contrairement à l'ADN et à l'instar des ARNs, les protéines de la cellule doivent être renouvelées en permanence. Ce processus implique des enzymes appelées protéases, dont l'action peut être limitée ou totale (catabolisme protéique). Dans le premier cas, la protéine est coupée en peptides plus ou moins longs, permettant éventuellement de faciliter la protéolyse totale. Cette dernière consiste en une dégradation de la protéine en acides aminés.

Ces deux types de protéolyse jouent des rôles majeurs dans la vie de la cellule, mais ne sont pas impliqués dans les mêmes phénomènes biologiques. La dégradation totale des protéines excédentaires, défectueuses ou anormales permet le renouvellement des protéines, le recyclage des acides aminés et le « ménage » cellulaire, ainsi que l'adaptation des cellules à de nouvelles conditions environnementales. Le catabolisme protéique est également impliqué dans la production d'énergie à partir des protéines lors de carences graves et dans la mort cellulaire par apoptose. Quant à la protéolyse limitée, elle joue un rôle important dans la réponse immunitaire (génération des peptides antigéniques) et dans la maturation des enzymes synthétisées sous forme de zymogènes.

Les enzymes responsables de la protéolyse intracellulaire font partie de différents systèmes protéolytiques dont les fonctions et les mécanismes d'action peuvent être très différents.

1. Les systèmes protéolytiques

Les quatre principaux systèmes protéolytiques sont les suivants : le système ATP-dépendant, la voie lysosomale, la voie des caspases et le système neutre calcium-dépendant.

1.1. Le système protéolytique ATP-dépendant

Le système protéolytique ATP-dépendant ou système ubiquitine/protéasome, joue un rôle majeur dans la protéolyse intracellulaire. Il permet la dégradation des protéines ubiquitinylées en présence d'ATP dans le noyau et dans le cytoplasme (Coux *et al.*, 1996 ; Voges *et al.*, 1999). La protéase responsable de la protéolyse ATP-dépendante n'a été identifiée que dans les années 1970. Il s'agit du protéasome ou protéasome 26S également appelé prosome ou protéase multicatalytique.

Le protéasome 26S est un assemblage constitué du protéasome 20S et du complexe régulateur 19S. La formation de cet ensemble d'environ 2 000 kDa nécessite la présence d'ATP (Figure 1).

Le protéasome 20S est une particule stable d'environ 700 kDa, en forme de cylindre creux, composée de 28 sous-unités apparentées. Chez les Eucaryotes, on observe 14 sous-unités différentes. Ces sous-unités sont organisées en 4 anneaux heptamériques : les deux anneaux externes sont composés de 7 sous-unités α différentes alors que les deux anneaux centraux se composent de 7 sous-unités β différentes (Rivett *et al.*, 1991 ; Figure 1). Les sous-unités α permettent la fixation du complexe 19S et contrôlent l'entrée des protéines à dégrader dans la chambre catalytique. Les sous-unités β portent les sites actifs du protéasome. Le protéasome 20S possède au moins cinq activités peptidasiques différentes, mais seulement trois ont actuellement été identifiées (chymotrypsine-like, trypsine-like et caspase-like).

Le complexe régulateur 19S (la coiffe), composé de 18 sous-unités, se lie aux deux extrémités du protéasome 20S pour former le protéasome 26S (Figure 1). Il apporte au complexe des sous-unités capables de reconnaître les chaînes d'ubiquitines, de dénaturer la protéine pour permettre son entrée dans la chambre et de recycler l'ubiquitine. La coiffe possède également six ATPases qui fournissent l'énergie nécessaire à la dénaturation des protéines et à l'activation du protéasome 20S (Braun *et al.*, 1999).

Le protéasome 26S dégrade les protéines possédant une chaîne d'ubiquitine, qui sert de signal de destruction de la protéine. L'ubiquitine (76 acides aminés) est liée à la protéine par un système de trois enzymes : E1 (qui active l'ubiquitine), E2 (enzyme de conjugaison) et E3 (enzyme de ligation). La polyubiquitinylation nécessite la présence d'ATP et permet la sélectivité des protéines à dégrader (Ciechanover, 1994).

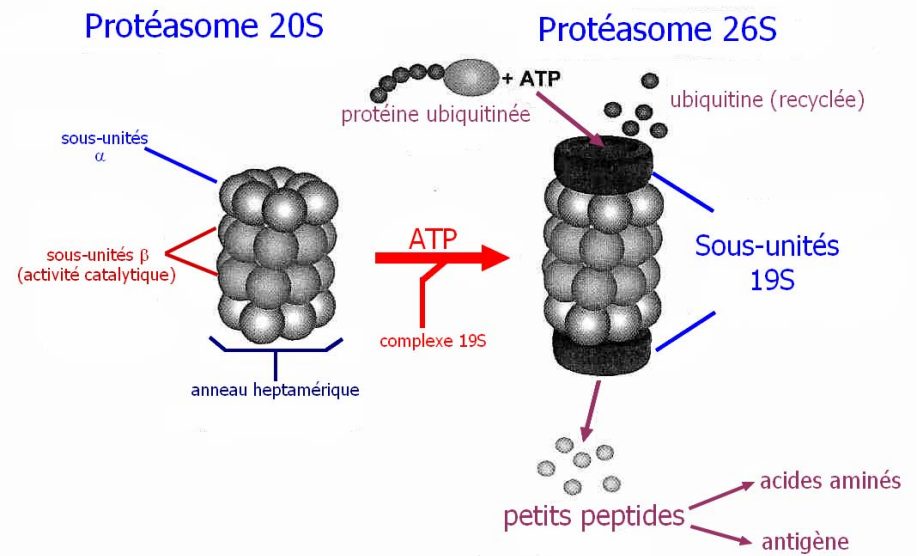


Figure 1 : assemblage et fonctionnement du protéasome 26S

En présence d'ATP, le protéasome 20S, constitué de 4 anneaux heptamériques, et le complexe régulateur 19S forment le protéasome 26S. Ce dernier dégrade les protéines ubiquitinylées en petits peptides qui serviront de peptides antigéniques ou qui seront hydrolysés en acides aminés. L'ubiquitine, reconnue par le complexe 19S, est recyclée.

La dégradation des protéines par le protéasome entraîne la formation de peptides de 3 à 20 acides aminés (Coux *et al.*, 1996 ; Voges *et al.*, 1999). Ces peptides peuvent être hydrolysés en acides aminés, permettant le recyclage de ces derniers, ou servir de peptides antigéniques. Le rôle principal du système protéolytique ubiquitine/protéasome est la dégradation des protéines anormales ou mal assemblées (Werner *et al.*, 1996). Cependant, il joue également un rôle dans la régulation du cycle cellulaire, la régulation des facteurs de transcription, la régulation d'enzymes et la dégradation de protéines contractiles du muscle squelettique entraînant la perte musculaire (Attaix *et al.*, 2005).

1.2. La voie lysosomale

Les lysosomes, responsables de la protéolyse lysosomale, sont des organites cellulaires présents dans le cytoplasme des cellules eucaryotes. Dans leur forme la plus simple, les lysosomes sont des vésicules sphériques d'environ 0,5 µm, dont la forme et la taille varient en fonction des matériaux capturés destinés à la dégradation. Leur nom de lysosome, dérivé du grec *lithos*, pierre et *soma*, corps, est dû à leur aspect granuleux. Ils furent décrits pour la première fois par Christian de Duve en 1955.

Ces vésicules cytoplasmiques monomembranaires sont d'origine golgienne et leur pH interne est acide (Holzman, 1989). Ce pH, maintenu entre 4,5 et 5 par des pompes à protons, est nécessaire au bon fonctionnement des enzymes lysosomales (les lysozymes). Ces hydrolases acides sont inopérantes dans le cytoplasme où le pH est proche de 7. Les lysozymes permettent la dégradation de toutes les macromolécules capturées par les lysosomes. Ces hydrolases sont de différents types : nucléases (RNases et DNases), lipases, glycosidases et protéases. La protéolyse lysosomale est principalement assurée par les cathepsines. Ces endoprotéases forment une famille d'au moins 11 membres, dont les cathepsines B, D, H et L, présentes dans les lysosomes du muscle squelettique. Une augmentation de l'activité des cathepsines B et L a été observée lors de la différenciation des myoblastes de souris C2C12 ainsi que dans les myoblastes de veau fœtal (Béchet *et al.*, 1991 ; Ebisui *et al.*, 1995). L'activité des cathepsines est régulée par leur inhibiteur spécifique, la cystatine (Abrahamson *et al.*, 2003 ; Barrett, 1987).

Les lysosomes se forment au niveau de l'appareil de Golgi et se déplacent vers la membrane plasmique avec laquelle ils fusionnent. En 1957, de Duve a identifié deux types de lysosomes : les lysosomes primaires et les lysosomes secondaires. Ces derniers se forment par fusion des lysosomes primaires avec des vacuoles telles que les phagosomes et les vésicules autophagiques ou autophagosomes (Figure 2).

Les lysosomes sont impliqués dans les phénomènes d'hétérophagie et d'autophagie. L'hétérophagie est la digestion de matériaux provenant de l'extérieur de la cellule tels que des bactéries ou des substances alimentaires. Ces matériaux sont capturés par phagocytose, pinocytose ou endocytose. Dans le cas de la phagocytose, un organisme étranger tel qu'une bactérie est capturé. Le phagosome ainsi formé fusionne avec un lysosome primaire pour former un lysosome secondaire. A l'inverse, l'autophagie concerne la digestion des matériaux cellulaires, tels que des protéines ou des organites comme les mitochondries. Cette fonction permet le recyclage des matériaux cellulaires et l'élimination de substances toxiques qui pourraient endommager la cellule en s'accumulant.

Les protéines cellulaires peuvent également traverser directement la membrane lysosomale. Les protéines empruntant cette voie présentent un motif peptidique commun (KFERQ) identifié par Chiang et Dice en 1988. Ce processus permet un passage plus rapide des protéines entraînant un catabolisme protéique accru notamment en période de carences.

Les produits de dégradation peuvent être récupérés par la cellule (les acides aminés par exemple) ou évacués à l'extérieur de la cellule par exocytose.

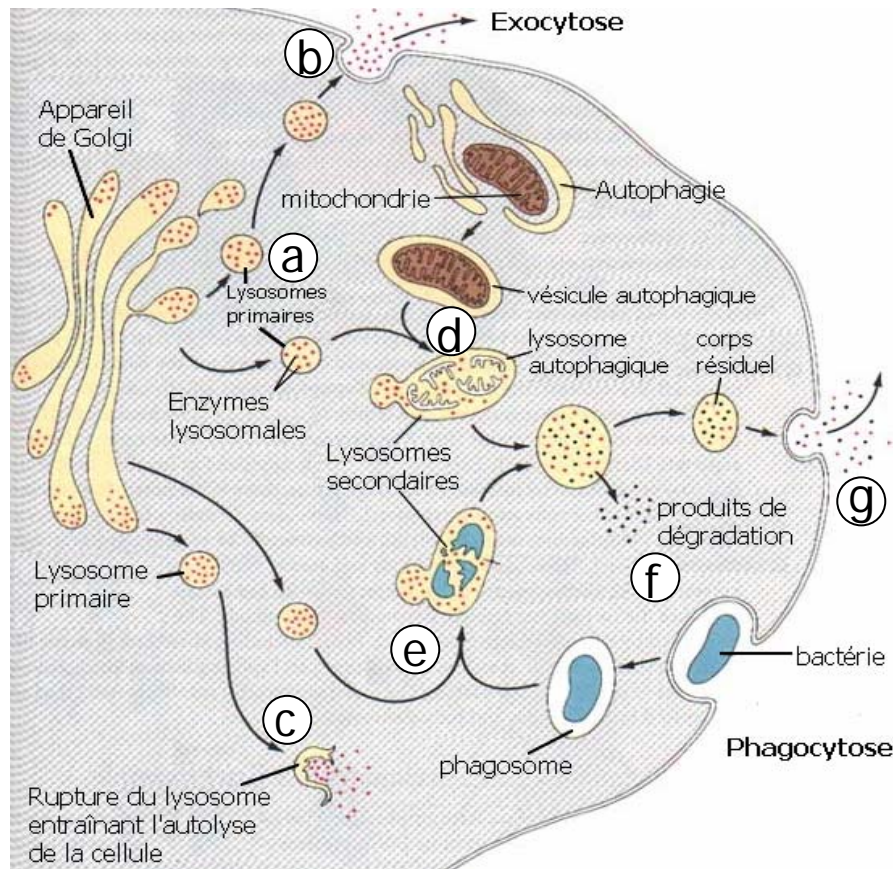


Figure 2 : fonctionnement de la voie lysosomale

Les lysosomes primaires, formés au niveau de l'appareil de Golgi (a), peuvent libérer leurs enzymes lysosomales à l'extérieur (par exocytose)(b) ou à l'intérieur de la cellule (c), entraînant l'autolyse de cette dernière. Ils peuvent également fusionner avec des vésicules autophagiques (d) ou avec des phagosomes (e) pour former des lysosomes secondaires. Les produits de dégradation sont recyclés par la cellule (f) et/ou évacués à l'extérieur par exocytose (g).

1.3. La voie des caspases

La voie des caspases est impliquée dans le phénomène de mort cellulaire programmée ou apoptose. L'importance du rôle joué par les caspases dans le processus apoptotique a été établie par Horvitz et ses collaborateurs lors de la découverte du gène *ced-3* chez *C. elegans* (Ellis & Horvitz, 1986). En 1993, Horvitz et Yuan ont montré que la protéine issue du gène *ced-3* était une cystéine-protéase similaire à la protéine ICE (*interleukin-1- β converting enzyme* ; Yuan *et al.*, 1993), enzyme impliquée dans l'apoptose chez les mammifères. La nomenclature actuelle ainsi que le nom « caspases » (pour *cysteiny-l-aspartate-cleaving*

proteases) ont été proposés en 1996 par Alnemri et ses collaborateurs. En application de cette nouvelle nomenclature, ICE fut rebaptisée caspase-1 (Alnemri *et al.*, 1996). Actuellement, quatorze caspases ont été identifiées chez les mammifères (Nicholson & Thornberry, 1997).

Les caspases clivent leurs substrats en aval d'un résidu aspartate. Contrairement aux cathepsines et au protéasome, les caspases sont responsables d'une protéolyse limitée et sont donc incapables de dégrader leurs substrats en acides aminés.

Au cours du processus apoptotique, les caspases inhibent les voies protectrices et activent les molécules participant à la mort cellulaire. Les caspases sont classées en trois groupes différents selon leurs activités et la taille de leur pro-domaine (Stennicke & Salvesen, 2000) :

- ✓ Les caspases inflammatoires : caspases-1, -4, -5, -11, -12, -13 et -14
- ✓ Les caspases apoptogènes dont :
 - Les caspases initiatrices : caspases-2, -8, -9 et -10
 - Les caspases effectrices : caspases-3, -6 et -7

Les caspases sont synthétisées sous forme de zymogènes inactifs, les pro-caspases. Ces zymogènes se composent d'un pro-domaine de taille variable (Cryns & Yuan, 1998) et de deux domaines à l'origine de la grande sous-unité (p20, 20 kDa) et la petite sous-unité (p10, 10 kDa) (Figure 3).

L'activation des caspases nécessite deux clivages successifs. Le premier libère la sous-unité p10 qui s'associe à la grande sous-unité p20. L'enzyme est alors partiellement clivée. Un second clivage entraîne la libération du pro-domaine. La caspase va alors s'assembler sous sa forme active, à savoir (p10/p20)₂ (Rotonda *et al.*, 1996 ; Walker *et al.*, 1994 ; Wilson *et al.*, 1994) (Figure 3).

Les caspases clivent des protéines de différents types telles que des protéines de structure, des protéines régulatrices du génome, des protéines impliquées dans la transduction du signal et des protéines impliquées dans l'apoptose. L'activation et les fonctions de ces protéases sont régulées par de nombreux facteurs comme les protéines Bcl-2, les calpaïnes et le calcium.

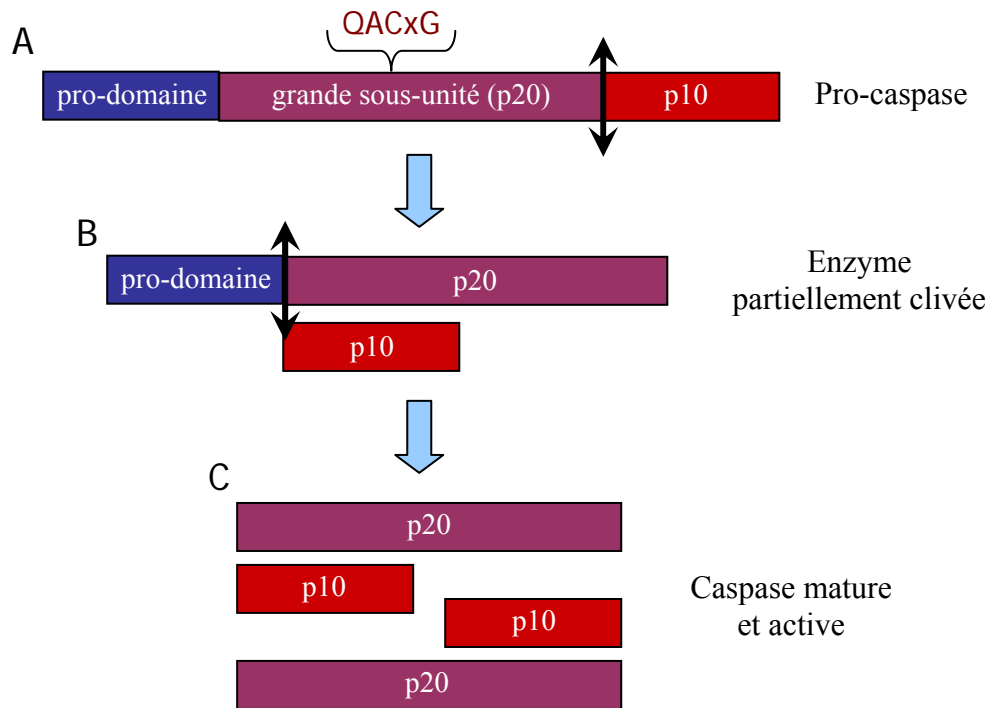


Figure 3 : Structure et activation des caspases (adapté de Rathmell & Thompson, 1999)

La séquence *QACxG* correspond au site actif des caspases ($x = R, Q$ ou G). Les flèches noires représentent les clivages nécessaires à l'activation des caspases. Le premier clivage libère *p10* (A) qui s'associe alors avec *p20*. Le second libère le *pro-domaine* (B). La caspase s'assemble alors sous sa forme mature et active ($p10/p20$)₂ (C).

Parmi les quatre principaux systèmes protéolytiques, nous nous intéresserons plus particulièrement au système protéolytique neutre calcium-dépendant.

2. Le système protéolytique neutre calcium-dépendant

Le calcium est essentiel à la vie de la cellule et à son bon fonctionnement. Il permet la transmission de signaux cellulaires, régule l'expression de certains gènes et est impliqué dans de nombreux phénomènes physiologiques tels que la sécrétion, la contraction musculaire et la mort cellulaire. Une élévation de la concentration intracellulaire en calcium peut être à l'origine de nombreuses pathologies comme l'hypertension, athérosclérose ou la cataracte (Berridge, 1994 ; Bootman & Berridge, 1995 ; Carafoli, 2002). Le calcium est également nécessaire au fonctionnement de nombreux systèmes enzymatiques et notamment du système protéolytique neutre calcium-dépendant. Les protéases responsables de la protéolyse neutre

calcium-dépendante sont appelées calpaïnes et nécessitent la présence du calcium pour leur activation.

2.1. Les calpaïnes

Les calpaïnes sont des cystéine-endopeptidases de type papaïne. Le site actif de ces protéases est composé des acides aminés C, H et N. Cette triade catalytique est commune à toutes les calpaïnes à l'exception de la calpaïne 6 (site actif : KHN).

Elles furent découvertes en 1964 par Guroff et ses collaborateurs. Les calpaïnes (pour calcium et papaïne) sont activées par le calcium à pH neutre (Croall & De Martino, 1991). A l'origine, le système protéolytique calcium-dépendant ne comprenait que trois molécules : deux protéases (la μ -calpaïne et la m-calpaïne) et une protéine inhibitrice de leur activité, la calpastatine. Actuellement la famille des calpaïnes compte quatorze membres (Tableau I). Toutefois parmi ces quatorze membres dont les séquences ADN ont été identifiées, seules les calpaïnes 1 et 2 ont été isolées sous leur forme protéique.

2.1.1. Nomenclature

La nomenclature actuellement utilisée a été adoptée lors de la conférence internationale de la FASEB en 2001. Elle permet notamment une meilleure identification des différents membres de la famille des calpaïnes (calpaïne 1 à 15, absence de calpaïne 4) (Tableau I).

Les calpaïnes peuvent être classées en deux groupes qui diffèrent par la présence ou l'absence d'un domaine « calmodulin-like ». Ce domaine comporte, comme la calmoduline, des EF-hands, structures décrites en 1972 par Kretsinger, capables de lier fortement le Ca^{2+} (Kd de 10^{-4} à 10^{-9} ; Ikura, 1996). Les calpaïnes dites typiques ou conventionnelles (calpaïnes 1, 2, 3, 8, 9, 11 et 12) possèdent ce domaine tandis que les calpaïnes atypiques en sont dépourvues (calpaïnes 5, 6, 7, 10, 13 et 15).

Une autre classification est également utilisée, distinguant les calpaïnes ubiquitaires (calpaïnes 1, 2, 5, 7, 10, 12, 14 et 15) des calpaïnes tissu-spécifiques (calpaïnes 3, 6, 8, 9, 11 et 13). Pour plus de clarté, nous utiliserons cette dernière classification.

Calpaïne	Gène	Autres noms	EF-hand	Tissus	Espèces	Chromosome
Calpaïne 1	<i>capn1</i>	μ-calpaïne, CAPN1	+	ubiquitaire	Homme Souris Rat	11q13 19 <i>non identifié</i>
Calpaïne 2	<i>capn2</i>	m-calpaïne, CAPN2	+	ubiquitaire	Homme Souris Rat	1q41 <i>non identifié</i> <i>non identifié</i>
Calpaïne 3	<i>capn3</i>	nCL-1, p94, (Lp82, Lp85, Rt88)	+	muscle squelettique, lentille, rétine	Homme Souris Rat	15q15.1 2 <i>non identifié</i>
Calpaïne 5	<i>capn5</i>	htra3, nCL-3	-	ubiquitaire	Homme Souris Rat	11q14 7 <i>non identifié</i>
Calpaïne 6	<i>capn6</i>	CAPNX, calpamodulin	-	placenta ?	Homme Souris Rat	Xq28 X <i>non identifié</i>
Calpaïne 7	<i>capn7</i>	palBH	-	ubiquitaire	Homme Souris Rat	3p24-p25 <i>non identifié</i> <i>non identifié</i>
Calpaïne 8	<i>capn8</i>	nCL-2	+	muqueuse stomacale	Homme Souris Rat	1q41 <i>non identifié</i> <i>non identifié</i>
Calpaïne 9	<i>capn9</i>	nCL-4	+	appareil digestif	Homme Souris Rat	1q42 <i>non identifié</i> <i>non identifié</i>
Calpaïne 10	<i>capn10</i>	CAPN10, CAPN8	-	ubiquitaire	Homme Souris Rat	2q37.3 <i>non identifié</i> <i>non identifié</i>
Calpaïne 11	<i>capn11</i>	CAPN11	+	testicules	Homme Souris Rat	6p12 <i>non identifié</i> <i>non identifié</i>
Calpaïne 12	<i>capn12</i>	CAPN12	+	ubiquitaire	Homme Souris Rat	<i>non identifié</i> 19q13 <i>non identifié</i>
Calpaïne 13	<i>capn13</i>	CAPN13	+	testicules, poumons	Homme	2p22.2-p22.3
Calpaïne 14	<i>capn14</i>	CAPN14	-	ubiquitaire	Homme	2p22.2-p22.3
Calpaïne 15	<i>capn15</i>	Sol H	-	ubiquitaire	Homme Souris Rat	16p13.3 17A3.3 <i>non identifié</i>
Calpain Small Subunit 1	<i>capn-s1</i> ou <i>cpns1</i>	CAPN4	+	ubiquitaire	Homme Souris Rat	19q13.1 <i>non identifié</i> <i>non identifié</i>
Calpain Small Subunit 2	<i>capn-s2</i> ou <i>cpns2</i>		+	<i>non identifié</i>	Homme Souris Rat	16 <i>non identifié</i> <i>non identifié</i>

**Tableau I : Nomenclature internationale des calpaïnes
(FASEB Summer Research Conferences, 2001)**

2.1.2. Les calpaïnes ubiquitaires

Les calpaïnes 1 et 2 sont les calpaïnes ubiquitaires les plus étudiées depuis deux décennies. Ces calpaïnes conventionnelles sont codées respectivement par les gènes *capn1* et *capn2*.

La calpaïne 1 et la calpaïne 2, également appelées sous-unités catalytiques, s'associent à une sous-unité régulatrice de 28 kDa pour former des hétérodimères structurellement très proches : la μ -calpaïne (micro-calpaïne) et la m-calpaïne (milli-calpaïne) (Figure 4). La sous-unité régulatrice a été considérée comme unique et commune aux deux isoformes jusqu'à l'identification d'une seconde sous-unité régulatrice (Schád *et al.*, 2002). La sous-unité régulatrice alors nommée calpaïne 4 est désormais appelée C_{ss}1 (*calpain small subunit 1*) et la seconde C_{ss}2 (Tableau I). La μ - et la m-calpaïne sont donc constituées d'une sous-unité catalytique propre à chacune d'elle et de l'une des deux sous-unités régulatrices (Figure 4).

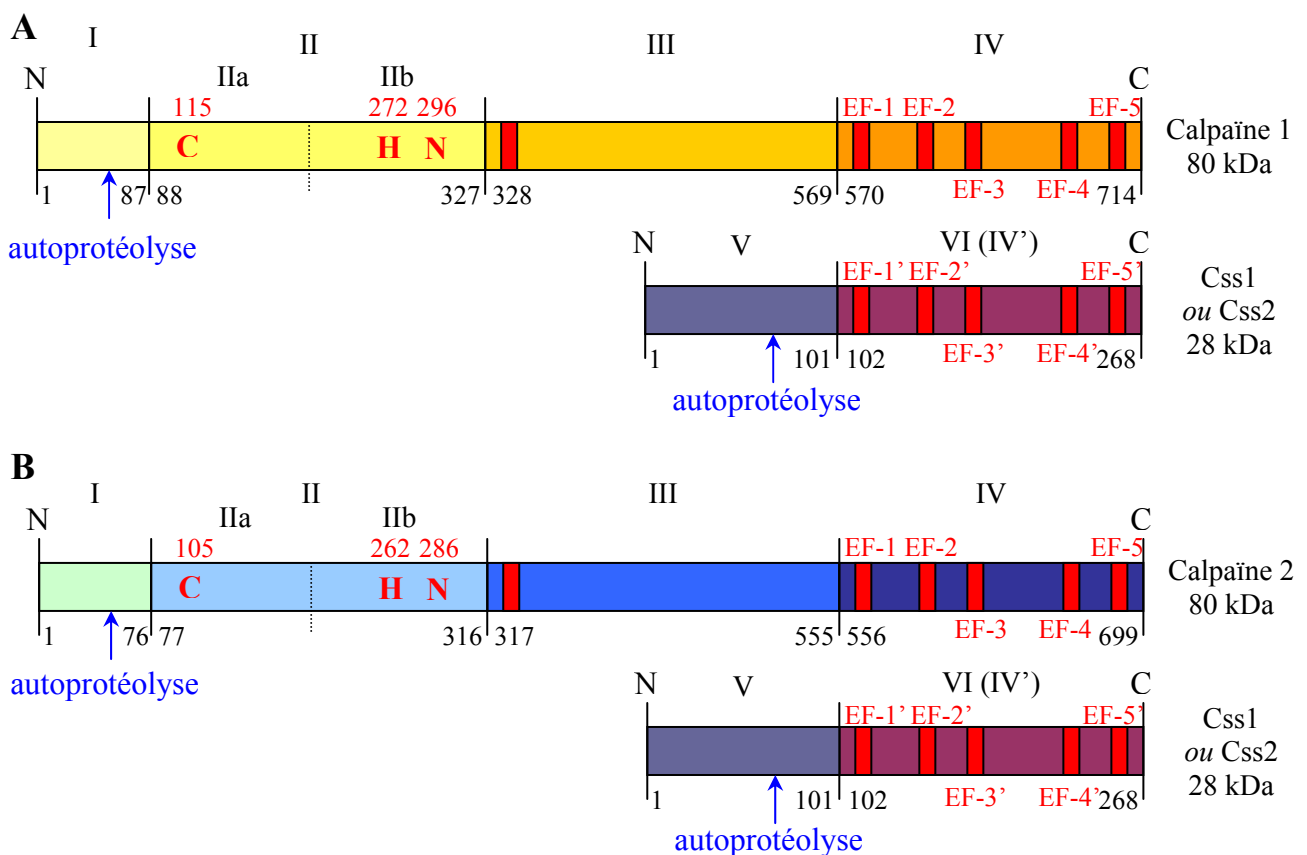


Figure 4 : Structures de la μ - (A) et de la m-calpaïne (B) (adapté de Goll *et al.*, 2003)

Les différents domaines sont représentés par I, II, III, IV, V et VI. IIa et IIb correspondent aux sous-domaines du domaine II. Les aminoacides C, H et N correspondent au site actif. Les structures EF-hand sont représentées par les rectangles rouges et les annotations EF-1 à EF-5 et EF-1' à EF-5'.

Les concentrations calciques nécessaires à l'activation de ces protéases sont très différentes et sont d'ailleurs à l'origine de leur nom (Suzuki, 1991). Ainsi l'activation *in vitro* de la μ -calpaïne nécessite des concentrations calciques de l'ordre du micromolaire, de 3 à 50 μ M selon Goll et ses collaborateurs (2003), alors que la m-calpaïne est activée par des concentrations proches du millimolaire, de 0,25 à 1 mM (Elce *et al.*, 1997 ; Suzuki *et al.*, 1979). Les niveaux d'expression de ces deux protéases sont également différents, la m-calpaïne étant l'isoforme majoritaire dans la plupart des tissus à l'exception des plaquettes où la μ -calpaïne prédomine (Sakon *et al.*, 1981 ; Tsujinaka *et al.*, 1982).

Les sous-unités catalytiques de la μ - et de la m-calpaïne (calpaïnes 1 et 2) présentent un poids moléculaire d'environ 80 kDa (81 889 Da pour la calpaïne 1 et 79 900 Da pour la calpaïne 2 chez l'homme) (Aoki *et al.*, 1986 ; Imajoh *et al.*, 1988) et sont composées respectivement de 714 et 699 acides aminés. Leurs structures sont organisées en quatre domaines différents (Figure 4) :

➤ Le domaine I

Le domaine I, N-terminal, est impliqué dans l'autolyse de la protéase. Il ne présente aucune homologie avec des polypeptides identifiés jusqu'à présent (Goll *et al.*, 2003). L'homologie de la séquence codant pour ce domaine varie de 72 à 86 % selon les espèces (homme, rat, porc, lapin, poulet).

➤ Le domaine II

Ce domaine porte le site actif de la protéase composé des acides aminés C, H et N en position 105, 262 et 286 pour la m-calpaïne et 115, 272 et 296 pour la μ -calpaïne. Ces résidus forment la triade catalytique caractéristique des protéases à cystéine telles que la papaïne et les cathepsines B, H, L et S. Cependant, le domaine II présente une homologie de séquence faible avec ces protéases à cystéine laissant penser qu'il a évolué à partir d'un gène ancestral différent (Goll *et al.*, 2003). Cette région peut être divisé en deux sous-domaines (IIa, portant la cystéine, et IIb, portant l'histidine et l'asparagine) formant une clef catalytique. Bien que dépourvu de structures EF-hand, chaque sous-domaine est capable de fixer un atome de calcium (Moldoveanu *et al.*, 2002 ; Moldoveanu *et al.*, 2004). Le domaine II est fortement conservé chez les différentes espèces, il présente une homologie de séquence variant de 85 à 93 %.

➤ Le domaine III

Comme le domaine I, le domaine III ne présente pas d'homologie de séquence avec les protéines identifiées à ce jour, et son (ses) rôle(s) reste(nt) mal compris. Cependant, ce domaine contient une région C2 capable d'interagir avec les phospholipides membranaires (Ono *et al.*, 1998 ; Tompa *et al.*, 2001) et une structure EF-hand à proximité du domaine II (Andresen *et al.*, 1991). Les études réalisées sur le domaine III ne permettent pas d'affirmer que cette structure EF-hand soit capable de fixer le calcium. Il est important de noter que ce domaine, capable de lier la calpastatine (Wendt *et al.*, 2004), pourrait être impliqué dans les changements conformationnels induits par le calcium.

➤ Le domaine IV

Situé du côté C-terminal de la sous-unité catalytique, il est également appelé domaine « calmodulin-like » en raison de son homologie avec la calmoduline (51 à 54 % de similarité). Comme chez cette dernière, le domaine IV présente des structures EF-hand permettant la liaison des ions Ca^{2+} . Des études réalisées il y a deux décennies ont révélé la présence de quatre structures EF-hand dans ce domaine (Emori *et al.*, 1986 ; Imajoh *et al.*, 1988). Plus récemment, des études cristallographiques ont mis en évidence une cinquième EF-hand, précédemment attribuée au domaine III (Blanchard *et al.*, 1997 ; Hosfield *et al.*, 2001). Ces EF-hands sont appelées EF-1, EF-2, EF-3, EF-4 et EF-5 (à partir du N-terminal, Figure 4).

Les sous-unités régulatrices C_{ss}1 et C_{ss}2 sont constituées de 268 et 248 acides aminés respectivement et présentent une masse moléculaire d'environ 28 kDa (28 100 Da pour C_{ss}1 et 27 659 Da pour C_{ss}2 chez l'homme ; Sakihama *et al.*, 1985 ; Schád *et al.*, 2002). Les structures de C_{ss}1 et C_{ss}2 sont organisées en deux domaines (Figure 4) :

➤ Le domaine V

Ce domaine correspond à la partie N-terminale de la sous-unité régulatrice et, au même titre que le domaine I, il serait impliqué dans l'autolyse de la protéase. Le domaine V contient une région riche en glycine et serait capable d'interagir avec les phospholipides membranaires.

➤ Le domaine VI

Ce domaine est également appelé IV' en raison de sa forte homologie avec le domaine IV. Comme ce dernier, il possède cinq structures EF-hand permettant la fixation du calcium

(de EF-1' à EF-5'). Il serait impliqué dans l'hétérodimérisation de la protéase en permettant l'interaction des sous-unités régulatrice et catalytique.

Des études cristallographiques récentes proposent une structure en 3D de la m-calpaïne qui confirment que des interactions entre les domaines IV et VI d'une part, et II et V d'autre part, sont très probables (Figure 5 ; Hosfield *et al.*, 1999). La situation des sous-domaines IIa et IIb de la clef catalytique suggère que des répulsions électrostatiques entre ces deux sous-domaines maintiendraient le site actif ouvert et donc inactif. En réduisant ces répulsions, le calcium permettrait la fermeture du site actif, et donc l'activité enzymatique (Hata *et al.*, 2001 ; Moldoveanu *et al.*, 2002 ; Reverter *et al.*, 2001).

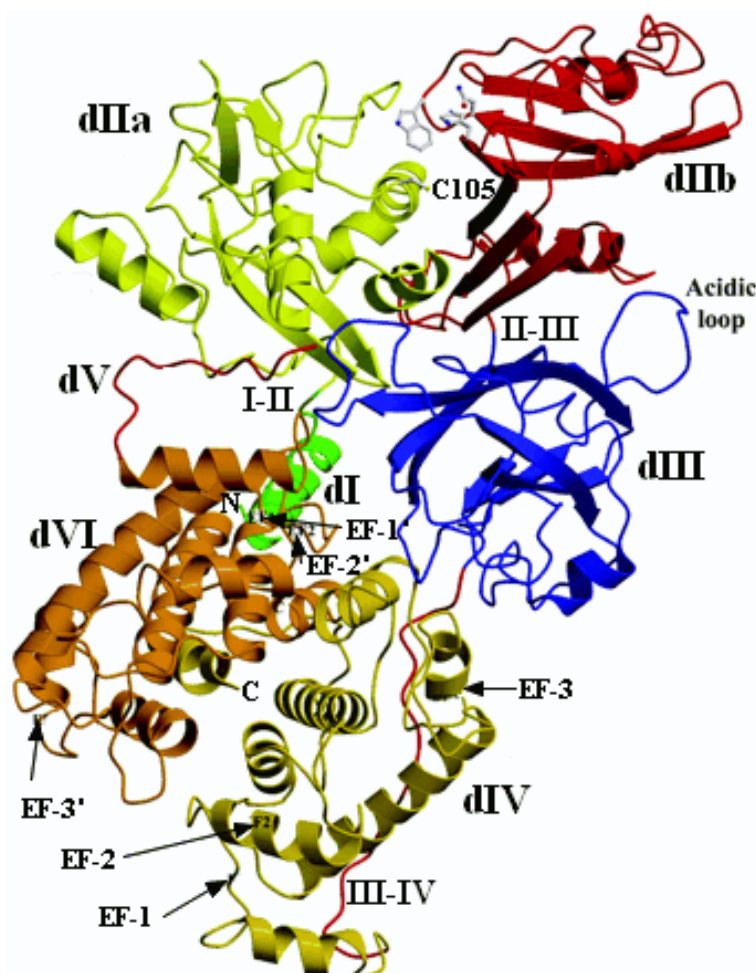


Figure 5 : Structure en 3 dimensions de la m-calpaïne (adapté de Reverter *et al.*, 2001)

Les différents domaines sont représentés par dI, dII, dIII, dIV, dV et dVI. Les structures EF-hand EF-1, EF-2, EF-3, EF-1', EF-2' et EF-3' sont indiquées sur les domaines IV et VI. Les annotations I-II, II-III et III-IV représentent les jonctions entre les domaines I, II, III et IV. C105 correspond à la cystéine du site actif.

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

La calpaïne 5 est une calpaïne atypique. Bien qu'ubiquitaire, cette isoforme est plus fortement exprimée dans le système nerveux central, le thymus, les testicules, les reins et les poumons (Franz *et al.*, 2004 ; Waghray *et al.*, 2004). Le gène *capn5* présente une forte homologie de séquence avec le gène *tra-3* chez *C. elegans* (Mugita *et al.*, 1997), impliqué dans la détermination sexuelle et la mort nécrotique des neurones (Barnes & Hodgkin, 1996 ; Syntichaki *et al.*, 2002).

La calpaïne 7 est également atypique, elle se caractérise par la présence d'un domaine différent en position C-terminale, absent chez les autres calpaïnes. L'homologie de séquence est très faible avec les autres membres de la famille des calpaïnes (30 % ; Franz *et al.*, 1999).

Le gène codant pour la calpaïne 10 (*capn10*) compte 15 exons, son épissage alternatif est à l'origine de 8 isoformes (calpaïne 10a à calpaïne 10h ; Horikawa *et al.*, 2000). La calpaïne 10 est atypique et ubiquitaire, cependant ses isoformes présentent des localisations différentes. La calpaïne 10a, la plus abondante, est principalement exprimée dans le foie, le cœur, le cerveau, le placenta, les poumons, les muscles squelettiques, les reins, le pancréas et la rétine (Horikawa *et al.*, 2000 ; Ma *et al.*, 2001). Peu étudiée jusqu'à présent, cette calpaïne fait désormais l'objet de nombreux travaux en raison de son implication dans le diabète de type II. Des mutations dans l'intron 3 du gène *capn10* ont été identifiées chez des personnes atteintes de cette pathologie (Horikawa *et al.*, 2000 ; Yang *et al.*, 2001). La calpaïne 10 interviendrait dans la sécrétion et l'action de l'insuline, ainsi que dans la production hépatique de glucose.

La calpaïne 12 est conventionnelle et ubiquitaire, elle est codée par le gène *capn12* constitué de 21 exons. Trois ARNm différents résultant d'un épissage alternatif ont été identifiés (Dear *et al.*, 2000). Cette protéase serait fortement exprimée dans le follicule capillaire, cependant le ou les rôles de cette enzyme restent actuellement inconnus.

La calpaïne 14, identifiée en 2001 en même temps que la calpaïne 13, est faiblement exprimée. Son gène, *capn14*, situé sur le chromosome 2, se trouve à proximité de celui codant pour la calpaïne 13 (Dear & Boehm, 2001).

Enfin, la calpaïne 15, plus connue sous le nom de SolH (*small optic lobes H*), est ubiquitaire et atypique. Son gène, *capn15* ou *solh*, constitué de 14 exons, est localisé sur le

chromosome 16. Le rôle ou les rôles de la calpaïne 15 sont inconnus mais elle pourrait être impliquée dans la cataracte héréditaire (Kamei *et al.*, 1998).

Malgré l'expression ubiquitaire des calpaïnes 5, 7, 10, 12, 14 et 15, l'expression « calpaïnes ubiquitaires » est très souvent utilisée pour désigner la μ - et la m -calpaïne. Pour plus de clarté, nous utiliserons également cette expression pour désigner ces deux protéases.

2.1.3. Les calpaïnes tissu-spécifiques

Parmi les quatorze calpaïnes identifiées depuis 1989, six sont considérées comme tissu-spécifiques. Il s'agit des calpaïnes 3, 6, 8, 9, 11 et 13.

Découverte en 1989 par Sorimachi et ses collaborateurs, la calpaïne 3 (p94 ou calpaïne 3a) est la plus étudiée. Elle est nommée p94 en raison de son poids moléculaire. Sa séquence, identifiée à partir de banques d'ADN complémentaires de muscles d'homme et de rat, est différente de celles des calpaïnes conventionnelles. La calpaïne 3a est spécifique du muscle squelettique et son taux de messagers est 10 fois plus important que celui des calpaïnes ubiquitaires (Sorimachi *et al.*, 1989). Toutefois, une faible quantité d'ARNm de la calpaïne 3a a été également détectée au niveau de la langue, des yeux et du cerveau (Konig *et al.*, 2003).

La calpaïne 3a est monomérique et présente une structure proche de celle des sous-unités catalytiques des calpaïnes ubiquitaires. Cette protéine de 821 acides aminés (chez l'homme) est constituée de quatre domaines (I à IV) dans lesquels on note la présence de séquences exclusivement spécifiques de la calpaïne 3a. Ces séquences, NS, IS1 et IS2, sont insérées en amont du domaine I, dans le domaine II et dans le domaine III, respectivement (Figure 6). La séquence NS (pour *N-terminal Sequence* ; 20 à 30 acides aminés), riche en proline, inhiberait l'autoprotéolyse du domaine I (Anderson *et al.*, 1998). La séquence IS1 (pour *Insertion Sequence 1* ; 62 aminoacides) forme une boucle dans le domaine II. Elle agirait comme un inhibiteur interne, en bloquant l'accès du site actif dont elle est proche (Diaz *et al.*, 2004). La séquence IS2 (*Insertion Sequence 2* ; 77 aminoacides) contient une séquence de localisation nucléaire (PVKKKKNKP) fortement conservée d'une espèce à l'autre (Sorimachi *et al.*, 1989).

Alors que ses messagers sont fortement représentés dans les cellules musculaires, la calpaïne 3a n'a jamais été isolée sous sa forme native. Seuls des fragments de 60, 58, 55 et 31 kDa ont pu être purifiés (Kinbara *et al.*, 1998). Ces fragments seraient la conséquence d'une

autolyse rapide de la calpaïne 3a dont la demi-vie est de l'ordre d'une dizaine de minutes (Sorimachi *et al.*, 1993). La délétion de la séquence IS2 et la mutation de la cystéine 129 du site actif en sérine permettent de stabiliser la calpaïne 3a et d'allonger sa durée de vie (Sorimachi *et al.*, 1993).

In vivo, la calpaïne 3a serait stabilisée par des interactions avec des protéines du tissu musculaire, comme la connectine (titine), et ceci *via* le domaine IS2 (Sorimachi *et al.*, 1995).

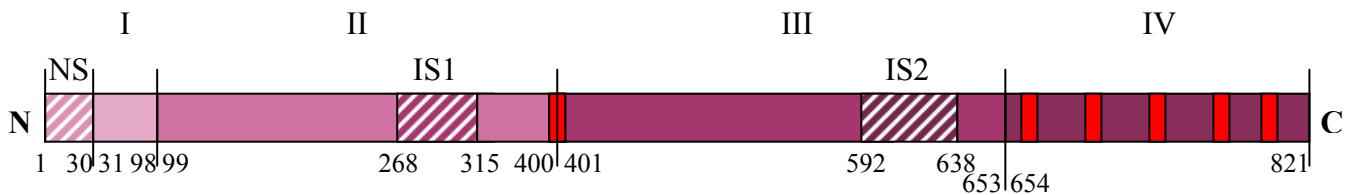


Figure 6 : Structure schématique de la calpaïne 3a (d'après Goll *et al.*, 2003)

Les annotations I, II, III et IV correspondent aux différents domaines. NS, IS1 et IS2 représentent les séquences d'insertion spécifiques de la calpaïne 3a. Les structures EF-hand sont représentées par les rectangles rouges présents dans le domaine IV et entre les domaines II et III.

Les mécanismes de régulation de la calpaïne 3a ne sont actuellement pas connus. Cette protéase n'interagit ni avec les sous-unités régulatrices C_{ss}1 et C_{ss}2 des calpaïnes ubiquitaires, ni avec la calpastatine, l'inhibiteur de la μ - et de la m-calpaïne. La présence de six EF-hands suggère une régulation dépendante du calcium (Ono *et al.*, 1998). La concentration en calcium nécessaire serait de l'ordre du nM ce qui justifierait l'appellation n-calpaïne utilisée par certains auteurs pour désigner la calpaïne 3a (Mozdziak *et al.*, 2002).

Son implication certaine dans une forme de dystrophie musculaire (LGMD2A, *limb girdle muscular dystrophy type 2A*) (Richard *et al.*, 1995) a suscité de nombreuses études. Plus de 100 mutations du gène *capn3* ont été identifiées chez des personnes atteintes par cette dystrophie musculaire. La calpaïne 3a mutée n'est alors plus capable de dégrader certains de ses substrats (Ono *et al.*, 1998).

La calpaïne 3b est le résultat d'un épissage alternatif du gène *capn3* excluant les exons 6, 15 et 16, ce qui conduit à l'absence des séquences d'insertion NS, IS1 et IS2 (Ma *et al.*, 1998). Cette protéase tissu-spécifique exprimée uniquement dans le cristallin, interviendrait lors de la formation de la cataracte (David *et al.*, 1993 ; Fukiage *et al.*, 2002).

La calpaïne 6 a été décrite en 1997 par Dear et ses collaborateurs. Cette calpaïne atypique présente une forte homologie avec la calpaïne 5 et se caractérise par l'absence de domaine IV, remplacé par un domaine T. La calpaïne 6 est la seule calpaïne à présenter un site actif original, la cystéine étant remplacée par une lysine. Cette modification de la triade catalytique empêche toute activité cystéine-protéase. La calpaïne 6 est exprimée au cours de la grossesse, principalement au niveau du placenta, mais aussi dans les muscles, les poumons et les reins de l'embryon (Dear & Boehm, 1999).

La calpaïne 8 (également appelée nCL-2) a été découverte en 1993 par Sorimachi et ses collaborateurs. Elle est exclusivement exprimée au niveau des muqueuses stomacale et intestinale. Comportant un domaine « calmodulin-like » (domaine IV), la calpaïne 8 est dite typique. Cependant, la nCL-2', résultant de l'épissage alternatif du gène *capn8*, ne possède pas de domaine IV. Une majeure partie du domaine III est également délétée. Les fonctions physiologiques de la calpaïne 8 restent encore mal connues. Toutefois, des travaux très récents ont montré une implication de cette enzyme 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) a été décrite en 1998 par Lee et ses collaborateurs. Elle est conventionnelle et spécifique du système digestif. Une diminution importante de l'expression de cette protéase est observée dans des cellules cancéreuses de l'estomac (Yoshikawa *et al.*, 2000). En outre, la réduction de son expression en utilisant une stratégie antisens induit la transformation des cellules et la cancérogenèse (Liu *et al.*, 2000), suggérant l'implication de cette protéase dans l'établissement du cancer gastrique.

La calpaïne 11, décrite en 1999 par Dear et ses collaborateurs, est une calpaïne typique. Elle est spécifique des testicules et notamment des spermatozoïdes (Dear & Boehm, 1999).

La calpaïne 13 décrite par Dear et Boehm en 2001 est atypique, son expression est limitée aux poumons et aux testicules.

2.2. Activation des calpaïnes ubiquitaires

2.2.1. Mécanismes d'activation

Comme de nombreuses enzymes, les calpaïnes ubiquitaires sont synthétisées sous forme inactive, protégeant ainsi la cellule d'une protéolyse anarchique. Le calcium est un élément clef, indispensable à leur activation. Sa fixation au niveau des structures EF-hand des domaines IV et VI permettrait l'interaction de ces domaines, favorisant ainsi l'association des

deux sous-unités. De plus, le calcium serait à l'origine de nombreux changements conformationnels, notamment au niveau du domaine II où il permettrait le rapprochement des sous-domaines IIa et IIb, rendant le site actif opérationnel. Les calpaïnes ayant fixé le calcium migreraient alors vers la membrane plasmique (Figure 7) où les phospholipides membranaires interagiraient avec les domaines III et V *via* leurs régions hydrophobes. Deux mécanismes d'activation différents sont alors possibles :

➤ L'autolyse des deux sous-unités

La capacité des calpaïnes à s'autolyser est connue depuis une vingtaine d'années. En effet, en 1981 Suzuki et ses collaborateurs ont découvert que la m-calpaïne s'autolysait en présence de calcium. Ce processus a également été observé pour la μ -calpaïne (Cong *et al.*, 1989 ; Dayton, 1982). L'autolyse entraîne la perte d'une partie des domaines I et V et réduit notamment la concentration calcique nécessaire à l'activité des calpaïnes. Bien que ce phénomène soit rapide (2 à 3 min à 25°C en présence de 1 mM de Ca^{2+}), il comporte plusieurs étapes. L'autolyse de la calpaïne 1 entraîne la formation d'un produit intermédiaire de 78 kDa, puis de la forme autolysée qui présente un poids moléculaire de 76 kDa (Zimmerman & Schlaepfer, 1991). L'autolyse de la calpaïne 2 comporte également deux étapes, cependant la forme autolysée présente un poids moléculaire différent (78 kDa ; Brown & Crawford, 1993). Quant à la petite sous-unité, elle s'autolyse en trois étapes pour aboutir à la formation d'un fragment de 18 kDa (Mc Clelland *et al.*, 1989). L'autolyse entraîne donc la formation des hétérodimères actifs 76 kDa / 18 kDa et 78 kDa / 18 kDa pour la μ - et la m-calpaïne respectivement. Le phénomène peut se poursuivre au niveau des sous-unités catalytiques, générant des fragments inactifs de 30 à 33 kDa (Nishimura & Goll, 1991).

L'autolyse permettant l'activation des calpaïnes, certains auteurs ont suggéré que ces protéases étaient synthétisées sous forme de pro-enzyme. Cette hypothèse était d'autant plus réaliste que de nombreuses enzymes et notamment des protéases sont synthétisées sous forme de pro-enzyme, c'est le cas par exemple des caspases. Cette hypothèse a été largement acceptée dans les années 1990, et l'activation des calpaïnes était synonyme d'autolyse.

➤ L'activation par dissociation des deux sous-unités

Plusieurs études ont montré que les calpaïnes non autolysées étaient actives et capables d'hydrolyser leurs substrats (Cong *et al.*, 1989 ; Cong *et al.*, 1993 ; Crawford *et al.*, 1993 ; Goll *et al.*, 1992 ; Molinari *et al.*, 1994). Ces observations infirmant l'hypothèse de la pro-enzyme, un second modèle d'activation, indépendant de l'autolyse et basé sur la dissociation

des deux sous-unités, a été proposé. Ce modèle est soutenu par de nombreux travaux démontrant que la sous-unité catalytique dissociée était active (Meyer *et al.*, 1996; Yoshizawa *et al.*, 1995). La séparation des deux sous-unités serait la conséquence de changements conformationnels induits par les phospholipides membranaires. La sous-unité catalytique présenterait alors une plus grande sensibilité au calcium (Vilei *et al.*, 1997). Toutefois, aucune étude n'a permis de détecter la dissociation du dimère. En outre, des études cristallographiques suggèrent la formation de ces dimères quelle que soit la concentration en calcium (Lin *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1996).

Suzuki et Sorimachi ont finalement proposé en 1998 un modèle intégrant les deux modes d'activation (Figure 7). Ce modèle est désormais largement accepté. L'activation des calpaïnes se ferait par dissociation du dimère, libérant la sous-unité catalytique active. L'autolyse en N-terminal pourrait intervenir avant la dissociation mais ce ne serait qu'un mécanisme facultatif qui faciliterait la séparation des deux sous-unités. L'autolyse suivie de la dissociation générerait une enzyme active, dont la durée de vie serait plus courte. La sous-unité régulatrice jouerait un rôle essentiellement stabilisateur.

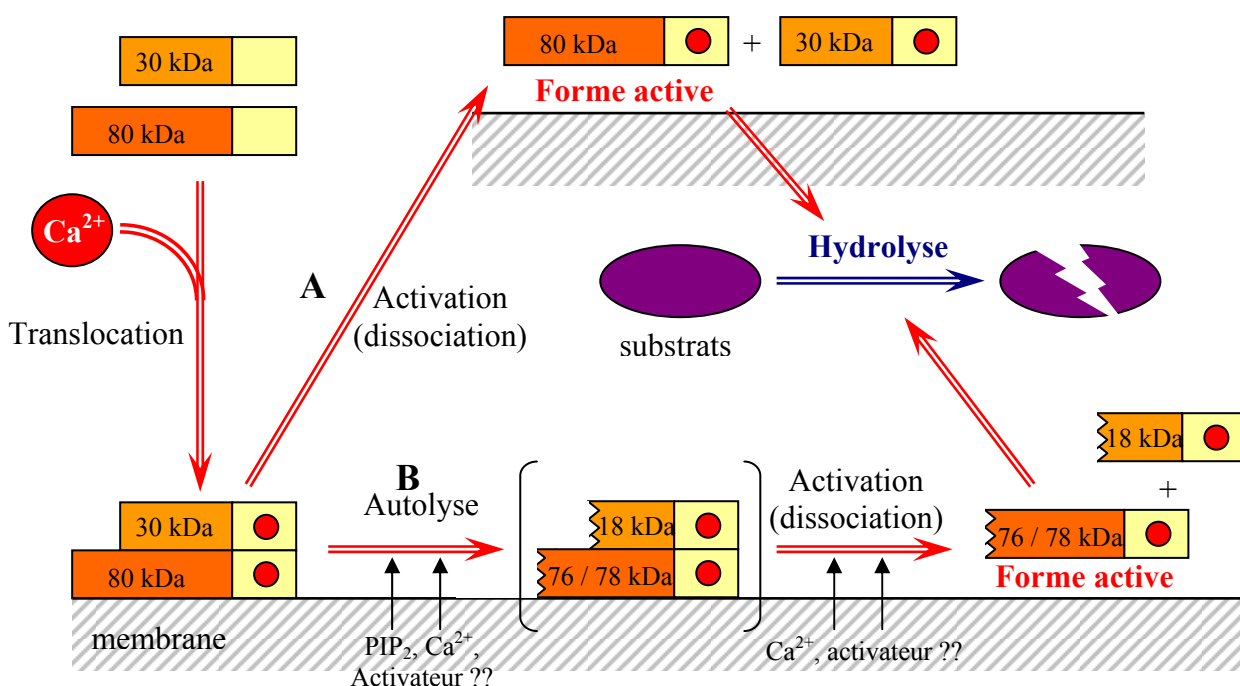


Figure 7 : Modèle d'activation des calpaïnes proposé par Suzuki et Sorimachi (adapté de Suzuki & Sorimachi, 1998)

Les calpaïnes ayant fixé le calcium migreraient vers la membrane plasmique. Deux mécanismes d'activation seraient alors possibles : la dissociation des deux sous-unités (A) ou l'autolyse suivie de la séparation des deux sous-unités (B).

2.2.2. Problèmes liés aux concentrations calciques

Quel que soit le modèle d'activation choisi, le calcium reste l'élément clef permettant aux calpaïnes d'être actives. Cependant, un problème majeur reste en partie non résolu. En effet, la concentration nécessaire à l'activité des calpaïnes est très nettement supérieure à la concentration calcique intracellulaire. Cette dernière varie de 50 à 300 nM selon l'état de la cellule, alors que la μ - et la m-calpaïne nécessitent respectivement des concentrations calciques de l'ordre de 3 à 50 μ M et de 0,25 à 1 mM (Goll *et al.*, 2003 ; Maravall *et al.*, 2000). Les concentrations requises pour l'activation de la m-calpaïne ne sont d'ailleurs jamais atteintes hormis dans des cas extrêmes (Hajnoczky *et al.*, 2000). Une activation par le calcium seul est de ce fait impossible *in vivo*. Il existerait donc des mécanismes et/ou des protéines permettant de réduire localement la concentration calcique nécessaire à l'activité des calpaïnes.

L'autolyse est un des mécanismes permettant de réduire l'exigence des calpaïnes en calcium. En effet, une fois autolysée, l'activité de la μ -calpaïne nécessite une concentration calcique 1,5 à 100 fois inférieure à celle avant autolyse. De même la concentration nécessaire à l'activation de la m-calpaïne est réduite d'un facteur 5 environ (Goll *et al.*, 1992). Bien que les exigences en calcium de la μ -calpaïne autolysée se rapprochent des concentrations physiologiques, celles de la m-calpaïne restent encore trop élevées. L'autolyse, dont l'initiation requiert 0,8 à 15 μ M de calcium, n'est donc pas suffisante pour ramener les exigences calciques des calpaïnes au niveau des concentrations physiologiques.

Des études réalisées sur les phospholipides acides ont montré que certains d'entre eux tels que la phosphatidylsérine (PS), le phosphatidylinositol (PI) et le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP₂) seraient capables, en interagissant avec les domaines III et V, de réduire les concentrations calciques indispensables à l'autolyse des calpaïnes de facteurs compris entre 3 et 8 (Coolican & Hathaway, 1984 ; Cong *et al.*, 1989 ; Saido *et al.*, 1991 ; Saido *et al.*, 1992). Cependant ces résultats ont été obtenus avec une stœchiométrie de 375 à 4 100 phospholipides (PI ou PIP₂) pour une calpaïne. De telles conditions sont peu probables *in vivo*. De plus les concentrations nécessaires pour l'autolyse des calpaïnes en présence des phospholipides restent non physiologiques. L'action des phospholipides ne serait donc pas suffisante et d'autres activateurs seraient essentiels pour activer les calpaïnes.

Quelques études ont permis l'identification d'activateurs des calpaïnes tels que l'isovaleryl carnitine (IVC) qui permettrait de réduire la concentration calcique requise pour

l'activité de la m-calpaïne en deçà de 10 μ M (Pontremoli *et al.*, 1990). Cependant, la stœchiométrie est de 20 000 IVC pour une m-calpaïne et cet activateur ne semble pas avoir d'effet sur la μ -calpaïne.

En 2000, Melloni et ses collaborateurs ont décrit les effets activateurs d'une protéine de liaison à l'acyl-coenzyme A (ACBP pour *acyl-CoA binding protein*) présente dans le muscle squelettique de rat. Ce dimère de 20 kDa formerait un complexe membranaire avec la m-calpaïne et diviserait par 50 la concentration calcique nécessaire pour activer l'enzyme. De plus la stœchiométrie ACBP : m-calpaïne serait de 1 : 1. Cette protéine n'aurait cependant pas d'effet sur les exigences en calcium de la μ -calpaïne. L'ACBP serait également capable d'inhiber la liaison calpaïne/calpastatine. Des études récentes ont montré que l'ACBP activerait la μ -calpaïne lors de la mort cellulaire (Shulga & Pastorino, 2006).

2.3. Régulation de l'activité et de l'expression des calpaïnes ubiquitaires

Afin d'éviter une protéolyse anarchique fortement dommageable pour la cellule, l'activité mais aussi l'expression des calpaïnes sont fortement régulées. Plusieurs facteurs sont notamment impliqués dans ces régulations. L'acteur le plus important est la calpastatine, l'inhibiteur spécifique endogène des calpaïnes ubiquitaires.

2.3.1. La calpastatine

L'existence d'un inhibiteur endogène des calpaïnes ubiquitaires a été découverte lors des premiers essais de purification de la m-calpaïne (Dayton *et al.*, 1976 ; Goll *et al.*, 2003). Les premières études concernant cette protéine ont montré qu'elle était résistante aux hautes températures (100°C), à l'urée et au SDS. Le clonage de l'ADNc de la calpastatine a été réalisé dès 1990 chez de nombreuses espèces (Asada *et al.*, 1989 ; Emori *et al.*, 1987 ; Takano *et al.*, 1988).

La calpastatine (ou CAST) est codée par un gène unique, *cast*, situé sur le chromosome 5 chez l'homme et composé de 34 exons. L'utilisation de quatre promoteurs différents (Raynaud *et al.*, 2005) et les mécanismes d'épissage alternatif (Lee *et al.*, 1992 ; Parr *et al.*, 2001 ; Takano *et al.*, 1999) entraînent la synthèse de nombreuses isoformes de cette protéine. Au moins huit ont été identifiées dans différents tissus, et il n'est pas rare que plusieurs isoformes soient présentes dans un même tissu (Geesink *et al.*, 1998 ; Goll *et al.*, 2003). On

distingue quatre types de calpastatine (I à IV) et quatre autres isoformes présentant des délétions.

En raison de sa structure non globulaire, la calpastatine migre de façon particulière en SDS-PAGE. Cette anomalie et l'existence de plusieurs isoformes ont entraîné de nombreuses interrogations concernant son poids moléculaire (de 34 à 280 kDa selon les études ; Maki *et al.*, 1990). Certains auteurs ont également suggéré une éventuelle organisation de l'inhibiteur en dimères ou en tétramères. Il est désormais évident que la calpastatine est un monomère dont le poids moléculaire a été surestimé. Ainsi, le poids moléculaire de la forme exprimée dans les érythrocytes, estimé à 70 kDa en SDS-PAGE, est en réalité de 46,35 kDa (Takano & Murachi, 1982). La forme la plus fréquente dans le muscle squelettique humain (type III) migre aux environs de 135 kDa en SDS-PAGE alors que son poids moléculaire réel est voisin de 78 kDa.

La séquence protéique de la calpastatine est unique, elle est subdivisée en 4 domaines répétés (domaines I à IV) précédés d'un domaine N-terminal, le domaine L (Figure 8). Chez l'homme, ce domaine est composé d'environ 120 amino-acides (codés par les exons 2 à 8), alors que les domaines I, II, III et IV en comprennent environ 140 (codés par les exons 9-13, 14-18, 19-23 et 24-29). Certaines isoformes contiennent également un domaine appelé XL, placé en N-terminal du domaine L et codé par les exons 1 (1xa, 1xb, 1y, 1z et 1u).

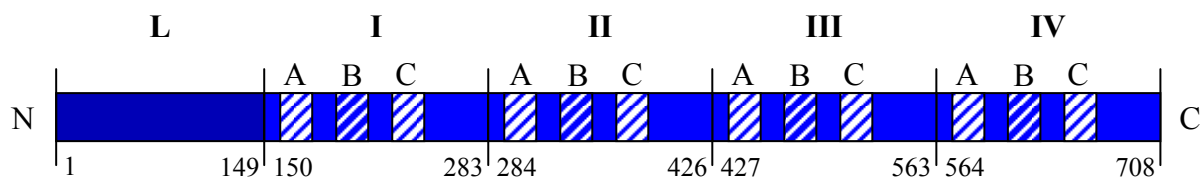


Figure 8 : Structure schématique de la calpastatine humaine
(adapté de Wendt *et al.*, 2004)

Les différents domaines de la calpastatine sont représentés par L, I, II, III et IV. Les annotations A, B et C correspondent aux sous-domaines présents dans les domaines I, II, III et IV.

Les nombreux résidus basiques présents dans le domaine L permettent à la calpastatine de se lier à la membrane, région importante lors de l'activation des calpaïnes (Mellgren, 1988). Les domaines I, II, III et IV sont responsables de l'inhibition de la μ - et de la m-calpaïne. Chaque domaine séparé est capable d'inhiber l'activité protéolytique d'une calpaïne ubiquitaire. La calpastatine serait donc théoriquement capable d'inhiber quatre molécules

(Emori *et al.*, 1988). Toutefois, la stoechiométrie varierait de 1 : 3 à 1 : 12. Les domaines I, II, III et IV n'inhiberaient pas l'activité des calpaïnes ubiquitaires avec la même efficacité, le domaine I étant le plus efficace (Kawasaki *et al.*, 1989).

Chacun des quatre domaines inhibiteurs de la calpastatine est composé de trois sous-domaines A, B et C (Figure 8). Les domaines A et C ne présentent aucune activité inhibitrice lorsqu'ils sont utilisés seuls ou associés (Ma *et al.*, 1994 ; Maki *et al.*, 1988 ; Uemori *et al.*, 1990). L'activité inhibitrice de la calpastatine serait conférée par le sous-domaine B.

L'inhibition des calpaïnes par la calpastatine est un phénomène calcium-dépendant (Cottin *et al.*, 2000 ; Kapprell & Goll, 1989). En présence de calcium, les sous-domaines A et C se fixeraient aux domaines IV et VI des calpaïnes, permettant ainsi au sous-domaine B d'entrer en contact avec le domaine II et le site actif (Figure 9 ; Todd *et al.*, 2003). Cette inhibition est réversible puisque l'addition d'un agent chélateur tel que l'EDTA permet de dissocier le complexe (Kapprell & Goll, 1989 ; Otsuka & Goll, 1987). Les concentrations en calcium nécessaires à la fixation de la calpastatine aux calpaïnes (40 μM pour la μ - et entre 250 et 500 μM pour la m-calpaïne) sont nettement inférieures à celles requises pour activer ces protéases (Kapprell & Goll, 1989).

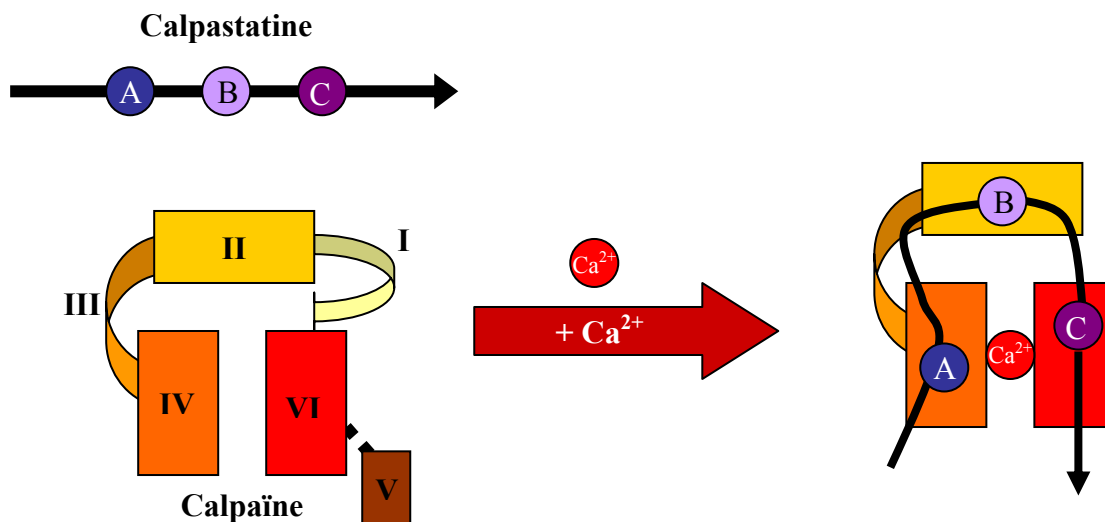


Figure 9 : Représentation schématique du modèle d'interaction entre la calpastatine et les calpaïnes (adapté de Todd *et al.*, 2003)

Les domaines des calpaïnes sont représentés par les chiffres I, II, III, IV, V et VI. Les lettres A, B, et C correspondent aux trois sous-domaines de la calpastatine.

Le mode d'inhibition de la calpastatine est encore controversé et mal connu *in vivo*. Certains auteurs proposent une inhibition non-compétitive (Cottin *et al.*, 1983), alors que d'autres privilégient l'hypothèse d'une inhibition de type compétitif (Maki *et al.*, 1988).

Les phosphorylations de l'inhibiteur endogène semble influencer sa localisation, son efficacité et sa spécificité (Averna *et al.*, 1999 ; Averna *et al.*, 2001 ; Averna *et al.*, 2003 ; Cong *et al.*, 1998 ; Salamino *et al.*, 1997). La forme phosphorylée (par les protéines kinase A ou C) serait localisée dans la région nucléaire. Une augmentation du niveau de calcium intracellulaire entraînerait sa déphosphorylation et sa translocation vers la membrane, à proximité des calpaïnes. En outre, selon Pontremoli et ses collaborateurs (1992), la forme déphosphorylée posséderait une affinité plus importante pour la μ -calpaïne alors que la forme phosphorylée serait plus affine pour la m-calpaïne.

Plus récemment, Tompa et ses collaborateurs (2002) ont montré que les caspases, en dégradant la calpastatine, libéraient les sous-domaines A et C. Ces derniers seraient susceptibles de participer à l'activation des calpaïnes en réduisant de moitié les concentrations calciques nécessaires à leur activité.

2.3.2. Les phosphorylations

Les calpaïnes présentent différents sites de phosphorylation, dont le nombre varie selon l'isoforme étudiée (9 pour la μ -calpaïne, 8 pour la m-calpaïne ; Goll *et al.*, 2003). Ces phosphorylations pourraient réguler positivement ou négativement l'activité des calpaïnes. Selon les travaux de Glading et de ses collaborateurs (2000 et 2004) la phosphorylation de la sérine 50 par la voie ERK/MAPK activée par l'EGF (*epidermal growth factor*) induit une forte augmentation de l'activité de la m-calpaïne. Au contraire la phosphorylation de la sérine 369 et de la thréonine 370 par la protéine kinase A (PKA) réduit significativement l'activité de la m-calpaïne. La phosphorylation de ces résidus rigidifie la structure de la protéase. En conséquence, le site actif est maintenu en position ouverte ce qui rend la protéase inactive (Shiraha *et al.*, 1999 ; Shiraha *et al.*, 2002). Ainsi la PKA peut contrecarrer les effets de l'EGF.

2.3.3. Régulation par les MRF (*myogenic regulatory factors*)

Les facteurs myogéniques (MRF, *myogenic regulatory factor*, voir chapitre 2) sont capables de stimuler l'expression du gène *capn2*. Les résultats obtenus dans notre laboratoire

(Dedieu *et al.*, 2003) montrent que le gène *capn2* contient 5 sites E-box, séquences sur lesquelles peuvent se fixer les hétérodimères formés par l'association des MRFs et des protéines E (E12 ou E47). Dans le cas des calpaïnes, MyoD (également appelé Myf3) régule de façon positive l'expression du gène *capn2*. La myogénine (ou Myf1) est également capable de réguler l'expression de ce gène mais de façon moins efficace. Au contraire, Myf5 n'a aucun effet sur l'expression de ce gène. Une telle régulation n'a encore jamais été décrite pour le gène *capn1*.

2.4. Localisation des calpaïnes ubiquitaires

Les calpaïnes ubiquitaires sont présentes dans la grande majorité des tissus des vertébrés tels que le cerveau, les muscles lisses, squelettiques et cardiaques, l'appareil digestif, les reins, le foie, les poumons, les cellules du système immunitaire et les organes génitaux (Farkas *et al.*, 2003). Leurs niveaux d'expression varient cependant fortement d'un tissu à l'autre (Kawashima *et al.*, 1988).

La localisation cellulaire des calpaïnes a fait l'objet de nombreuses études d'immunolocalisation. La majorité d'entre elles montrent que les deux calpaïnes ubiquitaires présentent une répartition diffuse dans l'ensemble du cytoplasme où elles sont colocalisées avec leur inhibiteur, la calpastatine (Barnoy *et al.*, 1999 ; Goll *et al.*, 1989 ; Goll *et al.*, 1992 ; Kumamoto *et al.*, 1992). Ces protéases seraient toutefois capables de se déplacer vers différents compartiments cellulaires. Ainsi, en réponse à des signaux cellulaires, les calpaïnes se déplaceraient vers des sites en périphérie de la cellule, et plus particulièrement vers la membrane, tandis que la localisation de la calpastatine resterait inchangée. Une translocation vers la membrane plasmique a notamment été observée pour la μ -calpaïne après une stimulation par un ionophore (Gil-Parrado *et al.*, 2003). Ces observations confortent l'hypothèse d'une activation membranaire des calpaïnes.

Au niveau du muscle squelettique, une fraction des calpaïnes ne seraient pas libre dans le cytoplasme, mais plutôt associée à des structures cellulaires organisées telles que les myofibrilles ou les fibres d'actine (Kumamoto *et al.*, 1992 ; Lane *et al.*, 1992).

Des travaux réalisés au cours de la fusion des myoblastes ont montré que la m-calpaïne pouvait être extériorisée. En agissant sur la matrice extracellulaire (MEC), et plus particulièrement sur la fibronectine, elle préparerait les membranes à fusionner (Brustis *et al.*, 1994 ; Dourdin *et al.*, 1997). Bien que l'hypothèse d'une extériorisation de la m-calpaïne soit confirmée dans d'autres types d'expérimentations (Szomor *et al.*, 1999 ; Nishihara *et al.*,

2001), certains auteurs la réfutent, préférant parler de « fuite » ou de tissus lésés (Goll *et al.*, 2003).

2.5. Substrats des calpaïnes ubiquitaires

Une meilleure compréhension des rôles joués par la protéolyse calcium-dépendante et de sa spécificité nécessite l'identification de ses substrats. Ainsi, de nombreuses protéines (plus d'une centaine) ont été identifiées comme substrats potentiels des calpaïnes *in vitro* (Croall & Mc Grody, 1994 ; Goll *et al.*, 1999). Les substrats de la μ - et la m-calpaïne seraient identiques.

Les séquences protéiques des protéines clivées par les calpaïnes ont été comparées afin de rechercher d'éventuels motifs de reconnaissance. Une séquence commune à la majorité des substrats potentiels a été identifiée en 1989 par Wang et ses collaborateurs. Il s'agit de la séquence PEST (proline, glutamate et/ou aspartate, sérine et thréonine). La proximité de ces quatre résidus, et notamment la présence de charges négatives, favoriserait la fixation de calcium, nécessaire à l'action des calpaïnes (Harris *et al.*, 1989). Néanmoins, bien qu'une majorité de substrats comportent cette séquence, certaines protéines clivées par les calpaïnes en sont dépourvues. De plus, des expériences de mutagenèse ont démontré que la modification de la séquence PEST n'empêchait pas les calpaïnes de cliver ces protéines (Carillo *et al.*, 1996 ; Molinari *et al.*, 1995). La séquence PEST ne serait donc ni indispensable, ni suffisante pour induire un clivage par les calpaïnes. La comparaison des sites de clivage a permis d'identifier une autre homologie dans la séquence protéique des substrats. Il a ainsi été observé que des acides aminés basiques étaient présents en position P1 des sites de coupure et que des aminoacides hydrophobes se situaient en position P2 (P1 et P2 : premier et deuxième résidus précédant le site de coupure) (Croall & De Martino, 1991). La structure tridimensionnelle des protéines ainsi que leur état de phosphorylation pourraient également influencer le clivage des substrats par le système protéolytique calcium-dépendant (Elvira *et al.*, 1993 ; Sakai *et al.*, 1987 ; Yamaguchi *et al.*, 1994).

Les substrats des calpaïnes (*in vitro*) ont été répertoriés de façon exhaustive par Goll et ses collaborateurs (2003), on distingue :

➤ Des protéines cytosquelettiques :

Adducine, N-cadhérine, calponine, β -caténine, desmine, dystrophine, filamine, myosine, taline, titine, tropomyosine, troponines, tubuline, vimentine, vinculine ... (Billger *et al.*, 1988 ; Covault *et al.*, 1991 ; Croall *et al.*, 1996 ; Davies *et al.*, 1978 ; Dayton *et al.*, 1975 ; Hemmings *et al.*, 1996 ; Nelson & Traub, 1983 ; Pemrick & Grebenau, 1984 ; Scaramuzzino & Morrow, 1993 ; Yoshida *et al.*, 1992). Il est important de noter que dans certains types cellulaires, certaines de ces protéines ne semblent pas dégradées par les calpaïnes. C'est le cas de la desmine et de la vinculine dans les myoblastes et de la tubuline dans le cerveau (Dedieu *et al.*, 2004 ; Sandoval & Weber, 1978).

➤ Des enzymes :

La protéine kinase C (PKC), la phospholipase C, les caspases-3, -7, et -12, la FAK (*focal adhesion kinase*), la kinase de l'EGFR (récepteur à l'EGF)...

➤ Des protéines associées à la membrane :

A-CAM, cavéoline-3, MARCKS (*myristoylated alanine-rich C kinase substrate*), EGFR, PDGFR (*platelet derived growth factor receptor*), intégrine β 3... (Dulong *et al.*, 2004 ; Moyen *et al.*, 2004 ; Sato *et al.*, 1995).

➤ Des facteurs de transcription :

La myogénine, p53, I κ B α , c-Fos, c-Jun, c-Myc, ... (Hirai *et al.*, 1991 ; Milligan *et al.*, 1996 ; Piechaczyk, 2000 ; Watt & Molloy, 1993).

Le clivage de ces protéines observé *in vitro* doit être confirmé *in vivo* afin de se rapprocher de la réalité cellulaire et d'établir un véritable catalogue de substrats *in vivo*.

2.6. Fonctions physiologiques des calpaïnes ubiquitaires

Les calpaïnes ubiquitaires seraient impliquées dans de nombreux processus biologiques du fait de la grande diversité de leurs substrats. Elles interviendraient par exemple dans le cycle cellulaire, en dégradant plus particulièrement des facteurs impliqués dans ce phénomène, tels que la cycline D1, le facteur c-mos et la protéine p53 (Pariat *et al.*, 1997 ; Watanabe *et al.*, 1989). L'injection des calpaïnes permettrait également d'initier la mitose ou de redémarrer la méiose (Santella *et al.*, 1998).

Le clivage de certaines protéines telles que les intégrines $\beta 3$, les récepteurs à l'EGF, au PDGF et à l'insuline, suggère que les calpaïnes joueraient un rôle important lors de la transduction du signal *via* différentes voies de signalisation cellulaire.

Les calpaïnes ubiquitaires seraient également impliquées dans l'apoptose notamment *via* les caspases dont elles réguleraient l'expression et l'activité (Fan *et al.*, 2005 ; Blomgren *et al.*, 2001). En effet, en clivant les pro-caspases, les calpaïnes entraîneraient l'activation des caspases-3, -7 et -12 et l'inactivation des caspases-8 et -9. Plusieurs études ont d'ailleurs montré que ces deux systèmes protéolytiques interagiraient étroitement.

Au cours de la formation du muscle, les calpaïnes, et plus particulièrement la m-calpaïne, joueraient un rôle primordial en intervenant lors de la transition myoblastes - myotubes. L'activité des calpaïnes est nécessaire à la fusion et la formation de ces cellules plurinucléées (Balcerzak *et al.*, 1995 ; Barnoy *et al.*, 1996 ; Barnoy *et al.*, 1998 ; Hayashi *et al.*, 1996 ; Temm-Grove *et al.*, 1999). En outre, les nombreuses protéines cytosquelettiques considérées comme des substrats potentiels des calpaïnes suggèrent l'intervention de ces protéases au cours des phénomènes d'adhésion et de migration cellulaire.

Les calpaïnes interviendraient dans de nombreux autres phénomènes biologiques tels que le développement embryonnaire, la potentialisation à long terme ou l'angiogenèse (Arthur *et al.*, 2000 ; Glading *et al.*, 2001 ; Paulhe *et al.*, 2001). Bien que les rôles des calpaïnes soient maintenant mieux connus, certaines de leurs fonctions physiologiques restent encore à élucider.

2.7. Pathologies liées aux calpaïnes – "Calpaïnopathies"

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 sont provoquées par des mutations des gènes codant pour les calpaïnes : la LGMD2A (calpaïne 3a), le cancer de l'estomac (calpaïne 9) et le diabète de type II (calpaïne 10) (voir paragraphe 2.1.3.). Les autres calpaïnopathies sont associées à une dérégulation de l'activité des calpaïnes. Dans de nombreux cas, c'est la perte de l'homéostasie calcique, provoquée par différents facteurs, qui entraîne une activation importante des calpaïnes. En conséquence, il en résulte une protéolyse anarchique s'avérant souvent létale pour la cellule. Une rupture de l'équilibre entre la calpastatine et les calpaïnes peut également être à l'origine de ce phénomène. Une protéolyse calcium-dépendante

anormalement élevée est donc impliquée dans de nombreux états pathologiques, toutefois cette dernière semble être la conséquence de dérégulations induites par différents facteurs, plutôt que la cause directe de la pathologie. L'implication des calpaïnes a été observée dans de nombreuses pathologies qui atteignent différents tissus et organes, telles que les maladies suivantes :

➤ Les dystrophies musculaires

Les dystrophies musculaires furent les premières maladies pour lesquelles l'implication des calpaïnes a été démontrée. Dans la majorité des cas, on observe une perte de l'homéostasie calcique qui entraîne une activité anormale des calpaïnes. Dans les dystrophies musculaires de Duchenne et de Beckers, l'absence de la dystrophine fragilise la membrane dont les lésions permettent le passage du calcium extracellulaire (Tidball & Spencer, 2000). La concentration calcique intracellulaire est alors multipliée par 2 voire 3 (Hopf *et al.*, 1996), ce qui stimule fortement l'activité des calpaïnes, et entraîne une protéolyse anarchique. Quant à la LGMD2A, elle est associée à des mutations du gène *capn3* (Richard *et al.*, 1995). Ces mutations affecteraient les interactions entre les différents domaines de la structure de la calpaïne 3a, ce qui réduirait l'activité protéolytique de cette protéase. Certains auteurs suggèrent que dans ces conditions la calpaïne 3a ne cliverait plus I κ B. Ce dernier empêcherait alors NF- κ B d'accéder au noyau, entraînant l'initiation de l'apoptose (Baghdiguian *et al.*, 1999). Cette dystrophie diffère des autres car le gène muté code pour une enzyme et non pour une protéine de structure.

➤ Les maladies d'Alzheimer, de Parkinson et de Huntington

Chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, les cellules du cerveau présentent des concentrations intracellulaires en calcium anormalement élevées (Leissring *et al.*, 2000). Le niveau d'expression de la m-calpaïne et l'autolyse de la μ -calpaïne sont fortement augmentés, entraînant une forte activité du système protéolytique calcium-dépendant (Grynspan *et al.*, 1997 ; Saito *et al.*, 1993). Une surexpression de la m-calpaïne a également été observée dans les cellules du mésencéphale de personnes atteintes de la maladie de Parkinson (Mouatt-Pringent *et al.*, 1996). Le déséquilibre non compensé par la calpastatine conduit à une protéolyse anarchique. Ainsi, une stimulation de l'expression de la calpastatine pourrait avoir un intérêt thérapeutique (Mouatt-Pringent *et al.*, 2000). De même, une activité anormale des calpaïnes serait à l'origine de la dégradation de la huntingtine (Htt) associée à la maladie de Huntington (Gafni & Ellerby, 2002).

➤ La cataracte

Des influx de calcium importants dans les cellules du cristallin entraîneraient une activation de la m-calpaïne, provoquant la dégradation de la cristalline. C'est la formation d'agrégats à partir des fragments de la cristalline qui serait responsable de la cataracte (Xu *et al.*, 2004).

➤ Les ischémies cérébrales et cardiaques

Une augmentation importante de la concentration calcique des cellules ischémiques activeraient fortement les calpaïnes, provoquant une protéolyse anarchique et la nécrose de ces cellules (Tsuji *et al.*, 2001 ; Yamashima, 2000).

➤ Le psoriasis

Une étude récente a montré que les patients atteints de psoriasis produisaient des anticorps auto-immuns dirigés contre la calpastatine et que les cellules malades présentaient une surexpression de la m-calpaïne (Matsushita *et al.*, 2005).

➤ Le cancer et l'invasion tumorale

Des études réalisées ces dernières années suggèrent le rôle important des calpaïnes lors de l'établissement de certains cancers. C'est ainsi que les cellules tumorales des adénocarcinomes colorectaux, présentent une expression et une activité de la m-calpaïne anormalement élevées (Lakshmikuttyamma *et al.*, 2004). Des résultats similaires ont été observés dans des cellules en cours de transformation. Les oncoprotéines v-Src, v-Jun, v-Myc, k-Ras et v-Fos, capables d'induire la transformation des cellules, activent de manière significative les calpaïnes. L'activité de ces protéases est augmentée d'un facteur 2 dans les cellules transformées par v-Jun et d'un facteur 11 après transformation par v-Myc (Carragher *et al.*, 2004). Ainsi, les calpaïnes accéléreraient la progression dans le cycle cellulaire et permettraient aux cellules dissociées de survivre et de se multiplier (Carragher *et al.*, 2002). L'activité accrue des calpaïnes serait également à l'origine de l'augmentation des capacités migratrices des cellules transformées. En outre, dans les cellules tumorales, les calpaïnes seraient impliquées fortement dans le phénomène d'invasion. Selon les travaux de Mamoune et de ses collaborateurs (2003), l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des calpaïnes réduirait fortement les capacités invasives des cellules cancéreuses prostatiques (voir Chapitre 3).

Chapitre 2 : Adhésion et migration au cours du développement du muscle squelettique

Les cellules initiales musculaires, spécifiées par les facteurs myogéniques, vont entreprendre des déplacements de plus ou moins grande amplitude pour fusionner et former les myotubes, éléments clefs de la myogenèse précoce.

1. La myogenèse

1.1. Description de la myogenèse

La myogenèse est à l'origine de l'élaboration des tissus musculaires. Ce processus essentiel du développement embryonnaire intervient à la suite de la somitogenèse. *In vivo*, les cellules somitiques prolifèrent, se différencient en myocytes, et expriment des marqueurs musculaires. Leur fusion engendre des myotubes dans lesquels se forment les myofibrilles, qui caractériseront les fibres musculaires matures. Ces différentes étapes constituant la différenciation myogénique ont été observées et caractérisées *in vitro* il y a plus de cinquante ans (Holtzer *et al.*, 1957).

De nos jours, les études s'intéressant à la myogenèse sont plus particulièrement réalisées en culture *in vitro*. L'utilisation de lignées cellulaires ou de myoblastes extraits de muscles adultes ou embryonnaires a permis d'observer et de décrire les principales étapes de la différenciation musculaire. Elles sont identiques quelle que soit la provenance des myoblastes du moins dans les stades précoces de la myogenèse (Figure 10 ; Ludolph & Konieczny, 1995 ; Walsh & Perlman, 1997).

Les myoblastes sont des cellules fusiformes et mononuclées, issues de la détermination des cellules somitiques. En culture, ces cellules présentent une forte activité mitotique. Cette phase de prolifération est contrôlée par les facteurs de transcription c-Fos et c-Jun ainsi que par les facteurs de croissance tels que le FGF (*fibroblast growth factor*) et le TGF- β (*transforming growth factor*) présents dans le milieu de culture. Après la phase de prolifération, MyoD va induire l'expression de p21, un inhibiteur des Cdk (*cyclin-dependent*

kinases). Les Cdk étant des inhibiteurs de Rb, leur inhibition par p21 va permettre à Rb d'être à nouveau actif et ainsi d'arrêter le cycle cellulaire en G0 (Halevy *et al.*, 1995 ; Olson, 1992). L'arrêt du cycle cellulaire se caractérise également par la diminution du niveau d'expression des facteurs de croissance. Les myoblastes vont alors migrer, se reconnaître, s'aligner les uns aux autres et fusionner pour former des myotubes, cellules cylindriques multinucléées (Wakelam, 1985). A l'intérieur des myotubes, les myofibrilles s'organisent (myofibrillogenèse), leur agencement en sarcomères est observé dans les fibres musculaires matures. Cette étape de maturation se traduit par des réarrangements cytosquelettiques, la relocalisation des noyaux à la périphérie et par la mise en place d'une nouvelle architecture cellulaire. Il est à noter la présence de cellules souches myogéniques étroitement associées aux fibres musculaires, elles sont appelées cellules satellites. Elles participeront à la régénération des fibres musculaires lors d'un traumatisme.

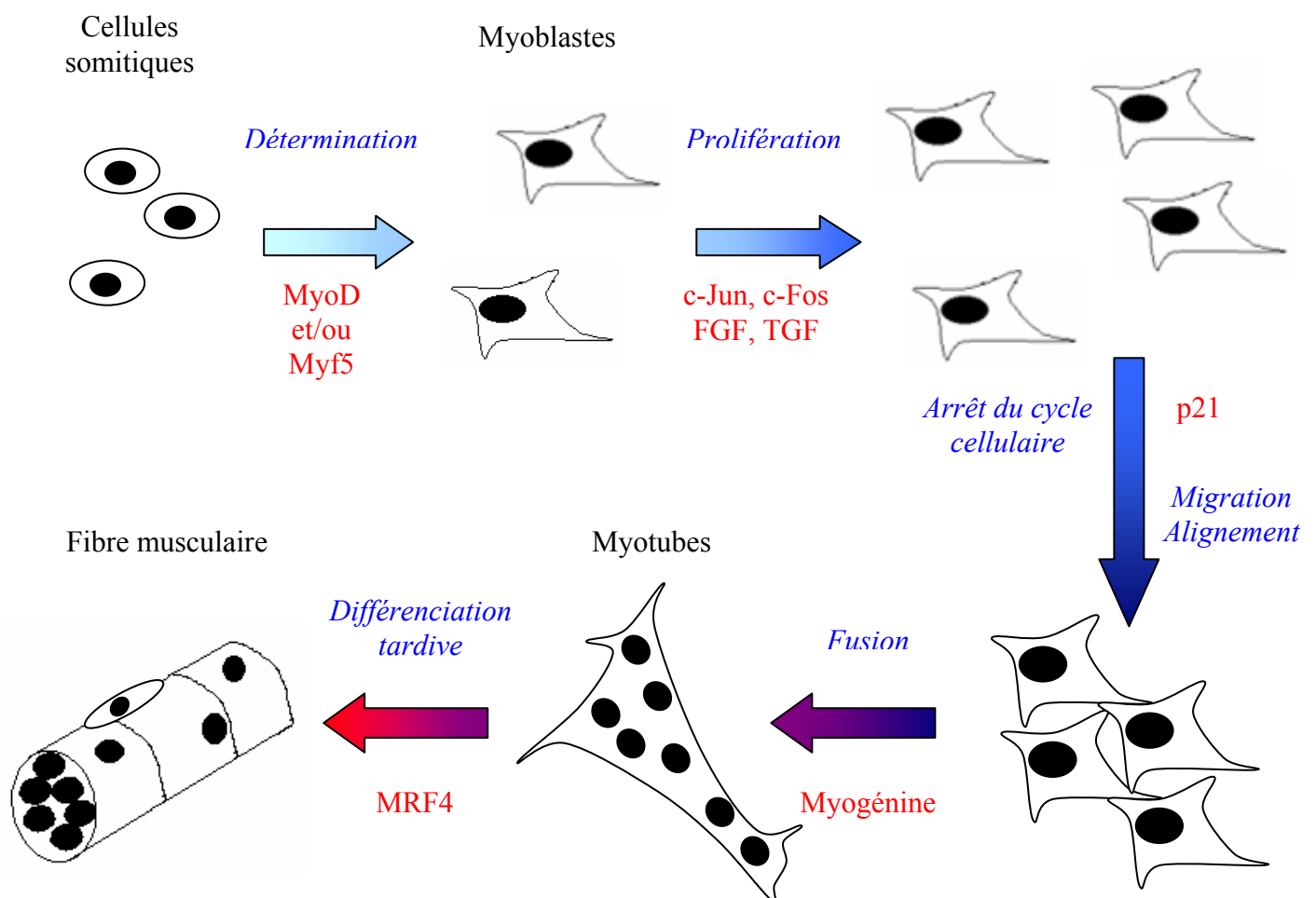


Figure 10 : Représentation schématique des différentes étapes de la myogenèse (adapté de Ludolph & Konieczny, 1995)

1.2. Les MRF

Comme le montre la figure 10, les principales étapes de la différenciation musculaire sont contrôlées par des MRF (*myogenic regulatory factor*). Ces facteurs, spécifiques du muscle, font partie de la superfamille des facteurs de transcription de type bHLH (*basic helix-loop-helix*, Figure 11) qui inclut notamment le facteur c-myc (Olson & Klein, 1994 ; Rudnicki & Jaenisch, 1995). Les MRF étant tissu-spécifiques, ils sont dits de classe II, par opposition aux facteurs de transcription bHLH de classe I, ubiquitaires. La famille des MRF comprend actuellement quatre membres : MyoD (*myogenic determination gene*, MyoD1 ou Myf3), la myogénine (Myf1), Myf5 et MRF4 (herculine ou Myf6). Ces quatre facteurs sont capables d'activer le programme myogénique de cellules non musculaires (Braun *et al.*, 1989 ; Miner & Wold, 1990 ; Weintraub *et al.*, 1989).

Les MRF sont constitués de deux séquences essentielles conservées : la première est une séquence basique permettant la fixation à l'ADN et la seconde est une structure basique hélice-boucle-hélice (bHLH) requise pour la dimérisation (Figure 11).

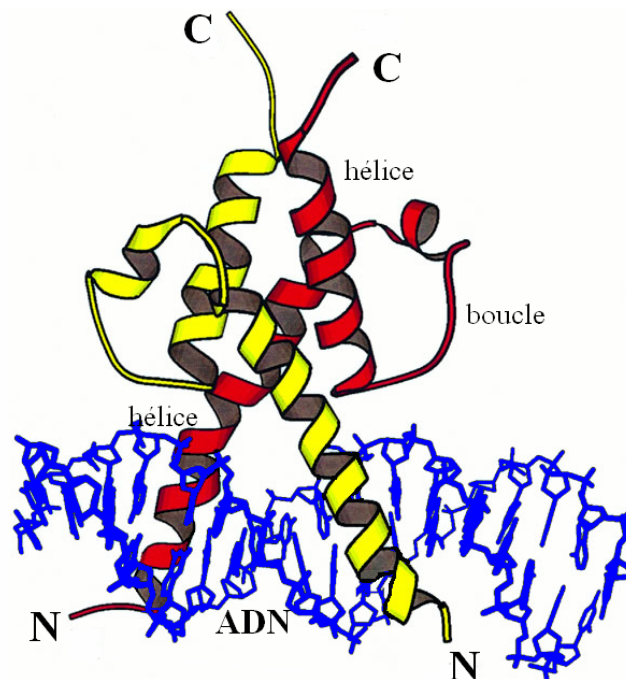


Figure 11 : Représentation schématique de la fixation d'un dimère de facteurs de transcription de type bHLH à l'ADN (adapté de Shimizu *et al.*, 1997)

Les MRF sont susceptibles de former des homodimères ainsi que des hétérodimères en s'associant aux facteurs de transcription bHLH de classe I (E12 et E47 ; Berkes & Tapscott, 2005 ; Sabourin & Rudnicki, 2000). Les dimères ainsi formés se fixent sur l'ADN au niveau

de séquences consensus CANNTG, connues sous le nom de E-box et présentes dans les promoteurs de nombreux gènes « musculaires ». Les MRF vont ainsi pouvoir réguler l'expression de gènes codant pour des protéines spécifiques du muscle mais aussi de protéines ubiquitaires telles que la m-calpaïne.

1.2.1. Régulation des MRF

MyoD est exprimée dans les myoblastes bien avant l'activation de ces gènes cibles, *in vivo* comme en culture *in vitro*. L'activation prématurée de MyoD est empêchée par plusieurs processus: modifications post-traductionnelles, association avec des co-répresseurs ou avec des protéines ne permettant pas la fixation à l'ADN. Dans ce dernier cas, les protéines agissent comme des antagonistes myogéniques, se fixant directement aux MRF ou aux protéines E. Le dimère formé ne permet plus la fixation aux E-box, rendant impossible l'activation de la transcription du gène cible. La plupart de ces protéines possèdent également un domaine bHLH, permettant la dimérisation, c'est le cas notamment des protéines Id, Twist, MyoR et Mist-1. Les protéines Id et Twist inhibent la différenciation myogénique en se fixant aux protéines E, formant alors des complexes inactifs. La séquestration des protéines E par Id ou par Twist empêche la formation des dimères fonctionnels MRF/protéines E (Benezra *et al.*, 1990 ; Spicer *et al.*, 1996). Quant aux inhibiteurs MyoR et Mist-1, ils se dimérisent uniquement avec les MRF. Possédant des domaines basiques de fixation à l'ADN, les dimères vont se fixer sur les E-box, mais ils se révèlent incapables d'activer la transcription des gènes cibles (Lemerrier *et al.*, 1998 ; Lu *et al.*, 1999).

Certaines protéines sont capables d'amplifier l'action des MRF. C'est le cas notamment des facteurs de transcription MEF-2 (*myocyte enhancer factor-2*). Ces quatre facteurs (MEF-2A, B, C et D) assistent les MRF dans la régulation de l'expression de certains gènes spécifiques du muscle (Black & Olson, 1998). Contrairement aux MRF, les protéines MEF-2 sont ubiquitaires et incapables d'initier le programme de différenciation myogénique. Les sites de fixation à l'ADN de MEF-2 sont souvent proches des E-box dans les promoteurs des gènes spécifiques du muscle. Cette proximité permettrait à MEF-2 d'interagir avec les complexes MRF/protéines E et d'augmenter ainsi le potentiel de transactivation des MRF (Molkentin *et al.*, 1995 ; Wasserman & Fickett, 1998). D'autres facteurs assisteraient les MRF lors de la différenciation musculaire, tels que MLP (*muscle LIM protein*, requise pour la différenciation des C2C12), Sp1 et AP1 (Arber *et al.*, 1994 ; Biesiada *et al.*, 1999 ; Kong *et al.*, 1997).

Les facteurs de croissance influencent également l'expression et/ou l'activité des MRF. Ainsi, l'IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*) stimule la myogenèse en augmentant l'expression de la myogénine et de MyoD (Florini *et al.*, 1991 ; Hsu *et al.*, 1997 ; Tiffin *et al.*, 2004). Au contraire le TGF- β 1 (*transforming growth factor- β 1*) inhibe la différenciation musculaire en s'opposant à l'activité des MRF (Lassar *et al.*, 1994 ; Liu *et al.*, 2001).

1.2.2. Gènes cibles des MRF

On distingue plusieurs catégories de gènes activés par les MRF tels que des gènes codant pour des facteurs de transcription (Six et MEF-2), 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 notamment de MyoD qui régule l'expression de la myogénine. Tous ces gènes activés par les MRF n'interviennent pas au même moment dans la myogenèse et l'expression de certains gènes doit donc être activée avant celle des autres. Les mécanismes permettant aux MRF de réguler temporellement leurs expressions sont mal connus. Cependant certains auteurs pensent que MyoD activerait immédiatement l'expression de certains gènes et que les protéines codées par ces derniers seraient nécessaires à l'activation des gènes dont l'expression doit être plus tardive (Penn *et al.*, 2004).

1.3. La fusion des myoblastes

La fusion est une étape cruciale de la myogenèse, elle conduit à la formation d'un syncytium, le myotube, à partir de cellules mononuclées, les myoblastes. Le déclenchement de la fusion des myoblastes est dépendant de plusieurs facteurs, tels que la densité cellulaire, la composition du milieu et l'alignement correct des cellules myogéniques (Linkhart *et al.*, 1981).

En 1997, Doberstein et ses collaborateurs ont décrit et divisé la fusion des myoblastes en cinq étapes successives (Figure 12) : la reconnaissance et l'adhésion des myoblastes susceptibles de fusionner, la formation des complexes de préfusion (apparition de points de contact), la formation d'une « plaque » entre les deux myoblastes à la place des complexes de préfusion, l'élongation et l'alignement des cellules, puis la formation de pores de fusion et leur agrandissement jusqu'à la disparition totale de la membrane.

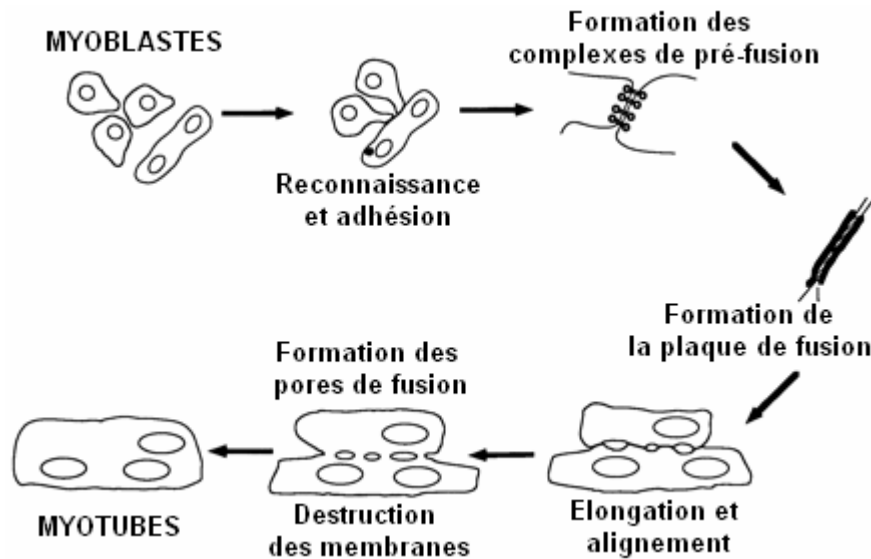


Figure 12 : Représentation schématique des étapes de la fusion des myoblastes (adapté de Doberstein *et al.*, 1997)

De nombreuses protéines transmembranaires sont impliquées dans le processus de fusion telles que les cadhérines N et M, la N-CAM et les intégrines. En outre, les calpaïnes, et plus particulièrement la m-calpaïne, y jouent un rôle primordial.

1.4. Implication des calpaïnes

L'implication des calpaïnes dans les stades précoces de la myogenèse et plus particulièrement au cours de la fusion des myoblastes a été signalée pour la première fois par Schollmeyer en 1986. Depuis, de nombreux travaux se sont intéressés à ce phénomène et notamment ceux entrepris au laboratoire. L'utilisation d'anti-sens dirigés contre les deux calpaïnes ubiquitaires a montré que l'inhibition de l'expression de la m-calpaïne empêchait la fusion, confirmant le rôle clef de cette isoforme (Balcerzak *et al.*, 1995). La m-calpaïne posséderait une dualité d'action, elle cliverait la taline et la desmine à l'intérieur de la cellule ainsi que le complexe fibronectine/intégrine à l'extérieur (Brustis *et al.*, 1994 ; Dourdin *et al.*, 1997 ; Dourdin *et al.*, 1999). Le clivage de la protéine MARCKS par les calpaïnes serait également nécessaire à la fusion des myoblastes (Dulong *et al.*, 2004 ; Goudenège *et al.*, 2005).

Bien que son rôle soit encore controversé, il semble que la calpastatine soit également fortement impliquée dans ce phénomène. Selon les travaux de Barnoy *et al.* (2005) et de Temm-Grove *et al.* (1999) des micro-injections ou la surexpression de cet inhibiteur dans les

myoblastes bloquent la fusion. La calpastatine serait dégradée par la caspase-1 avant la fusion permettant ainsi l'activation des calpaïnes nécessaire à l'initiation de ce processus (Barnoy & Kosower, 2003). Plusieurs études réalisées afin d'identifier le moment précis où la calpastatine interviendrait ont obtenu des résultats très contradictoires (Cottin *et al.*, 1994 ; Kwak *et al.*, 1993 ; Temm-Grove *et al.*, 1999).

2. L'adhésion

Le processus d'adhésion permet l'établissement de relations très étroites entre des cellules voisines (*via* les cadhérines) mais également entre les cellules et la matrice extracellulaire (MEC) *via* les intégrines (Albelda & Buck, 1990 ; Hynes, 1992). L'adhésion des cellules à la MEC est un phénomène essentiel qui intervient dans de nombreux processus biologiques tels que la migration cellulaire, la différenciation, la prolifération, la régulation de l'expression de certains gènes et la survie de la cellule.

La MEC est composée plus particulièrement de protéines organisées en un réseau complexe auquel s'associent des polysaccharides. Les principaux composants de la MEC sont les collagènes, la fibronectine et la laminine. Ces protéines vont interagir avec la membrane plasmique au niveau de régions spécialisées appelées plaques d'adhésion, adhésions focales ou contacts focaux. Ces plaques d'adhésion sont constituées de nombreuses protéines qui créent un complexe autour des intégrines et forment un véritable « pont » moléculaire entre la MEC et les fibres d'actine. Les plaques d'adhésion permettent d'une part l'ancrage de la cellule à la MEC en liant de manière indirecte le cytosquelette à la matrice et d'autre part une éventuelle signalisation cellulaire *via* les intégrines.

2.1. Composition des plaques d'adhésion

Les plaques d'adhésion ont été décrites pour la première fois dans les années 70 comme des régions de contact entre la membrane « ventrale » de la cellule et le substrat (Abercrombie *et al.*, 1971 ; Couchman & Rees, 1979). Des études microscopiques plus récentes ont permis d'identifier une deuxième structure d'adhésion, les complexes focaux. Alors que les plaques d'adhésion (ou contacts focaux) sont de larges structures observées à l'extrémité des fibres d'actine, les complexes focaux sont de petites structures d'adhésion qui se forment à l'extrémité des protusions membranaires telles que les filopodes.

Les protéines constitutives des plaques d'adhésion sont nombreuses, on en distingue deux types différents : les protéines transmembranaires et les protéines cytoplasmiques. Des interactions vont s'établir entre toutes ces protéines, de façon plus ou moins directe. Les possibilités d'interaction sont donc multiples, de très nombreuses configurations différentes peuvent exister rendant la structure des plaques d'adhésion complexe (Figure 13). La composition et la structure de ces complexes varient selon la nature de la MEC. En outre, des plaques d'adhésion de composition différente peuvent être présentes au sein d'une même cellule (Sondermann *et al.*, 1999 ; Zamir *et al.*, 1999).

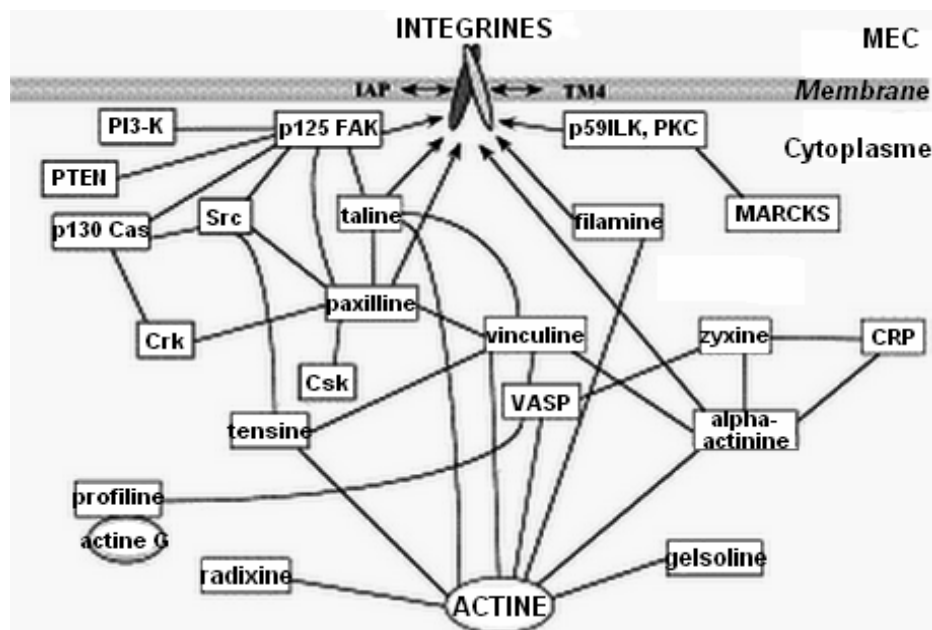


Figure 13 : Représentation schématique des principales interactions possibles entre les protéines composant les plaques d'adhésion (adapté de Petit et Thiery, 2000)

2.1.1. Les protéines transmembranaires

Les intégrines sont les principales protéines transmembranaires des plaques d'adhésion. Elles forment une large famille de glycoprotéines transmembranaires hétérodimériques. Les intégrines interagissent avec les composants de la MEC, participant ainsi à l'adhésion de la cellule à cette matrice, mais elles peuvent également lier VCAM ou ICAM et participer ainsi aux contacts entre cellules (Hynes, 1992). Ces protéines sont composées de deux sous-unités différentes, α et β . Actuellement, 18 sous-unités α ont été identifiées ainsi que 8 sous-unités β , permettant la formation de 24 dimères différents. Le large domaine extracellulaire des

intégrines est responsable des interactions avec la MEC alors que le domaine intracellulaire, beaucoup plus court, interagit avec les protéines cytoplasmiques. Chaque protéine de la MEC est reconnue par plusieurs intégrines et chaque intégrine est capable de se lier à plusieurs composants de la MEC. Il existe donc une certaine redondance parmi les 24 intégrines, cependant certaines sont uniques et irremplaçables (Beauvais-Jouneau & Thiery, 1997).

Bien que les intégrines soient majoritaires, il existe également d'autres protéines transmembranaires au niveau des plaques d'adhésion. C'est notamment le cas des protéines TM4SF (*transmembrane 4 superfamily*) également appelées tétraspanines. Ces protéines se composent de quatre domaines transmembranaires qui forment deux boucles extracellulaires. Leurs interactions avec différentes intégrines permettent la formation d'un complexe présent dans les complexes focaux mais qui semble absent des contacts focaux (Berdichevski & Odintsova, 1999). Les protéines transmembranaires IAP (*integrin-associated protein*), CD98 et les syndécans sont également observées au niveau des plaques d'adhésion.

2.1.2. Les protéines cytoplasmiques

Au niveau des plaques d'adhésion, on distingue deux types de protéines cytoplasmiques: les protéines structurales et les protéines régulatrices. Ces protéines interagissent directement ou indirectement avec les domaines cytoplasmiques des intégrines. Les protéines structurales telles que la taline, la filamine, la vinculine et l' α -actinine lient directement les intégrines aux fibres d'actine (Horwitz *et al.*, 1986 ; Otey *et al.*, 1990 ; Lewis & Schwartz, 1995). Ces protéines sont indispensables à l'adhésion et à la migration, phénomènes étroitement liés. C'est ainsi que des cellules vinculine -/- présentent un défaut d'adhésion et un accroissement de la migration, le même résultat a été observé dans des cellules taline -/- (Coll *et al.*, 1995 ; Priddle *et al.*, 1998 ; Xu *et al.*, 1998).

Les complexes protéiques formés au niveau des plaques d'adhésion ne servent pas uniquement de lien structural entre les intégrines et le cytosquelette, ils sont également impliqués dans la formation et la maintenance des fibres d'actine ainsi que dans la signalisation cellulaire. Ce sont les protéines régulatrices qui sont responsables de ces différentes fonctions. Par exemple, la gelsoline est fortement impliquée dans la régulation de la formation des filaments d'actine puisque les cellules gelsoline -/- se caractérisent par un défaut de formation des lamellipodes et une inhibition de la migration (Azuma *et al.*, 1998). La tensine jouerait un rôle proche de celui de la gelsoline, sa surexpression retardant l'assemblage des fibres d'actine (Lo *et al.*, 1994). Quant à la radixine, elle contrôlerait

l'addition de nouveaux monomères d'actine aux fibres existantes (Tsukita *et al.*, 1989). La zyxine et VASP seraient également impliquées dans la régulation de la formation des fibres d'actine.

Certaines protéines régulatrices telles que la PKC, la PI3 kinase, p130Cas, Src ou la FAK (*focal adhesion kinase*) sont plus particulièrement impliquées dans la signalisation cellulaire. En outre, selon des travaux récents, elles joueraient un rôle dans la migration, l'invasion, la progression du cycle cellulaire et la survie de la cellule. Une dérégulation de l'activité de ces protéines a été observée dans des cellules cancéreuses invasives (Carelli *et al.*, 2006 ; Mitra & Schlaepfer, 2006).

2.2. Formation des plaques d'adhésion

La formation des plaques d'adhésion est schématisée figure 14. La première étape consiste au rassemblement des intégrines et à leur liaison à la MEC (Fig. 14A). La région cytoplasmique de la sous-unité β des intégrines semble indispensable à ce processus de rassemblement. Dès que l'adhésion est initiée, les différentes protéines cytoplasmiques avoisinantes s'associent aux intégrines (Schmidt *et al.*, 1993). Cette association, contrôlée par les GTPases de la famille Rho, ne se fait pas de façon aléatoire. Selon le modèle proposé par Miyamoto et ses collaborateurs en 1995, l'agrégation des intégrines, en présence ou en absence de MEC, va induire le recrutement des protéines FAK et tensine auxquelles vont alors s'associer la taline, la vinculine et l' α -actinine (Fig. 14B). L'activité tyrosine kinase de la FAK permet le recrutement d'une vingtaine de protéines différentes, dont la cortactine, la pp120, RhoA, Rac1, les membres de la famille Src ainsi que certains composants de la voie des MAP kinases (MEKK, MEK...). Puis, la filamine et la paxilline s'associent aux protéines déjà présentes, complétant la plaque d'adhésion et permettant ainsi à l'actine F de se lier au complexe (Fig. 14C) (Miyamoto *et al.*, 1995a ; Miyamoto *et al.*, 1995b).

La FAK semble jouer un rôle clef dans la formation des plaques d'adhésion puisque son absence entraîne la formation d'un nombre anormal de plaques d'adhésion et l'inhibition de la migration. Au contraire, la surexpression de la FAK augmente significativement la vitesse de migration des cellules (Cary *et al.*, 1996 ; Ilic *et al.*, 1995).

Les GTPases de la famille Rho (*Ras homologous*) contrôleraient la formation de ce complexe protéique indispensable à l'adhésion. Rho interviendrait dans la formation des fibres d'actine et des complexes d'adhésion alors que Cdc42 et Rac1 participeraient à la formation des filopodes et des lamellipodes (Hotchin & Hall, 1995 ; Nobes & Hall, 1995).

Bien que l'importance du rôle joué par Rho dans la formation de la plaque d'adhésion ait été confirmée par de nombreuses études (Narumiya *et al.*, 1988 ; Ridley & Hall, 1992), les mécanismes moléculaires impliqués dans cette régulation restent à élucider.

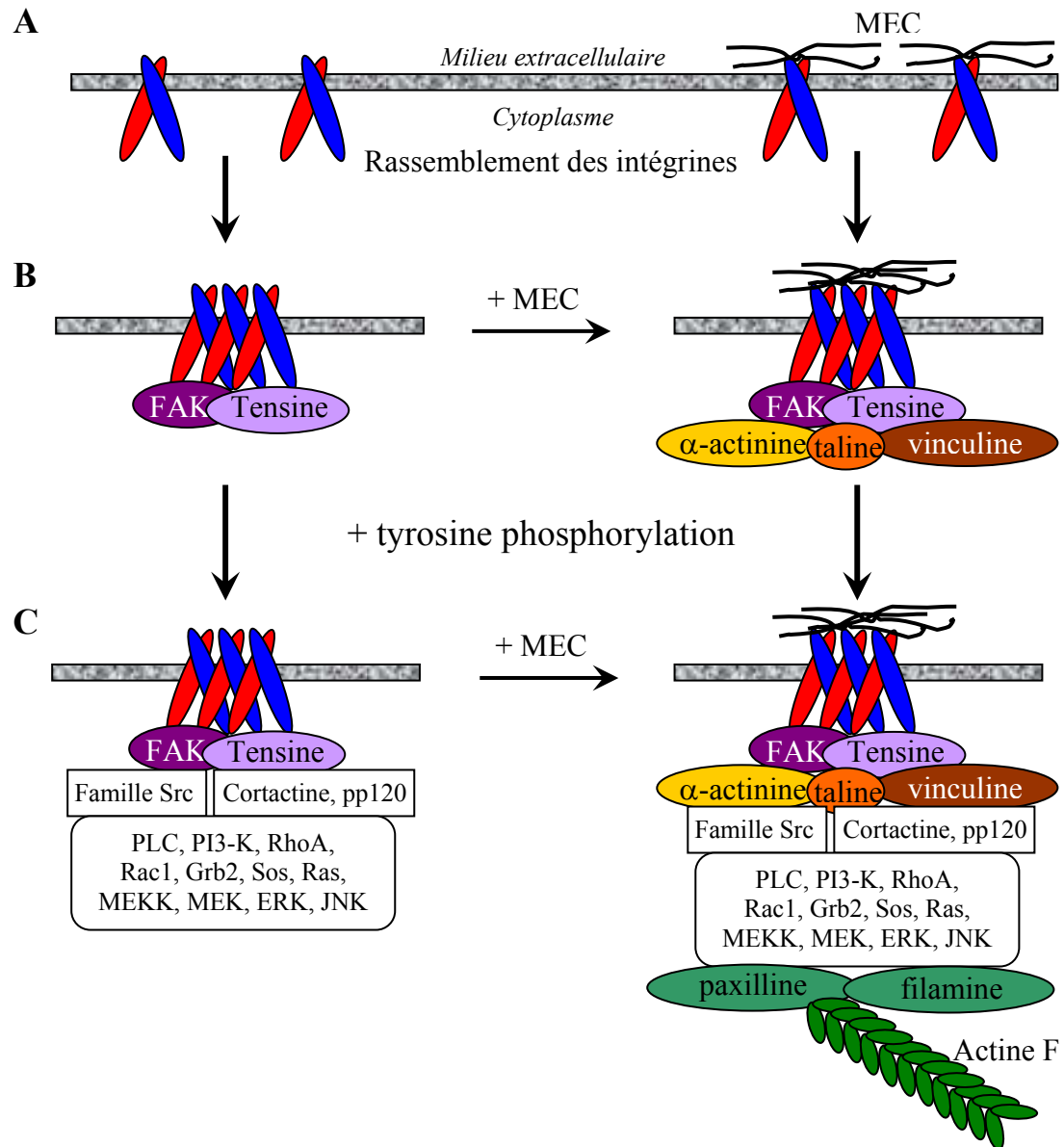


Figure 14 : Formation des plaques d'adhésion par recrutement séquentiel des protéines cytoplasmiques par les intégrines (adapté de Miyamoto *et al.*, 1995a et b)

La première étape de la formation des plaques d'adhésion est le rassemblement des intégrines (A). La FAK et la tensine s'associent alors aux intégrines, suivies par l' α -actinine, la taline et la vinculine en présence de MEC (B). L'activité tyrosine kinase de FAK va permettre le recrutement d'une vingtaine de protéines dont Src, la cortactine, RhoA ou MEK. En présence de MEC, la paxilline et la filamine s'associent à ces protéines, permettant la fixation des fibres d'actine (C).

2.3. L'étalement cellulaire

L'étalement cellulaire intervient juste après la fixation de la cellule au substrat. Ce phénomène complexe permet « l'extension » de la cellule associée à la mise en place de nouvelles plaques d'adhésion et fibres d'actine à la périphérie cellulaire (Figure 15). L'étalement de la cellule ferait intervenir plusieurs protéines régulatrices telles que RhoA, Rac et la μ -calpaïne. Les cellules surexprimant la μ -calpaïne se caractérisent d'ailleurs par un étalement cellulaire excessif, tandis que l'inhibition de cette protéase confère aux cellules une morphologie arrondie (Glading *et al.*, 2002 ; Kulkarni *et al.*, 1999).

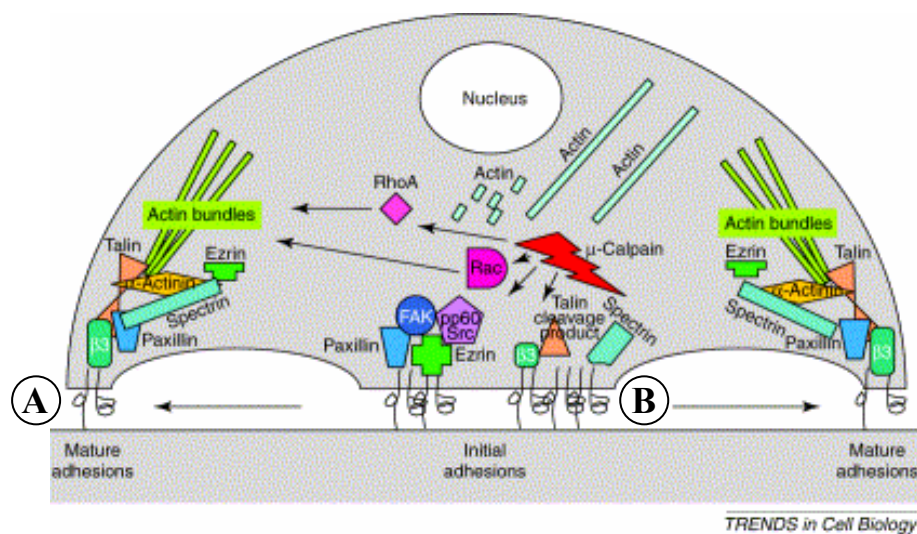


Figure 15 : Formation des nouvelles plaques d'adhésion lors de l'étalement cellulaire (d'après Glading *et al.*, 2002)

Après la fixation de la cellule à la MEC, la μ -calpaïne activerait les GTPases RhoA et Rac, induisant ainsi la formation de nouvelles plaques d'adhésion et fibres d'actine à la périphérie cellulaire (A). Dans un même temps, la μ -calpaïne dégraderait la taline et la spectrine conduisant à la dissociation des complexes d'adhésion ayant permis la fixation initiale de la cellule à la matrice (B).

2.4. Implication des calpaïnes dans les phénomènes d'adhésion

Selon les travaux de Croce *et al.* (1999) et Stewart *et al.* (1998), l'activité des calpaïnes est requise au moment de l'adhésion et de l'étalement cellulaire, toutefois leur(s) rôle(s) reste(nt) encore à élucider. Les calpaïnes ne s'associent pas aux protéines qui composent les plaques d'adhésion, mais elles sont présentes à proximité de ces complexes protéiques. Ce

seraient les intégrines qui induiraient la translocation de ces protéases au niveau des plaques d'adhésion et qui permettraient l'activation des calpaïnes (Fox *et al.*, 1993 ; Rock *et al.*, 2000). Les résultats issus des travaux de Kulkarni *et al.* (1999) supposent l'intervention de la μ -calpaïne lors de la formation des plaques d'adhésion et de l'étalement cellulaire. La surexpression de cette protéase multiplie le nombre de plaques d'adhésion et de fibres d'actine, et provoque un étalement anormal des cellules (Kulkarni *et al.*, 1999). La façon dont la μ -calpaïne induirait l'association des plaques d'adhésion reste inconnue et problématique puisqu'un nombre important de protéines constitutives de ces plaques sont des substrats potentiels des calpaïnes.

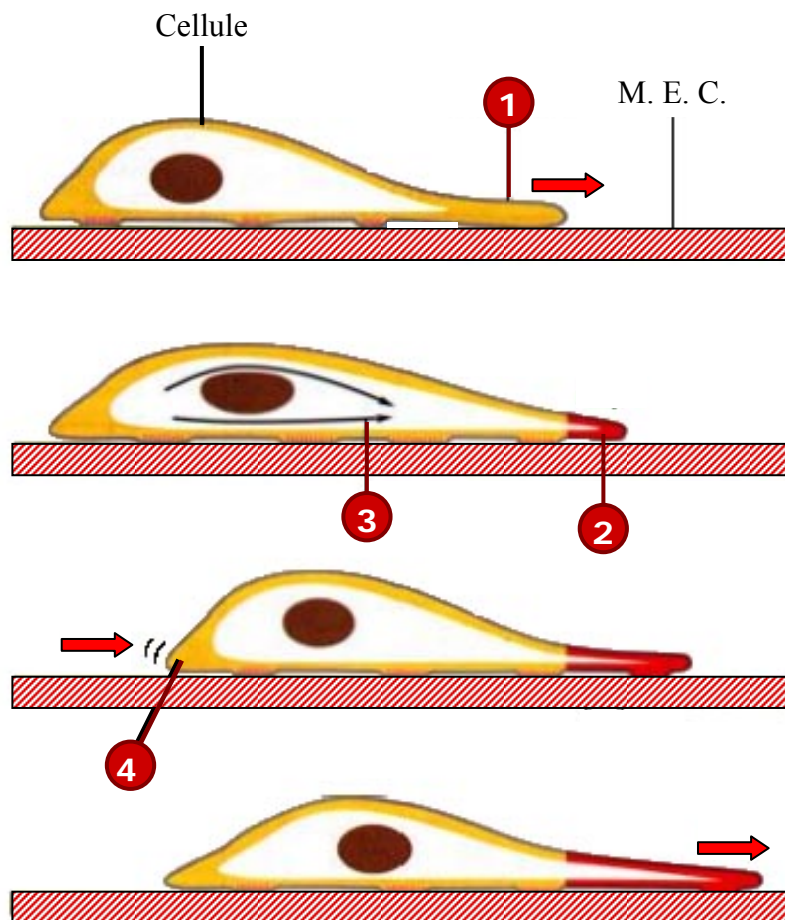
3. La migration cellulaire

3.1. Principe et étapes de la migration

La migration cellulaire est un processus central et indispensable dans de nombreux phénomènes biologiques tels que la cicatrisation, la réponse immunitaire et le développement embryonnaire. Au cours du développement musculaire, la migration permet le rapprochement et l'alignement des myoblastes, nécessaires à la fusion, étape clef de la myogenèse.

Les études s'intéressant à la migration cellulaire montrent que ce processus est une succession d'événements coordonnés (Figure 16). La migration des fibroblastes a été divisée en quatre étapes successives (Lauffenburger & Horwitz, 1996 ; Sheetz *et al.*, 1999). La première étape est la formation de protusions vers « l'avant » de la cellule (dans le sens de migration). Le type de protusions (filopodes, lamellipodes, pseudopodes) dépend de la polymérisation de l'actine. Lors de la seconde étape, la cellule forme des plaques d'adhésion au niveau de ces protusions afin d'interagir avec la MEC, il s'agit de l'étape d'adhésion. Les filaments d'actine qui se sont organisés au niveau des nouvelles plaques d'adhésion vont permettre la traction du corps cellulaire dans le sens de migration (étape de traction cellulaire). Au cours de la quatrième étape, les plaques d'adhésion présentes à l'arrière se dissocient entraînant la rétractation de cette partie de la cellule. Il s'agit donc d'une étape de dé-adhésion. Selon Sheetz et ses collaborateurs (1999), une cinquième étape consisterait en un recyclage des récepteurs membranaires (dont les intégrines) de l'arrière vers l'avant de la cellule. Ces protéines recyclées seraient réutilisées pour former les nouvelles plaques

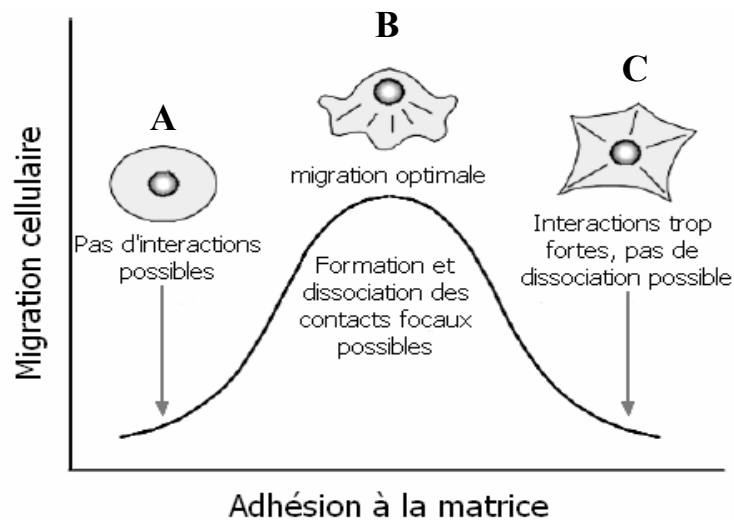
d'adhésion. Néanmoins, une partie des intégrines reste fixée à la MEC et est « abandonnée » par la cellule (Palecek *et al.*, 1996).



**Figure 16 : Les différentes étapes de la migration cellulaire
(adapté de Sheetz *et al.*, 1999)**

*1 : Formation de protusions membranaires ; 2 : Formation de plaques d'adhésion
3 : Traction du corps cellulaire vers l'avant ; 4 : Dissociation des contacts focaux*

La migration est une succession d'étapes de formation et de dissociation des contacts focaux. Les interactions entre la matrice et les contacts focaux situés à l'avant de la cellule doivent être suffisamment fortes pour permettre la traction de celle-ci. *A contrario*, les interactions formées à l'arrière doivent être assez faibles pour pouvoir être dissociées facilement et permettre ainsi le mouvement de la cellule. L'asymétrie qui existe entre l'avant et l'arrière de la cellule nécessite une régulation importante du turn-over des plaques d'adhésion. La force d'adhésion est donc un facteur limitant de la migration comme l'indique le schéma présenté figure 17.



**Figure 17 : Relation entre l'adhésion et la vitesse de migration cellulaire
(adapté de Cox & Huttenlocher, 1998)**

Lorsque l'adhésion est trop faible, aucune interaction entre la cellule et la matrice n'est possible, ce qui ne permet pas à la cellule de migrer (A). Si les interactions ne sont ni trop fortes ni trop faibles, les contacts focaux peuvent se former et se dissocier, permettant ainsi la migration optimale de la cellule (B). Lorsque les interactions sont trop fortes, les contacts focaux ne peuvent plus être dissociés, rendant impossible la rétraction de l'arrière de la cellule et la migration cellulaire (C).

La dé-adhésion de la cellule, processus indispensable à la migration, nécessite la dissociation des plaques d'adhésion. Le mécanisme qui permet le désassemblage de ces complexes protéiques n'est pas l'inverse de celui permettant leur formation. En effet, contrairement à l'association des plaques d'adhésion (Cf. paragraphe 2.2.), la dissociation de ces plaques ne semble pas obéir à un ordre clairement établi. Des protéines comme la paxilline et la taline quittent le complexe protéique approximativement en même temps alors qu'elles sont recrutées à des moments différents lors de la formation du complexe (Webb *et al.*, 2002).

Les mécanismes qui permettent la dissociation des plaques d'adhésion, et donc la rupture des contacts entre la cellule et la MEC, impliquent des processus biochimiques et physiques. La contraction de la cellule et la traction du corps cellulaire vers l'avant seraient responsables de la destruction physique de ces plaques. Plusieurs facteurs extracellulaires semblent impliqués dans la rupture des contacts cellule/MEC. La protéine SPARC, la tenascine et la thrombospondine faciliteraient la destruction des plaques d'adhésion ainsi que

celle des fibres d'actine (Greenwood & Murphy-Ullrich, 1998). Les tyrosine-kinases, déjà impliquées dans l'adhésion, seraient également nécessaires à la dé-adhésion (Fincham & Frame, 1998). C'est notamment le cas de Src qui, en phosphorylant FAK, la paxilline et la tensine, induirait leur dégradation et par conséquent la destruction du complexe protéique.

La dissociation des plaques d'adhésion est régulée par de nombreux facteurs afin d'éviter une dé-adhésion anormale, en particulier à l'avant de la cellule. Les GTPases de la famille Rho sont des éléments clef du turn-over de ces complexes protéiques, elles régulent à la fois l'adhésion et la dé-adhésion. Au cours de ce phénomène, Cdc42 et Rac activent certains de leurs effecteurs comme PAK (*p21 activated kinase*) et N-WASP, initiant ainsi la dissociation des plaques d'adhésion. RhoA qui induit la formation et la stabilisation de ces complexes protéiques, est phosphorylée par la PKA et ainsi inactivée pour permettre la dissociation des plaques d'adhésion. Selon les travaux de Hsia *et al.* (2003) et de Zhai *et al.*, (2003), FAK interviendrait dans ce phénomène en activant Rac, qui à son tour inactiverait RhoA. La protéine FAK serait donc, comme les GTPases de la famille Rho, impliquée à la fois dans l'association et la dissociation des contacts focaux.

Certains facteurs de croissance sont également impliqués dans la régulation de la dé-adhésion et donc de la migration (Cf. paragraphe 3.4.). Xie et ses collaborateurs (1998) ont montré que l'EGF, en activant la voie de signalisation ERK/MAP kinase, induit la dissociation des plaques d'adhésion, stimulant ainsi la migration cellulaire. D'autres facteurs de croissance comme le HGF (*hepatocyte growth factor*) et le PDGF agiraient de la même manière (Matsumoto *et al.*, 1994 ; Rankin & Rozengurt, 1994).

3.2. Rôle du cytosquelette dans la migration cellulaire

3.2.1. Le cytosquelette d'actine

Selon Lambrecht et ses collaborateurs (2004), le cytosquelette d'actine peut être considéré comme « le moteur de la migration cellulaire ». La polymérisation et le réarrangement dynamique des fibres d'actine permettent la formation des protusions membranaires et la création des forces intracellulaires nécessaires à la traction du corps de la cellule. Les monomères d'actine (actine G) se polymérisent pour former des filaments double-brin d'actine F dont l'organisation est présentée figure 18. La polymérisation est dirigée vers la périphérie de la cellule et les filaments formés vont pousser la membrane vers l'extérieur

pour former des protusions membranaires. Selon le mode de polymérisation de l'actine, ces protusions seront des lamellipodes (polymérisation « branchue ») ou des filopodes (polymérisation en « faisceaux »). Ces deux types de polymérisation font intervenir des protéines différentes. Dans le cas des lamellipodes, c'est le complexe Arp2/3 qui est engagé dans la formation d'« embranchement », alors que pour les filopodes, il s'agit de la fascine, d'Ena/VASP et de la fimbrine (Figure 18 ; Lambrechts *et al.*, 2004).

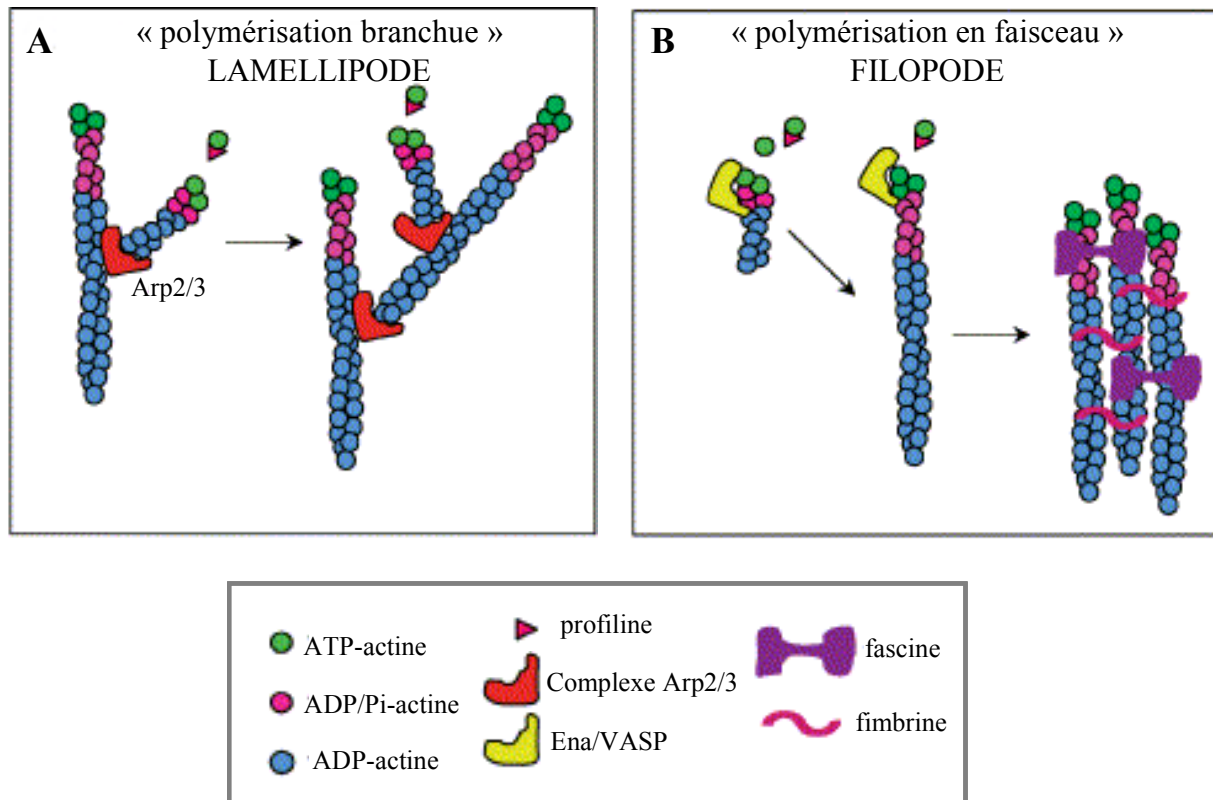


Figure 18 : Les différents modes de polymérisation de l'actine conduisant à la formation des lamellipodes (A) et des filopodes (B) (adapté de Lambrechts *et al.*, 2004)

L'intervention du complexe Arp2/3 lors de la polymérisation des fibres d'actine entraîne la formation « d'embranchements », cette polymérisation « branchue » est observée dans les lamellipodes (A). A contrario, les protéines ENA/VASP, fascine et fimbrine sont impliquées dans la formation de « faisceaux » d'actine. Ce mode de polymérisation est observé au niveau des filopodes (B).

Les myoblastes, comme les fibroblastes, présentent un réseau de filaments d'actine préférentiellement organisé en fibres de stress, constituées de longs filaments d'actine ancrés au niveau des contacts focaux à la périphérie cellulaire. La formation des fibres de stress fait intervenir la protéine DRF (*Diaphanous related formins*).

D'autres facteurs modulent localement la formation et l'ancrage des filaments d'actine, c'est le cas notamment des GTPases de la famille Rho (Ridley *et al.*, 1992 ; Ridley, 2001). L'implication de ces GTPases dans les phénomènes d'adhésion, de dé-adhésion et de régulation du cytosquelette d'actine montre à quel point ces protéines jouent un rôle important dans la migration. Cdc42, Rac et RhoA coopèrent pour réguler la polymérisation des filaments d'actine et pour coordonner les différents événements liés à la migration cellulaire. RhoA active certains de ces effecteurs comme les formines et la Rho-associated kinase qui à leur tour vont induire la polymérisation de l'actine et la phosphorylation des chaînes légères de la myosine. RhoA est également responsable de la contraction des filaments d'actine et de la myosine, permettant la traction cellulaire. Rac stimule la polymérisation « branchue » de l'actine entraînant la formation de lamellipodes. Quant à Cdc42, elle induit la polymérisation en « faisceaux » conduisant à la formation des filopodes.

3.2.2. Les microtubules

Le réseau formé par les microtubules est différent du cytosquelette d'actine. En effet les microtubules émanent de la région périnucléaire et sont dirigés vers la périphérie de la cellule alors que les fibres d'actine sont organisées de façon parallèle dans le sens de migration. Le réseau de microtubules est, comme celui d'actine, impliqué dans la migration des cellules. La perturbation de ce réseau dans les fibroblastes réduit fortement la formation des lamellipodes et bloque la migration de ces cellules (Bershadsky *et al.*, 1991). Les microtubules interviendraient à l'avant et à l'arrière de la cellule, régulant à la fois l'adhésion et la déstabilisation des contacts focaux. Il existe des relations étroites entre le réseau d'actine et celui des microtubules. Ce dernier régulerait la migration en agissant sur la polymérisation des fibres d'actine, *via* les GTPases Rho. La dépolymérisation des microtubules conduirait à l'activation de RhoA qui à son tour induirait la formation des fibres de stress et des contacts focaux ainsi que la phosphorylation de la FAK et de la paxilline (Bershadsky *et al.*, 1996 ; Enomoto, 1996). La polymérisation des microtubules permettrait la libération de Rac1, lié aux dimères de tubuline, induisant ainsi la formation des lamellipodes (Wehrle-Haller & Imhof, 2003). Le réseau de microtubules serait également responsable de la dépolymérisation de l'actine à l'arrière de la cellule, toutefois les mécanismes impliqués dans ce processus restent encore inconnus.

3.3. Implication des calpaïnes

Des études récentes réalisées plus particulièrement au laboratoire ont montré une forte implication des calpaïnes dans la migration cellulaire. L'inhibition de l'activité des calpaïnes par surexpression de la calpastatine ou par utilisation d'inhibiteurs chimiques réduit significativement la migration des myoblastes et entraîne de profonds changements morphologiques. De plus, l'utilisation d'ARN antisens dirigés contre la μ - et la m-calpaïne a démontré que ces deux protéases sont requises lors des phénomènes migratoires entrepris par les myoblastes (Dedieu *et al.*, 2003). Les calpaïnes interviendraient dans les différents processus inhérents à la migration cellulaire, à savoir l'adhésion, la dé-adhésion et la dynamique du cytosquelette d'actine.

➤ L'adhésion et la formation des plaques d'adhésion.

Les premières études s'intéressant aux rôles des calpaïnes au cours de l'adhésion ont été réalisées sur les plaquettes, cellules sanguines capables d'adhérer et de s'agréger. Ces cellules ont la particularité de n'exprimer qu'une seule isoforme, la μ -calpaïne. L'hypothèse supposant l'implication de la μ -calpaïne dans l'adhésion a été confirmée par des expérimentations conduisant à l'inhibition de cette protéase. Les résultats indiquent en effet une forte réduction de l'adhésion cellulaire (Azam *et al.*, 2001 ; Croall & De Martino, 1991). De plus l'inhibition de l'activité de la μ -calpaïne conduit à une incapacité des cellules à s'étaler ainsi qu'à former des contacts focaux et des fibres de stress (Kulkarni *et al.*, 1999). Les mécanismes d'action de la μ -calpaïne au cours de l'adhésion restent mal connus. Cependant certains travaux suggèrent que la μ -calpaïne agirait sur les GTPases de la famille Rho, protéines qui régulent la formation des lamellipodes, des plaques d'adhésion et des fibres de stress (Kulkarni *et al.*, 2002).

➤ La dé-adhésion

Le rôle joué par les calpaïnes dans la dé-adhésion est beaucoup plus argumenté, probablement parce que certains constituants des plaques d'adhésion sont des substrats potentiels des calpaïnes. La protéolyse des protéines telles que la taline, la FAK ou la paxilline *via* l'action de la m-calpaïne, permettrait une dissociation rapide du complexe protéique. L'utilisation de siRNA dirigés contre la m-calpaïne entraîne l'inhibition de la dé-adhésion et bloque la rétractation de la partie arrière de la cellule, ce qui n'est pas le cas après utilisation de siRNA dirigés contre la μ -calpaïne. En outre, il a été montré dans ce type

d'expérimentation que seule l'activité de la m-calpaïne est requise pour dégrader la taline, la paxilline, la spectrine, la cortactine et la FAK, (Franco *et al.*, 2004 ; Perrin *et al.*, 2006). D'autres protéines constitutives des plaques d'adhésion (zyxine, vinculine et α -actinine) seraient également clivées par la m-calpaïne au moment de la dissociation des contacts focaux. L'inhibition des calpaïnes stabilise ces protéines ainsi que les complexes focaux, inhibant la dé-adhésion et de ce fait la migration cellulaire (Bhatt *et al.*, 2002).

L'activité protéolytique au niveau des plaques d'adhésion peut être régulée par différents processus, tels que la phosphorylation des substrats. C'est notamment le cas pour FAK dont le clivage par les calpaïnes nécessite une phosphorylation par Src (Carragher & Frame, 2004). En formant un complexe avec p42ERK et la m-calpaïne, FAK permettrait la translocation de l'enzyme du cytoplasme vers les substrats potentiels situés au niveau des plaques d'adhésion (Carragher *et al.*, 2003). La m-calpaïne serait alors activée par des facteurs tels que l'EGF. Ce dernier activerait ERK et MEKK1 qui à leur tour phosphoryleraient la m-calpaïne (Cuevas *et al.*, 2003 ; Glading *et al.*, 2000 ; voir paragraphe 3.4.). Les facteurs de croissance pourraient aussi activer des canaux calciques de type L induisant ainsi un influx de calcium et donc l'activation des calpaïnes (Yang & Huang, 2005).

➤ Le cytosquelette

Les calpaïnes agiraient sur le cytosquelette d'actine en régulant l'activité des GTPases Rho, Rac, et Cdc42 (Cf. paragraphe 3.2.1.).

Glading et ses collaborateurs ont proposé en 2002 un modèle encore spéculatif présentant l'action des deux calpaïnes ubiquitaire au cours de la migration cellulaire (Figure 19). Selon ce modèle, la μ -calpaïne serait localisée à l'avant de la cellule où elle interviendrait dans la formation des contacts focaux, régulant ainsi l'adhésion. Au contraire, la m-calpaïne serait localisée à l'arrière de la cellule. Son activation par l'EGF et la voie ERK permettrait la dégradation des protéines constitutives des plaques d'adhésion et ainsi la dissociation de ces complexes protéiques. *A contrario*, l'IP-10 inhiberait l'activité de la m-calpaïne en induisant la phosphorylation de la sérine 369 et de la thréonine 370 par la PKA.

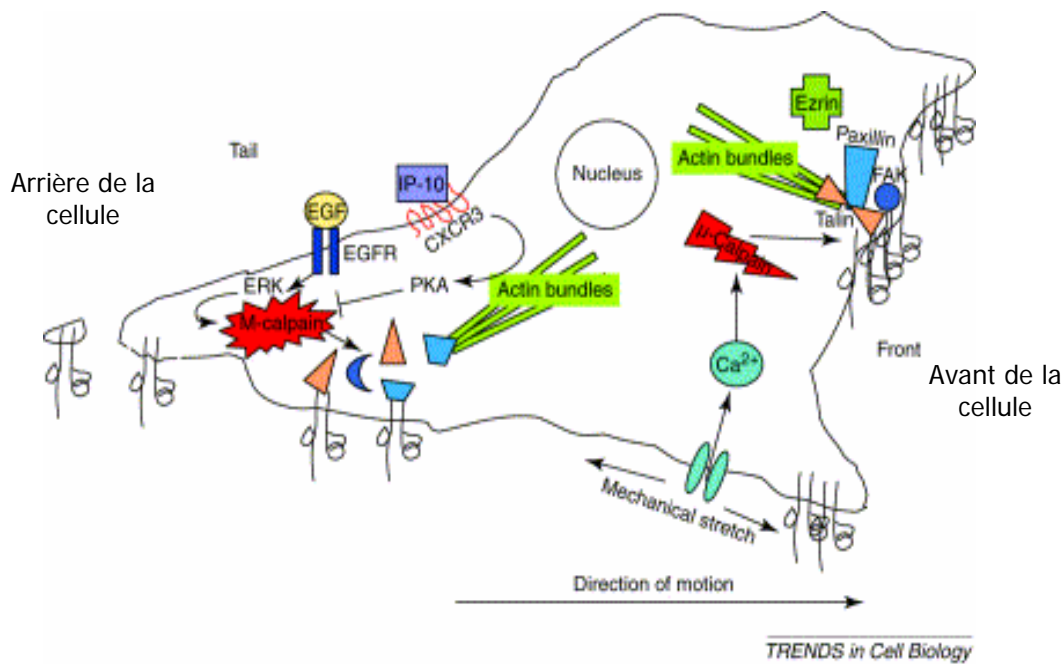


Figure 19 : Modèle d'action des calpaïnes ubiquitaires lors de la migration cellulaire (d'après Glading *et al.*, 2002).

Un influx de calcium activerait la μ -calpaïne à l'avant de la cellule (dans le sens de migration). La protéase induirait alors la formation des contacts focaux, permettant l'adhésion de la cellule. A l'arrière de la cellule, la m -calpaïne, régulée par les facteurs de croissance, dégraderait les protéines des contacts focaux, provoquant ainsi la dé-adhésion de la cellule.

3.4. Implication des facteurs de croissance

Des études récentes ont révélé que certains facteurs de croissance (EGF, HGF, VEGF, TGF- β) étaient susceptibles de réguler positivement la migration de différents types cellulaires tels que les fibroblastes, les cellules épithéliales, les kératinocytes ou les cellules de trophoblastes (Glading *et al.*, 2000 ; Lee *et al.*, 2006 ; Wright *et al.*, 2006 ; Zeineldin & Hudson, 2006). L'implication de ces facteurs lors de la migration des myoblastes a été peu ou pas étudiée. Certains facteurs de croissance tels que le HGF et l'EGF seraient également impliqués, *via* la stimulation de la migration, dans l'invasion tumorale (Wells, 2000).

Les voies de signalisation impliquées dans la stimulation de la migration par les facteurs de croissance diffèrent selon les facteurs et les types cellulaires. Les trois voies principales sont la voie ERK/MAPK (*extracellular signal-regulated kinase* / *mitogen activated protein kinase*), la voie PI3K/Akt (ou PKB pour *protein kinase B*) et la voie Smad (Figure 20).

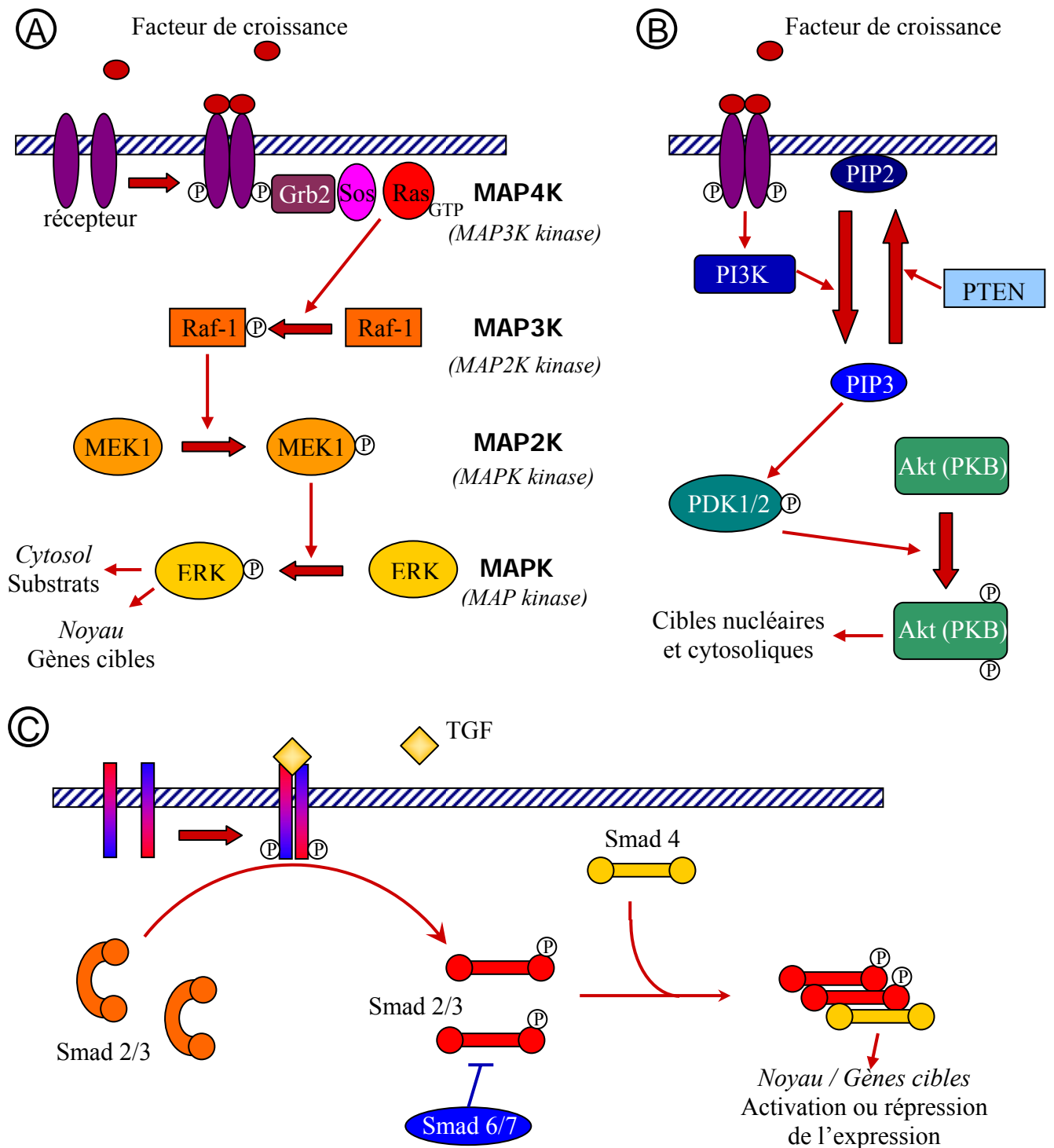


Figure 20 : Représentation schématique des voies de signalisation cellulaire ERK/MAPK (A), PI3K/Akt (B) et Smad (C)

Les voies ERK/MAPK et PI3K/Akt sont des cascades de phosphorylation qui aboutissent à l'activation de ERK et de Akt. Ces derniers agissent ensuite sur leurs cibles dans le noyau ou dans le cytosol. Dans la voie Smad, Smad 2/3 est activé par phosphorylation. La formation d'un complexe avec Smad 4 (co-activateur) est nécessaire pour que Smad 2/3 agisse sur ces cibles nucléaires. Cette voie est réprimée par Smad 6/7.

En ce qui concerne la voie ERK/MAPK, la fixation du facteur de croissance sur son récepteur va activer Ras et entraîner une cascade de phosphorylation aboutissant à l'activation de ERK qui à son tour va phosphoryler ses substrats ou moduler l'expression de ses gènes cibles (Figure 20). Cette voie est utilisée par l'EGF (Glading *et al.*, 2000 ; Wells, 2000) ainsi que par l'insuline, l'IGF-1 et le TGF- β 1 (Kooijman *et al.*, 2003 ; Imamichi *et al.*, 2005 ; Rodriguez-Barbero *et al.*, 2006).

Les facteurs de croissance peuvent également activer la voie PI3K/Akt. La fixation du facteur de croissance sur son récepteur entraîne l'activation de la PI3K. Cette enzyme phosphoryle le PIP2 en PIP3. Ce dernier induit la phosphorylation de PDK1/2 qui à son tour phosphoryle Akt (également appelé PKB ; Figure 20). Celui-ci va alors agir sur ces différents substrats tels que TERT, CREB ou mTOR. Cette voie est activée par l'insuline et les IGFs mais aussi par le TGF- β 1 et l'EGF (Hong & Lee, 1997 ; Jiang *et al.*, 2006 ; Lien *et al.*, 2006).

Quant à la voie Smad, elle est connue comme étant spécifique des TGFs. La fixation de ce facteur sur son récepteur entraîne la phosphorylation de Smad 2/3. Celui-ci peut alors se complexer avec Smad 4 (co-activateur) et réguler l'expression de ses gènes cibles. Smad 2/3 est inhibé par Smad 6/7. Cette voie est notamment impliquée dans l'inhibition de la différenciation des myoblastes par le TGF- β (Zhu *et al.*, 2004).

Ces trois voies de signalisation activées par les facteurs de croissance pourraient agir directement ou indirectement sur les calpaïnes. Ainsi, l'activation de la voie ERK/MAPK par l'EGF aboutit à la phosphorylation de la m-calpaïne sur la sérine 50 par ERK, stimulant son activité (Glading *et al.*, 2000). En outre, l'activation de la voie PI3K/Akt par l'IGF-1 induit une augmentation de l'expression de la myogénine (Xu & Wu, 2000), facteur myogénique capable de moduler l'expression de la m-calpaïne.

Chapitre 3 : Invasion tumorale et rhabdomyosarcomes

Les cellules tumorales peuvent acquérir la capacité de dégrader et de franchir la membrane basale afin d'atteindre les tissus voisins. Ce phénomène (pathologique), appelé invasion tumorale, permet de distinguer les tumeurs bénignes, non invasives, des tumeurs malignes. Les capacités invasives des cellules tumorales cancéreuses leur permettent d'envahir les tissus sains voisins mais également des organes plus éloignés *via* les réseaux lymphatique et sanguin. La formation de tumeurs éloignées (métastases) est la composante la plus délétère du cancer.

1. Caractéristiques de l'invasion tumorale

L'acquisition des capacités invasives, étape clef du développement d'un cancer, permet de distinguer deux phases: une phase pré-invasive et une phase invasive. Au cours de la première, les cellules tumorales perdent les contacts qui les lient les unes aux autres. Elles prolifèrent de manière anormale et anarchique formant une masse tumorale. L'extension de la tumeur reste limitée au compartiment épithélial d'origine, elle est séparée du reste de l'organisme par la membrane basale. On parle alors de cancer *in situ* (Figure 21).

La membrane basale constitue le premier rempart à l'expansion tumorale. Cette spécialisation de la MEC est constituée des mêmes composants à savoir de collagène (de type IV), de laminine et de fibronectine. Cette couche protéique de 50 à 200 nm d'épaisseur limite entièrement les structures épithéliales et vasculaires, formant une frontière avec le tissu conjonctif. La phase invasive débute lorsque que les cellules tumorales adhèrent à la membrane basale, *via* des structures d'adhésion particulières telles que les podosomes et les invadopodes. En outre, elles synthétisent de grandes quantités de protéases, notamment des MMP (*matrix metalloproteinase*), pouvant différer selon le type de cancer.

En dégradant les composants de la membrane basale, les protéases facilitent le passage des cellules à travers la matrice lysée. Elles envahissent alors les tissus voisins (Figure 21b). Cette invasion dite locale permet l'extension de la tumeur de l'autre côté de la membrane basale, on parle alors de cancer localisé.

Les tissus sains infiltrés sont progressivement détruits par la tumeur. Cette dernière qui continue à croître, induit l'angiogénèse en sécrétant des facteurs tels que le VEGF. Les cellules tumorales peuvent rejoindre les nouveaux vaisseaux sanguins qui alimentent la tumeur et traverser leur paroi. Elles peuvent également migrer vers des vaisseaux lymphatiques. Les systèmes lymphatique et sanguin vont alors permettre leur dissémination dans tout l'organisme. Puis, les cellules tumorales quittent les vaisseaux (extravasation), atteignant ainsi un nouvel organe (Figure 21). Elles forment ainsi une nouvelle tumeur plus ou moins distante de la tumeur primaire, on parle alors d'invasion et de cancer métastatiques. Certaines études ont également montré que les cellules tumorales peuvent proliférer dans un vaisseau sanguin sans extravasation. La micrométastase formée se retrouve alors dans un vaisseau sanguin et non dans un organe (Al-Mehdi *et al.*, 2000).

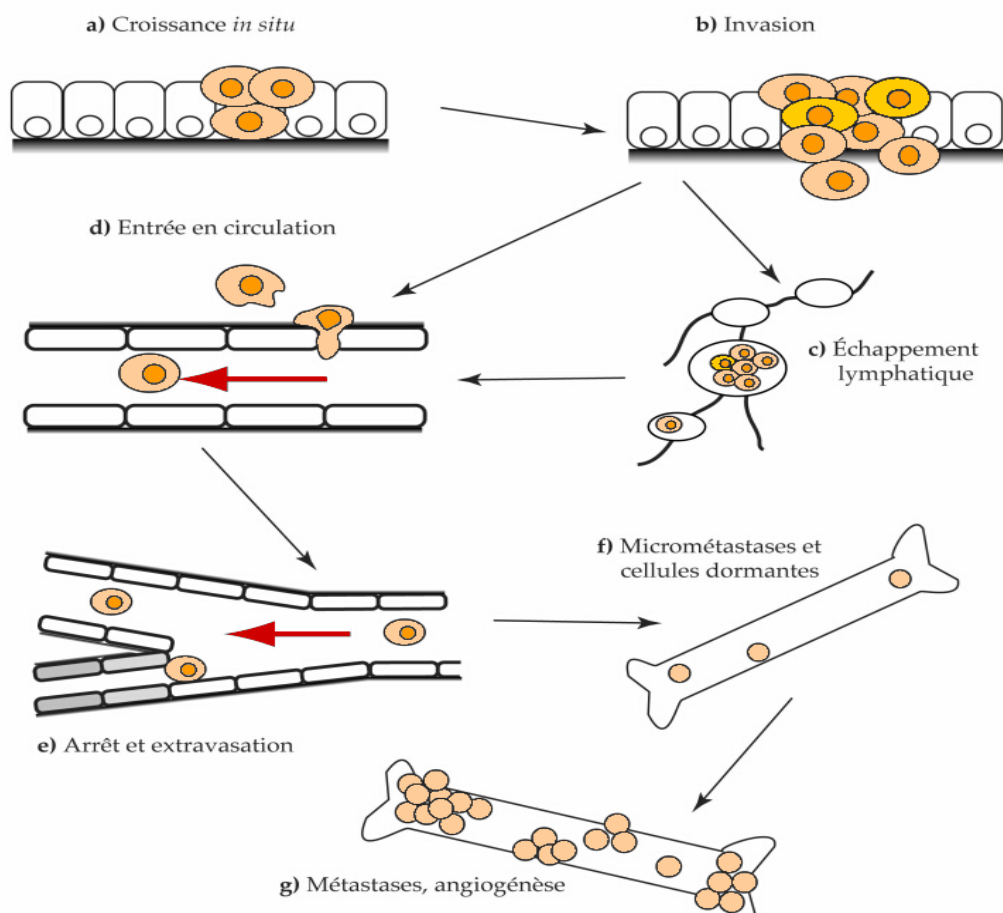


Figure 21 : Les différentes étapes de la progression métastatique (adapté de Steeg, 2003)

Les cellules prolifèrent, formant une masse tumorale (a). Après dégradation de la membrane basale et migration à travers la matrice lysée, la tumeur s'étend aux tissus voisins (b). Les cellules tumorales peuvent rejoindre les systèmes lymphatique et sanguin (c, d). Elles circulent dans l'organisme, quittent le vaisseau (e) et atteignent un nouvel organe (f) où les survivantes forment des métastases (g).

Parmi les cellules ayant atteint un nouvel organe, la plupart ne parviennent pas à former une métastase. Face à un nouvel environnement, certaines cellules tumorales vont se nécroser, d'autres resteront dans un état de latence. Seules 1 % des micrométastases formeront des macrométastases (Wittekind & Neid, 2005). Les cellules latentes sont insensibles à la chimiothérapie et elles sont responsables de l'apparition de métastases tardives, quelques mois ou quelques années après la tumeur primaire (Chambers *et al.*, 2002).

L'invasion tumorale, responsable de l'expansion métastatique des cancers, fait intervenir les phénomènes d'adhésion et de migration cellulaire. L'augmentation de l'adhésion et/ou l'inhibition de la migration de ces cellules pourraient donc limiter l'invasion locale et métastatique des cellules tumorales (Eble & Haier, 2006 ; Tucker, 2006).

1.1. Les podosomes et les invadopodes

Les podosomes et les invadopodes sont des structures membranaires hautement spécialisées nécessaires à la dégradation de la MEC et à la migration des cellules au travers de la matrice lysée. Bien que ces structures présentent une composition proche de celle des plaques d'adhésion, elles possèdent des caractéristiques originales. Ainsi, l'actine polymérisée y est fortement concentrée, formant un réseau complexe et dense (*meshwork*). Une réduction du nombre de structures d'ancrage est également observée et la formation des fibres de stress est limitée (Figure 22). Le fait le plus marquant est la forte concentration de protéases (telles que les MMP) responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire.

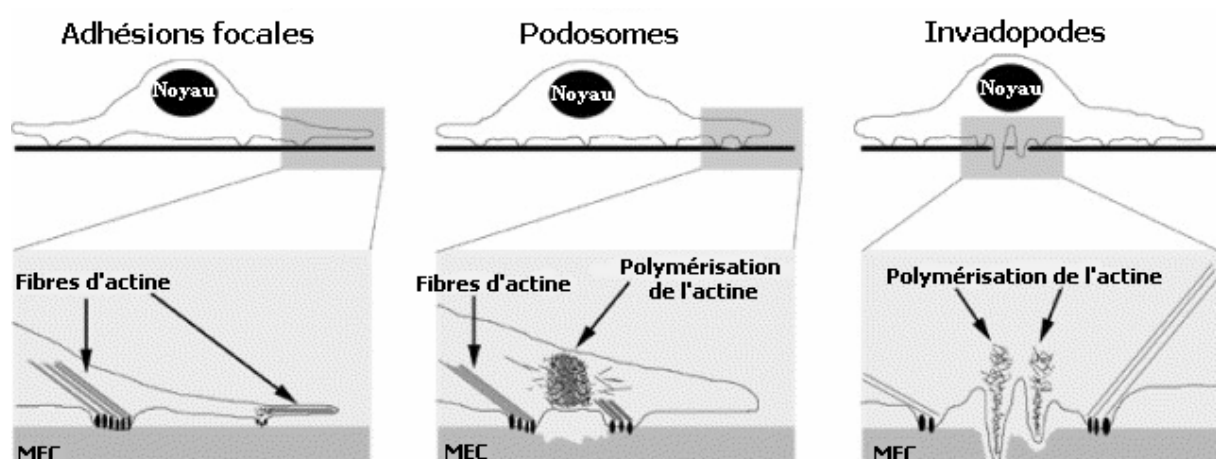


Figure 22 : Représentation schématique de l'organisation des complexes focaux, des podosomes et des invadopodes (adapté de Gimona & Buccione, 2006)

Les intégrines sont représentées en noir, à l'extrémité des fibres d'actine.

Les invadopodes et les podosomes ont été observés pour la première fois en 1994 chez les cellules transformées ou tumorales cultivées sur de la matrice extracellulaire (Kelly *et al.*, 1994). Les invadopodes s'organisent dans la région périnucléaire, proche de l'appareil de Golgi. Des études morphologiques ont mis en évidence de profondes invaginations de la membrane plasmique (8 μm de large, 2 μm de profondeur) et de nombreuses protusions pénétrant dans la MEC (de quelques centaines de nm à quelques μm de long ; Figure 22) (Baldassarre *et al.*, 2003). Chez les podosomes, présents dans les expansions membranaires (Ayala *et al.*, 2006 ; Figure 22), ces modifications morphologiques sont absentes, leur morphologie étant plutôt apparentée à celle des complexes focaux.

La morphologie et la localisation de ces deux types de structures suggèrent une intervention des podosomes au cours de l'adhésion et la migration des cellules tumorales et une implication des invadopodes dans l'invasion. Toutefois, des études récentes ont souligné, d'une part une concentration importante de protéases dans les podosomes et d'autre part une dégradation de la MEC au niveau de ces structures (Burgstaller & Gimona, 2005 ; Osiak *et al.*, 2005). La fonction des podosomes serait donc finalement plus proche de celle des invadopodes. Selon une hypothèse récente, les podosomes seraient les précurseurs des invadopodes. Ils se formeraient quel que soit le substrat sur lequel les cellules sont cultivées (MEC, plastique, verre...). En présence de MEC, ils évolueraient en invadopodes. *A contrario*, en l'absence de MEC ou sur un substrat non approprié, les podosomes n'évolueraient pas (Buccione *et al.*, 2004). La fonction des podosomes serait de « tester » continuellement la MEC. Les invadopodes formés, plus stables (quelques heures contre 2-10 min pour les podosomes, Baldassarre *et al.*, 2003), faciliteraient la « digestion » de la MEC et par conséquent l'invasion des cellules.

L'organisation des invadopodes nécessitent la présence de nombreuses protéines impliquées également dans la formation des complexes focaux telles que les intégrines, des tyrosines kinases, des Rho GTPases (Cdc42 par exemple), la N-WASP et Arp2/3 (Machesky *et al.*, 1994 ; Machesky & Insall, 1998).

1.2. Implication des calpaïnes dans l'invasion tumorale

Un petit nombre d'études récentes suggèrent l'intervention des calpaïnes dans le développement des tumeurs et des métastases, et plus particulièrement au cours de l'invasion tumorale. Carragher et ses collaborateurs ont mis en évidence une augmentation de l'activité des calpaïnes au cours de la transformation des cellules (Carragher & Frame, 2002 ; Carragher

et al., 2004). Ces résultats ont été confirmés par les travaux de Lakshmikuttyamma et de ses collaborateurs (2004) rapportant une surexpression de la m-calpaïne dans les adénocarcinomes colorectaux humains. L'inhibition de cette isoforme réduit les capacités invasives des cellules tumorales de la prostate et limite la formation de métastases (Mamoune *et al.*, 2003). L'hypothèse d'une implication importante des calpaïnes dans l'invasion tumorale s'appuie sur les observations suivantes : les calpaïnes participent à la formation des complexes focaux dont la composition est proche de celles des podosomes et des invadopodes. La formation de ces structures nécessite une importante polymérisation de l'actine, *via* les GTPases, phénomène régulé par les calpaïnes lors de l'adhésion et de la migration. En outre, l'invasion est dépendante de la sécrétion de protéases capables de dégrader la MEC. Cette dégradation pourrait impliquer le système protéolytique calcium-dépendant *via* l'action extériorisée de la m-calpaïne (Dourdin *et al.*, 1997). Si cette hypothèse est vérifiée, les calpaïnes pourraient être considérées comme d'importantes cibles thérapeutiques.

2. Les rhabdomyosarcomes

2.1. Caractéristiques générales

Un modèle de cellules tumorales fait l'objet d'études récentes au sein de notre laboratoire. Il s'agit de cellules tumorales dites musculaires. Les unes développent des tumeurs bénignes, ce sont les rhabdomyomes, les autres, les rhabdomyosarcomes (RMS) développent des tumeurs malignes. Ces dernières sont responsables du « cancer du muscle » qui atteint principalement les enfants de moins de 15 ans (87 % des patients ont moins de 15 ans, 65 % ont moins de 6 ans). Ce type de cancer est fréquent chez l'enfant (environ 250 nouveaux cas par an aux États-Unis ; Dagher & Helman, 1999), sa localisation est variable selon l'âge. Il se situe principalement au niveau de la tête et du cou chez les enfants les plus jeunes alors qu'il se développe au niveau des extrémités et du système urogénital chez les adolescents.

Les rhabdomyosarcomes sont des cellules d'origine mésenchymateuse, elles expriment, comme les cellules musculaires saines, les protéines spécifiques du muscle telles que les MRF, l' α -actine, la myosine, la desmine et la myoglobine (Dias *et al.*, 1990 ; Hosoi *et al.*, 1992 ; Parham *et al.*, 1991). L'observation microscopique des rhabdomyosarcomes a permis

de différencier deux types majoritaires de RMS : les rhabdomyosarcomes alvéolaires (ARMS) et les rhabdomyosarcomes embryonnaires (ERMS).

Les ARMS se caractérisent par une forme arrondie petite et dense, leur organisation rappelle celle des alvéoles pulmonaires d'où le terme alvéolaire. Les ARMS représentent 20 % des cancers « musculaires », ils sont principalement diagnostiqués chez les adolescents (extrémités ; Dagher & Helman, 1999).

Les ERMS se caractérisent par une forme plus allongée et une morphologie rappelant les cellules embryonnaires. Ce type tumoral est fréquemment diagnostiqué (53 % des cas), notamment chez les enfants les plus jeunes au niveau de la tête et du cou. Ce type de RMS touche également le système urogénital (ERMS dans 80 % des cas).

Trois autres types de RMS sont également observés. Ils sont beaucoup plus rares et sont principalement des variants des deux types précédemment décrits. Il s'agit des RMS alvéolaires solides (variants des ARMS), des RMS leiomyomateux (variants des ERMS, tissus paratesticulaires) et des RMS « botryoidaux » (*botryoidal rhabdomyosarcoma* ; variants des ERMS ; rate et vagin ; 6 % des cas).

2.2. Caractéristiques génétiques

La plupart des cas de RMS apparaissent de façon sporadique, toutefois il existe des syndromes familiaux associés à cette maladie tels que le syndrome de Li-Fraumeni (LFS). Ce syndrome est caractérisé par une mutation de la protéine p53 qui favorise l'apparition de différentes tumeurs et notamment des RMS chez les enfants très jeunes (âge inférieur à 3 ans). Dans la majorité des cas, le développement des RMS est dû à des altérations génétiques non héréditaires, différentes selon le type de RMS.

Les ARMS se caractérisent par une translocation des bras longs des chromosomes 2 et 13 (Figure 23). Cette translocation $t(2;13)(q35;q14)$ fusionne les gènes codant pour PAX3, facteur connu pour réguler la transcription de certains gènes au cours du développement, et FKHR, facteur de transcription de la famille *forkhead* (Turc-Carel *et al.*, 1986 ; Shapiro *et al.*, 1993). Le facteur de transcription résultant de la fusion des deux gènes régulerait de façon aberrante l'expression de certains gènes, conférant ainsi le phénotype ARMS. Une seconde translocation similaire a également été observée dans les ARMS entre les chromosomes 1 et 13. Cette translocation $t(1;13)(p36;q14)$, observée chez les patients les plus jeunes au niveau des extrémités, fusionne les gènes *PAX7* et *FKHR*.

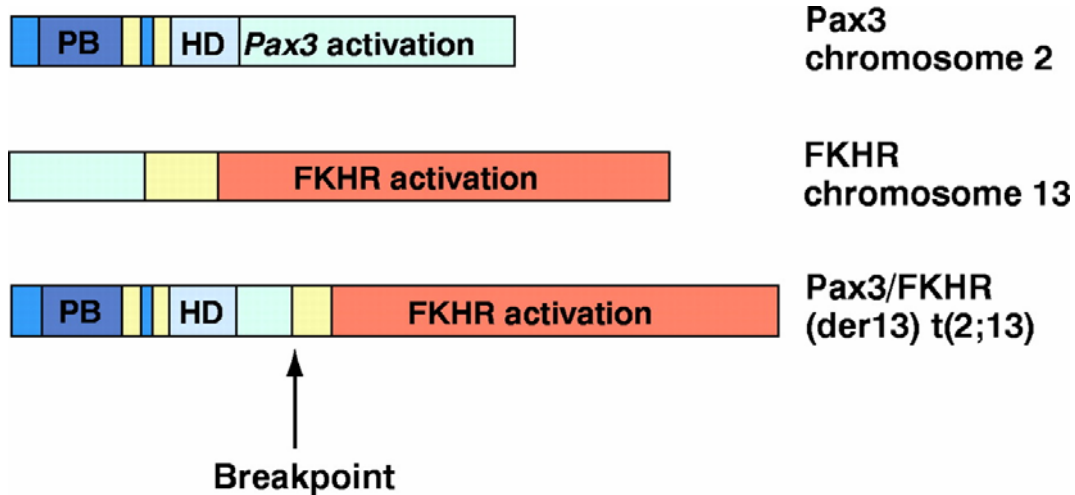


Figure 23 : Structure des gènes *PAX3* et *FKHR* ainsi que du produit de fusion *PAX3/FKHR* dû à la translocation t(2 ;13)(q35 ;q14), caractéristique des ARMS (d'après Dagher & Helman, 1999)

PB : paired box ; *HD* : homeodomain ; *FKHR* : forkhead ; La flèche et l'annotation Breakpoint indique le point de fusion entre les deux gènes.

Les altérations génétiques responsables de l'apparition des ERMS sont très différentes. Il s'agit principalement d'une perte d'hétérozygotie (LOH : *loss of heterozygosity*) au locus 11p15 dont la conséquence est une perte de l'information génétique maternelle et une duplication de l'information génétique paternelle (Scrable *et al.*, 1989). Ce locus du chromosome 11 correspond au gène codant pour l'IGF-2. Dans des conditions normales, l'expression de l'allèle maternel de ce gène est réprimée et seul l'allèle paternel s'exprime. Dans le cas du LOH, il y a deux allèles paternels ce qui conduit à une surexpression d'IGF-2. Cette surexpression peut également être due à une perte de la répression de l'allèle maternel sans duplication de l'allèle paternel, on parle alors de LOI (*loss of imprinting*). Une surexpression de l'IGF-2 est également observée dans les ARMS. Plusieurs études ont montré que l'IGF-2 jouerait un rôle crucial dans la croissance dérégulée de nombreuses tumeurs et notamment dans celle des RMS (El Badry *et al.*, 1990).

Dans ces cellules tumorales, la voie de signalisation de l'IGF-1 est également fortement perturbée. Normalement, l'ajout de ce facteur de croissance entraîne l'activation de la voie PI3K/Akt qui conduit à une augmentation de l'expression de la myogénine. Dans le cas des ERMS, la voie PI3K/Akt, activée par l'IGF-1, ne parvient plus à stimuler l'expression de la myogénine. La cause exacte de cette perturbation reste actuellement inconnue, elle pourrait se situer en aval de la protéine Akt (Xu & Wu, 2000).

Les rhabdomyosarcomes se caractérisent également par une ploïdie anormalement élevée, les ERMS sont généralement tétraploïdes tandis que les ARMS présentent une hyperploïdie (Stuart & Radhakrishnan, 2004).

Comme de nombreuses cellules cancéreuses, les RMS possèdent des capacités invasives importantes. Une surexpression de l'oncogène MET, codant pour le récepteur au HGF, rendrait ces cellules plus sensibles à ce facteur, connu pour être capable de stimuler la migration et l'invasion des cellules. L'expression de ce récepteur, normalement absent dans les cellules musculaires matures, conférerait aux RMS les propriétés migratoires et invasives des myoblastes embryonnaires (Ferracini *et al.*, 1996).

2.3. Développement métastatique des RMS

La présence de métastases est observée dans moins de 25 % des cas de RMS nouvellement diagnostiqués. Ce pourcentage varie selon la localisation de la tumeur et selon le type de RMS. Il semble que les ARMS (au niveau des extrémités) s'étendent plus facilement aux nodules lymphatiques que les ERMS (au niveau du cou et de la tête) (Lawrence *et al.*, 1988). Les RMS métastatiques atteignent le plus fréquemment les poumons ainsi que les os, la moelle osseuse et les nodules lymphatiques. Les organes viscéraux sont rarement atteints.

Les patients pourvus de RMS sont classés en quatre groupes selon différents critères dont la présence ou l'absence de métastases. Les traitements varient selon ces groupes et reposent sur la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie. La chirurgie seule est insuffisante pour soigner ce type de cancer (taux de guérison de 20 %). Le taux de guérison varie également selon le stade de la maladie. Il peut atteindre 60 à 70 % si le cancer est non métastatique et moins de 20 % si des métastases sont détectées. Ce faible taux de guérison, malgré une thérapie agressive montre à quel point il est important de bloquer la formation de métastases notamment en inhibant l'invasion tumorale.

Les données présentées dans cette partie introductive mettent en évidence l'importance du rôle joué par les calpaïnes ubiquitaires et leur inhibiteur endogène au cours des phénomènes d'adhésion et de migration des cellules myogéniques. Les calpaïnes et la calpastatine seraient également impliquées dans l'invasion des tissus sains par les cellules tumorales, phénomène hautement pathologique responsable de la dissémination métastatique. Bien que les rôles des calpaïnes dans ces phénomènes étroitement liés soient maintenant mieux compris, de nombreuses questions restent encore à élucider :

➤ Quel est le rôle de chacune des calpaïnes ubiquitaires lors de l'adhésion et de l'étalement des cellules myogéniques ? Comment interviennent ces enzymes au cours de ces phénomènes ?

➤ L'activité des calpaïnes est-elle susceptible d'être stimulée par des facteurs de croissance ? Si c'est le cas, quelles sont les voies de signalisation impliquées dans la régulation des calpaïnes et corrélativement lors de la migration des myoblastes ?

➤ Les calpaïnes et la calpastatine sont-elles des acteurs majeurs de l'invasion tumorale des rhabdomyosarcomes ? Peut-on limiter les capacités invasives de ces cellules tumorales musculaires en agissant sur le système protéolytique calcium-dépendant comme l'ont montré un petit nombre de travaux réalisés sur d'autres types de cancer ?

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 :
Implication des calpaïnes ubiquitaires dans
l'adhésion et l'étalement des cellules myogéniques

Article 1 : Myoblast attachment and spreading are regulated by different patterns by ubiquitous calpains.

Germain Mazères, Ludovic Leloup, Laetitia Daury, Patrick Cottin, and Jean-Jacques Brustis. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 63: 193-207 (2006).

L'adhésion et l'étalement cellulaire sont deux phénomènes biologiques majeurs qui dépendent de la formation de complexes protéiques autour des intégrines. Ces complexes appelés plaques d'adhésion ou contacts focaux, lient indirectement le cytosquelette d'actine à la MEC, permettant ainsi la fixation de la cellule à la matrice. L'adhésion cellulaire est impliquée plus particulièrement dans la migration des myoblastes, elle-même nécessaire à la formation des myotubes. Une dérégulation des forces d'adhésion peut entraîner une forte réduction de la vitesse de migration cellulaire (Cox & Huttenlocher, 1998).

Les résultats obtenus par Kulkarni *et al.* (1999) et par Glading *et al.* (2002) mettent en évidence une possible implication des calpaïnes, et plus particulièrement de la μ -calpaïne dans les phénomènes d'adhésion et d'étalement cellulaire. En effet, l'inhibition des calpaïnes conduit à une réduction du nombre de fibres de stress et de plaques d'adhésion. *A contrario*, la surexpression de la μ -calpaïne induit une augmentation du nombre de plaques d'adhésion et de fibres d'actine, entraînant un étalement excessif des cellules (Kulkarni *et al.*, 1999). Selon l'hypothèse de Glading (2002), la μ -calpaïne serait localisée à l'avant de la cellule où elle régulerait ces phénomènes en agissant sur les GTPases de la famille Rho (Rac, RhoA). Toutefois ces données obtenues sur des types cellulaires fibroblastiques pourraient être différentes chez les myoblastes dont l'activité et les processus migratoires sont sensiblement différents. En outre, elles n'apportent aucun renseignement sur une éventuelle implication de la m-calpaïne.

Le but de ce travail consiste à appréhender le rôle de chacune des deux isoformes au cours de l'adhésion et de l'étalement cellulaire. Dans un premier temps, des tests d'adhésion et d'étalement ont été réalisés en utilisant des myoblastes sous-exprimant la μ -calpaïne, la m-

calpaïne ou les deux isoformes (stratégie antisens). La morphologie et l'organisation des cytosquelettes d'actine et de tubuline des cellules ont été étudiées par microscopie confocale. Les mêmes types d'investigation ont été réalisés sur des myoblastes sous-exprimant MARCKS (stratégie antisens). Selon les travaux de Disatnik *et al.* (2004), cette protéine, substrat des calpaïnes ubiquitaires, serait impliquée dans l'adhésion et l'étalement cellulaire.

Pour une meilleure compréhension du rôle et du mode d'action de la μ - et de la m-calpaïne à l'échelle moléculaire, il devenait primordial de localiser ces enzymes et d'identifier de nouveaux substrats. Pour cela, des observations immunohistochimiques et des études protéomiques ont été réalisées. Les substrats potentiels ont été identifiés en comparant les profils protéiques de myoblastes témoins et de myoblastes surexprimant l'inhibiteur endogène des calpaïnes, la calpastatine.

Principaux résultats :

✓ Les deux calpaïnes ubiquitaires sont impliquées dans l'adhésion des myoblastes. En effet les traitements antisens dirigés contre la μ -calpaïne ou contre la m-calpaïne induisent une inhibition de l'adhésion des myoblastes. Toutefois, l'inhibition de l'expression de la μ -calpaïne provoque une réduction significative de l'adhésion après 60 minutes de culture tandis que la réduction induite par l'inhibition de la m-calpaïne n'est significative qu'après 180 minutes. L'expression de la m-calpaïne compenserait l'inhibition de la μ -calpaïne dans les 60 premières minutes de culture alors que la μ -calpaïne serait capable de compenser l'inhibition de la m-calpaïne à plus long terme.

✓ Les deux calpaïnes joueraient un rôle important au cours de l'étalement des myoblastes, l'inhibition de leur expression réduisant fortement le taux d'étalement. Toutefois, contrairement aux résultats rapportés pour l'adhésion, ceux obtenus au moment de l'étalement montrent que les deux calpaïnes seraient requises pour qu'il y ait un étalement normal des myoblastes.

✓ L'inhibition de l'expression de l'une ou des deux calpaïnes ubiquitaires entraîne une désorganisation du cytosquelette d'actine ainsi que des modifications morphologiques importantes. Ainsi, alors que les myoblastes non traités (témoins) présentent une forme allongée et un cytosquelette d'actine organisé en fibres de stress parallèles, les cellules dont l'expression de la μ -calpaïne ou de la m-calpaïne est inhibée présentent une morphologie

arrondie, sans organisation axiale, avec des fibres de stress formant un anneau périphérique. L'inhibition des deux isoformes entraîne une désorganisation totale du cytosquelette d'actine et une importante réduction du nombre de fibres de stress. Le cytosquelette d'actine étant impliqué dans l'adhésion et l'étalement de ces cellules, les calpaïnes pourraient réguler ces phénomènes en contrôlant la polymérisation des fibres d'actine. *A contrario*, l'inhibition de l'expression des calpaïnes n'a aucun effet sur l'organisation des microtubules.

✓ L'inhibition de l'expression de MARCKS n'a aucun effet sur l'adhésion, l'étalement et l'organisation des microtubules. Par contre, cette réduction entraîne une réorganisation du cytosquelette d'actine, les fibres de stress étant plus nombreuses et parallèles sur toute la longueur de la cellule. MARCKS pourrait donc intervenir dans la polymérisation de l'actine.

✓ Les deux calpaïnes ubiquitaires présentent une localisation différente. La μ -calpaïne se concentre dans la région périnucléaire tandis que la m-calpaïne est plus particulièrement présente dans les projections membranaires. Ces localisations différentes suggèrent des rôles distincts de ces deux protéases au cours de l'adhésion et de la migration des myoblastes.

✓ La comparaison des données obtenues en protéomique concernant les myoblastes témoins et ceux surexprimant la calpastatine a permis d'identifier 15 spots dont l'intensité varie de plus de 50 %. Parmi les 15 protéines, 13 ont une expression plus forte dans les cellules surexprimant la calpastatine. Ces substrats potentiels des calpaïnes sont classés en trois catégories : les protéines métaboliques, les protéines de structure (dont la vimentine, la tropomyosine α -4 et l' α -crystalline) et les autres.

Les résultats obtenus suggèrent que les deux calpaïnes ubiquitaires possèdent des rôles distincts. Elles interviendraient dans la régulation de l'adhésion et de l'étalement des myoblastes, très probablement en agissant sur le cytosquelette d'actine. Certains substrats potentiels identifiés par analyse protéomique tels que la vimentine, Hsp70 ou la tropomyosine α -4, pourraient également être impliqués dans ce phénomène.

Myoblast Attachment and Spreading Are Regulated by Different Patterns by Ubiquitous Calpains

Germain Mazères, Ludovic Leloup, Laetitia Daury,
Patrick Cottin, and Jean-Jacques Brustis*

*Laboratoire Biosciences de l'Aliment, ISTAB USC-INRA 2009,
Talence Cedex, France*

The calcium-dependent proteolytic system is a large family of well-conserved ubiquitous and tissue-specific proteases, known as calpains, and an endogenous inhibitor, calpastatin. Ubiquitous calpains are involved in many physiological phenomena, such as the cell cycle, muscle cell differentiation, and cell migration. This study investigates the regulation of crucial steps of cell motility, myoblast adhesion and spreading, by calpains. Inhibition of each ubiquitous calpain isoform by antisense strategy pinpointed the involvement of each of these proteases in myoblast adhesion and spreading. Moreover, the actin cytoskeleton and microtubules were observed in transfected cells, demonstrating that each ubiquitous calpain could be involved in the actin fiber organization. C2C12 cells with reduced μ - or m-calpain levels have a rounded morphology and disorganized stress fibers, but no modification in the microtubule cytoskeleton. Antisense strategy directed against MARCKS, a calpain substrate during C2C12 migration, showed that this protein could play a role in stress fiber polymerization. A complementary proteomic analysis using C2C12 cells over-expressing calpastatin indicated that two proteins were under-expressed, while six, which are involved in the studied phenomena, were overexpressed after calpain inhibition. The possible role of these proteins in adhesion, spreading, and migration was discussed. *Cell Motil. Cytoskeleton* 63:193–207, 2006. © 2006 Wiley-Liss, Inc.

Key words: ubiquitous calpain; adhesion; spreading; myoblast; antisense

INTRODUCTION

The calcium-dependent proteolytic system is a large family of well-conserved proteases. This system consists of tissue-specific and ubiquitous proteases. The ubiquitous calpains, μ - and m-calpain, are heterodimeric enzymes consisting of a distinct 80 kDa catalytic subunit (coded by *capn1* and *capn2*, respectively) and a common 30 kDa regulatory subunit (coded only by *capn4*) [Goll et al., 2003]. Calpain activity is regulated by many factors. On the one hand, they are activated in vitro by approximately micromolar and millimolar calcium concentrations for μ -calpain and m-calpain, respectively. Autoproteolytic cleavage [Glading et al., 2000; Cottin et al., 2001; Wendt et al., 2004], phospholipid binding [Tompa et al., 2001], myogenic factors [Dedieu et al., 2003a], and phosphorylation via the ERK/MAP pathway

[Glading et al., 2000] induce activation of calpain activity. On the other hand, a decrease in calpain activity seems to be linked to the presence of calpastatin, their endogenous inhibitor, [Wendt et al., 2004] or phospho-

Contract grant sponsor: Association Française contre les Myopathies; Contract grant number: AFM-9235.

*Correspondence to: Jean-Jacques Brustis, Laboratoire Biosciences de l'Aliment, ISTAB USC-INRA 2009, Avenue des Facultés, 33405 Talence Cedex, France.
E-mail: jj.brustis@tpbcm.u-bordeaux1.fr

Received 3 August 2005; Accepted 15 December 2005

Published online 22 February 2006 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).
DOI: 10.1002/cm.20116

rylation by Protein Kinase A [Shiraha et al., 2002]. At present, the calpain system is known to be involved in many physiological events, such as long term potentiation [del Cerro et al., 1994], cell cycle [Raynaud et al., 2004], apoptosis [Squier and Cohen, 1997], and muscular differentiation [Brustis et al., 1994; Balcerzak et al., 1995; Dourdin et al., 1997]. Concerning muscle differentiation, many studies show the critical roles of calpain during the early steps of myogenesis, e.g. myoblast fusion into myotubes [Balcerzak et al., 1995; Dourdin et al., 1997; Temm-Grove et al., 1999] and myoblast migration [Dedieu et al., 2003b, 2004]. As the calpain system is implicated in many processes, deregulation of calpain activity leads to a number of pathologies, known as calpainopathies, including cataract [Nakamura et al., 2000], type II diabetes [Sreenan et al., 2001], neurodegenerative diseases [Saito et al., 1993; Mouatt-Prigent et al., 1996], and muscular dystrophies [Richard et al., 1995; Spencer et al., 1995].

Cell migration is involved in many events such as tumoral angiogenesis, immune response, wound healing, and embryonic development. Cell migration requires the coordination of several cellular processes, as described by Lauffenburger and Horwitz [Lauffenburger and Horwitz, 1996]. Firstly, membrane projections occur, leading to the formation of focal contacts between the leading edge of the cell and the extracellular matrix (ECM) (adhesion of the cell), lastly de-adhesion of the focal complexes at the rear of the cell enable traction of the soma. The formation of protrusions depends on cytoskeleton dynamics. It has been reported that the actin cytoskeleton is the cellular engine that drives cell motility [Lambrechts et al., 2004]. Indeed filopodia and lamellipodia are sustained by actin bundles or networks, as described in the axon growth cone [Svitkina et al., 2003] or fibroblasts [Strasser et al., 2004]. Furthermore, microtubules contribute to the extension of the membrane at the leading edge of the cell [Bretscher, 1996] and stabilize contacts between the cell and the ECM [Etienne-Manneville, 2004].

Recent studies have shown the role played by ubiquitous calpains in cell migration. Authors have postulated that calpains, localized at focal adhesion, may proteolyze proteins involved in the adhesion phenomenon, such as paxillin, α -actinin, desmin, vimentin, talin, FAK (focal adhesion kinase), and the cytosolic domains of β 1– β 3 integrins [Goll et al., 2003]. Moreover, we have observed that calpain inhibition induces a significant accumulation of MARCKS [Myristoylated Alanine Rich C Kinase Substrate) [Dedieu et al., 2003b, 2004]. MARCKS, a calpain substrate localized at the focal adhesion, is able to link actin fibers [Hartwig et al., 1992]. In addition, MARCKS is known to regulate integrin-mediated muscle-cell spreading [Disatnik et al., 2004] and muscle-cell migration, as its inhibition leads to an increase in myoblast motility [Dedieu et al., 2003b].

Recently, we have used treatment with calpain inhibitors and over-expression of calpastatin in myoblasts to demonstrate that ubiquitous calpains strongly regulate myoblast migration through adhesion and actin cytoskeletal organization [Dedieu et al., 2004].

Distinct roles of the calcium-dependent proteases were described. Indeed, Franco et al. showed the implication of m-calpain in protrusion formation and lamellipodial dynamics [Franco et al., 2004], while Serrano and Devine have suggested that μ -calpain is involved in platelet spreading and attachment [Serrano and Devine, 2004]. Each calpain isoform may play a specific role in myoblast migration [Dedieu et al., 2003b] but the specificity of each protease is still unclear.

Taking these results into account, the aim of this study was to clarify the roles of the ubiquitous calpains and MARCKS during myoblast migration, in particular the adhesion and spreading processes. Myoblast adhesion and spreading rates were measured after antisense oligonucleotide treatments directed against μ - and m-calpain or MARCKS. The cytoskeletal organization of actin fibers and microtubules and the localization of calpains were carefully observed by confocal microscopy. Finally, potential calpain substrates during these phenomena were determined by proteomics. Our main results demonstrate that calcium-dependent proteases regulate myoblast adhesion and spreading. Moreover we show that μ - and m-calpain may play complementary roles in actin cytoskeleton organization, probably by different pathways due to their distinct localization leading to various accessibilities to potential substrates.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and Antibodies

Anti- β -tubulin [Santa-Cruz), anti m-calpain [Santa-Cruz) and anti- μ -calpain [Chemicon) antibodies were raised in rabbit, goat and mouse respectively. Secondary anti-rabbit-FITC-conjugated, anti-goat-FITC-conjugated antibodies and anti-mouse-rhodamine-conjugated antibodies were purchased from Santa-Cruz.

Chemicals and materials were obtained from the following sources. Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS) and gelatin were from Gibco-Brl. Culture dishes were from Fisher Scientific. Oligofectamine transfection reagent was purchased from Invitrogen, oligomers from Eurogentec. Urea, thiourea and CHAPS were from Amersham Biosciences. All other chemicals were from Sigma-Aldrich.

Cell Cultures and Oligonucleotides Transient Transfections

C2C12 cells were grown under 5% CO₂ atmosphere at 37°C in DMEM supplemented with 10% of FBS until they reach 80% of confluence.

TABLE I. Characteristics of the Antisense Sequences

Name	Sequence	Position
AS μ C	5' <u>TGA</u> CAT CAG TTC CGT AGG <u>CCG</u> 3'	(281–301)
R μ C	5' <u>ACT</u> CGT GGT CAC CCT TGG <u>GAA</u> 3'	
ASmC	5' <u>ATG</u> CGA CCC CAG CCC CTC <u>GCG</u> 3'	(213–233)
RmC	5' <u>ATC</u> CCC GCA CCC CAG GCG <u>GTC</u> 3'	
AS MARCKS	5' <u>CAG</u> GGG ATA GTT <u>CGG</u> C 3'	(115–130)
R MARCKS	5' <u>GCA</u> GGG ATT CGG <u>CGT</u> A 3'	

Underlined nucleotides designate phosphorothioates oligos.

At 80% of confluence, cells were grown in DMEM supplemented with 0.1% of FBS during 12 h. They were then transfected with appropriated oligonucleotides (represented Table I) as described previously [Dedieu et al., 2003b]. Oligonucleotides were transfected using Oligofectamine Reagent (0.5 μ L/cm²) with 300 nM DNA.

Spreading and Attachment Assays

A first culture was realized in order to transfect myoblasts. Thirty-six hours after transfection, cells were trypsinized and stored at -80°C .

For attachment assays, cells were seeded in 96-well dishes at a density of 10^4 cells/cm². At different times, cells were washed three times with PBS (phosphate buffered saline) and fixed with paraformaldehyde 4% (w/v PBS) during 15 min. After 70° ethanol (EtOH) overnight deshydration cells were stained using crystal violet 0.1% (w/v EtOH 20°) during 60 min. The stain was eluted and cells were rinsed twice with PBS.

For spreading assays, the morphology of the cells was observed by optical microscopy, the number of cells presenting visible cytoplasm or not was determined by visual inspection of culture dishes. % of spreading = $100 \times (\text{number of cells with visible cytoplasm} / \text{total number of cells})$.

For attachment assays, dye is extracted using a 50% ethanol solution containing 1% acetic acid during 5 min. Optical density was read at $\lambda = 590$ nm using a microtiter plate reader (Biotek Synergy HT). Results were presented in % of adherent cells as compared to initial seeded cells that represent 100% of attachment.

Confocal Fluorescence Microscopy

C2C12 cells were seeded on gelatin pre-coated coverslips and grown until they reached a confluence close to 80%. The cells were then cultured in DMEM supplemented with 0.1% FBS and transfected as described in a section above. Thirty-six hours after transfection cells were rinsed twice with PBS and fixed 15 min with paraformaldehyde 4% (w/v PBS). Myoblasts were permeabilized with Triton X-100 (1% v/v PBS) during 3 min. Actin was detected using phalloidin-FITC (Fluorescein iso thio cyanate) (1 μ M) during 45 min. Microtubules, m-calpain or μ -calpain were detected using corresponding antibodies (1/100) during 3 h. After

rinsing, myoblasts were incubated with an appropriate secondary antibody coupled to FITC or rhodamine (1/100) during 90 min. After completion of the antibodies or phalloidin incubations, cells were washed three times in PBS and observed under confocal microscopy (Olympus, Fluoview). Quantification of fluorescence was conducted using the software Visiolog 6.

Proteomic Analysis

Two sets of culture were used: C2C12 over-expressing calpastatin and control myoblasts as described previously [Dedieu et al., 2004]. Myogenic cells were seeded in DMEM supplemented with 10% of FBS until they reach 80% of confluence, the medium was then replaced by DMEM supplemented with 0.1% of FBS for 48 h. Total proteins were harvested in lysis buffer (Urea 7 M; Thiourea 2 M; CHAPS 4% w/v; DTT 1% w/v; IPG-buffer 2% v/v). Cell lysates were submitted to a 30 min centrifugation at 10,000g. Protein concentration in the supernatant was determined with PlusOne 2D Quant kit (Amersham Biosciences). Afterwards, the first dimension (IEF) was performed under these following conditions: proteins were solubilized in a rehydration solution (Urea 8 M; Thiourea 1 M; CHAPS 2% w/v; DTT 0.28%; coomassie brilliant blue R-250 0.01% w/v; IPG-buffer 1% v/v). IPG strips, covering a 3–10 pH range, were rehydrated in 330 μ L of this solution containing 600 μ g of proteins during 12 h (sample loading by rehydration). IPG strips were subjected to IEF in an IPGphor (Amersham Biosciences) at 20°C. The following voltage were used: 200 V during 1 h, 500 V during 2 h, 1000 V during 1 h, 1000–8000 V during 0.5 h and 8000 V until 74 kV h were reached. Focused IPG strips were equilibrated twice in the following buffer (Urea 6 M; Tris 50 mM; pH 8.8; glycerol 30% v/v; SDS 2% w/v). For the first incubation 1% (w/v) DTT was added, for second one 5% iodoacetamide (w/v) replaced DTT. After being rehydrated, IPG strips were submitted to the second dimension with the Ettan DALTsix apparatus (Amersham Biosciences). Migration was run at 40 V for 1 h and then run at 40 mA/gel until the run was completed on 11% (w/v) SDS-PAGE as reported by Bouley and coworkers [Bouley et al., 2004]. Fixation of gels

was realized in ethanol 30% (v/v) and orthophosphoric acid 2% (v/v) overnight, then gels were stained during 72 h with coomassie brilliant blue G250 (orthophosphoric acid 2% v/v; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 15% w/v; ethanol 18% v/v; coomassie brilliant blue G250, 0.08% w/v). Finally gels were scanned on an Imagescanner (Amersham Biosciences); spot detection and quantification were realized using Image master software. Spots presenting significant differences over 50% between control cells and over-expressing calpastatin cells were excised with Ettan spot picker (Amersham Biosciences). The spots were digested into tryptic fragments and proteins were identified by MALDI-TOF operate in MS and MS/MS modes.

Statistical Analysis

The statistical significance of the difference between multiple groups was determined using ANOVA. When F was associated with a probability $\alpha < 0.05$, intergroup comparisons were conducted using Student's t -test. Unless indicated, data were expressed as means \pm SEM and were all representative of an average of at least three experiments.

RESULTS

Myoblast Adhesion Is Reduced by Antisense Treatments Against Calpains

Previous studies have demonstrated the efficiency of these calpain antisense strategies. Antisense directed against μ -calpain and antisense directed against m-calpain specifically inhibit by 50% the expression level and the activity of μ - and m-calpain respectively. Moreover, no unspecific inhibition of each isoform was observed during the study [Dedieu et al., 2003b]. As in the case of migration, the random sequences did not interfere with C2C12 adhesion. Figure 1A shows that 300 nM oligomer treatments directed against μ -calpain led to a significant decrease in myoblast adhesion after 60 min in culture. At 120 and at 180 min, the attachment rate is about 57.3 and 64.4% respectively and did not vary significantly between these two stages. According to results presented in Fig. 1B, transfection using oligomers directed against m-calpain had no significant effect before 180 min in culture. At this stage, cell adhesion was reduced by 26.4%. When the activities of both ubiquitous calpains were reduced, there was a decrease in the attachment rate, irrespective of the culture stage (Fig. 1C). Under these conditions, the attachment rate was significantly lower after 10 min in culture, reaching about 55% after 60 min in culture then remaining unchanged.

The Spreading Rate Is Disturbed When Ubiquitous Calpain Expression Is Reduced

To determine whether calpains were involved in myoblast spreading, the cell spreading rate was mea-

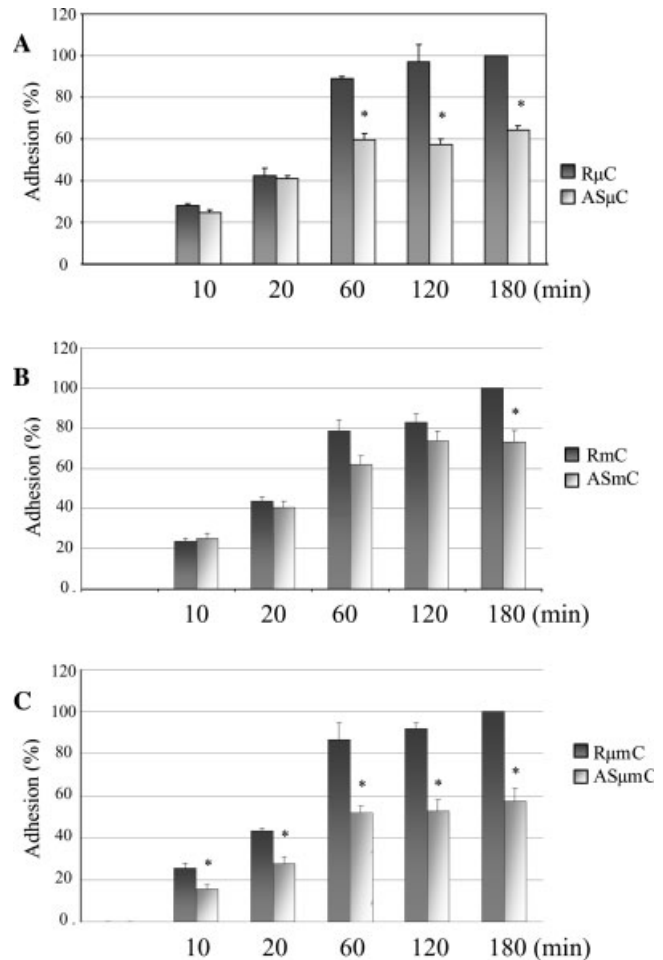


Fig. 1. Myoblast adhesion is reduced when calpain activity is inhibited: Cells were transfected with antisense oligomers directed against μ -calpain (A), m-calpain (B) and both types of antisense (C). After a 36-h culture, myoblasts were harvested and seeded at a concentration of 10^4 cells/cm² in DMEM supplemented with 0.1% of FBS. Cells were fixed using paraformaldehyde 4% at different stages (from 10 to 180 min) and were stained with crystal violet 0.1%. After C2C12 lysis, rates of adhesion were determined by measure of absorbance at 590 nm using a microplate reader. Treated myoblasts adhesion was compared to attachment of C2C12 transfected with appropriated random. R, random; AS, antisense. *Significantly different from control cells ($\alpha < 0.05$).

sured after antisense transfection directed against μ - and m-calpains. As shown in Fig. 2A, μ -calpain inhibition induced a delay and a decrease in the number of spread myoblasts. This decrease is estimated to be 27% after 180 min in culture. In a same way, antisense treatment directed against m-calpain induced a delay and a decrease in spread myoblasts. After 180 min in culture, the inhibition of cell spreading due to m-calpain antisense was estimated to be 38% (Fig. 2B). As shown in Fig. 2C, antisense treatments directed against μ - and m-calpain caused a delay and a decrease in myoblast spreading. It is important to emphasize that C2C12 cells did not present visible cytosol during the first 20 min in culture. In

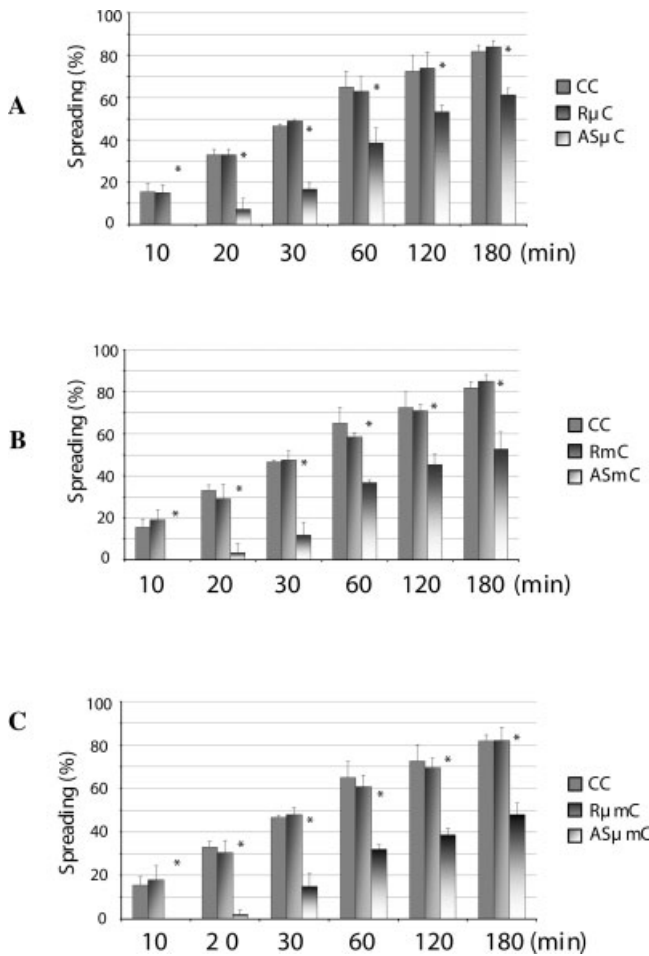


Fig. 2. Myoblast spreading is delayed and reduced when calpain activity is inhibited: Cells were transfected with antisense oligomers directed against μ -calpain (A), m-calpain (B) and both types of antisense (C). After a 36-h culture, myoblasts were harvested and seeded at a concentration of 10^4 cells/cm² in DMEM supplemented with 0.1% of FBS. Cells were fixed using paraformaldehyde 4% at different stages (from 10 to 180 min) and were stained with crystal violet 0.1%. Rates of spreading were measured by determination of the ratio (number of spread cells/number of total cells). Treated myoblasts spreading was compared to attachment of C2C12 transfected with appropriated random. R, random; AS, antisense; CC, control cells. *Significantly different from control cells ($\alpha < 0.05$).

addition, there was a 41.8% inhibition of cell spreading after 180 min in culture.

A Decrease in MARCKS Expression Does Not Affect Myoblast Adhesion and Spreading

The MARCKS protein is considered to be involved in the initial steps of cell adhesion and the later stages of cell spreading [Disatnik et al., 2004]. Attachment and spreading assays using C2C12 transfected with antisense oligomers directed against MARCKS were carried out to ascertain the role of MARCKS in the myoblast adhesion process. It appears from our data, presented in Fig. 3A,

that MARCKS inhibition induced no significant difference in myoblast attachment after 180 min in culture. Moreover, during the 180 min in culture, no significant difference in C2C12 spreading was measured after antisense treatments directed against MARCKS in comparison to C2C12 transfected with appropriate random (Fig. 3B).

A Decrease in Calpain Expression Drastically Alters Cell Morphology and the Actin Cytoskeleton

In order to determine whether calpains were implicated in the actin cytoskeleton organization, C2C12 were transfected with antisense directed against μ - and/or m-calpain and the actin filaments were stained with FITC-conjugated phalloidin. As shown in Fig. 4, control myoblasts had an elongated shape and many membrane projections (large membrane protusions; filopodia and small lamellipodia). In control cells, the actin cytoskeleton and, more particularly, the stress fibers, was organized parallel to the main axis of the cell and sustained the membrane projections. As shown in Figs. 5A and 5B, cells where the activity of only one calpain was reduced presented a rounded morphology, without axial organization. Surprisingly, the stress fibers were organized in a peripheral ring and the C2C12 cells bristled with numerous filopodia. These treatments also induced a drastic reduction in actin fibers in the center of the cell. The filopodia had almost disappeared in myoblasts transfected with antisense directed against μ -calpain and oligomers against m-calpain. The actin fibers had disappeared, mostly in the center of the myoblasts (Fig. 5C).

A Decrease in Calpain Expression Has No Effect on Microtubule Cytoskeleton

The calcium-dependent proteolytic system has been shown to cleave proteins associated with microtubules such as MAP2 (microtubule associated protein 2) [Buddle et al., 2003] or DCLK (Double cortin-like kinase) [Burgess and Reiner, 2001]. These data suggest that microtubule dynamics may be modulated by calpains. We monitored the evolution of the microtubule cytoskeleton in myoblasts after antisense strategy to characterize the phenomena involved in cell adhesion and spreading. As shown in Fig. 6A, microtubules were detected in the whole cytosol of control cells. The FITC-staining was more pronounced around the nucleus, where the centrosome is localized, and decreased towards the periphery of the cell. Moreover, microtubules sustained membrane projections of the cell. Myoblasts transfected with antisense directed against μ - and/or m-calpain, or with the appropriate random, presented no significant difference in microtubule organization, in comparison to the untreated cells, despite the alteration in morphology described in the previous section (Fig. 6B).

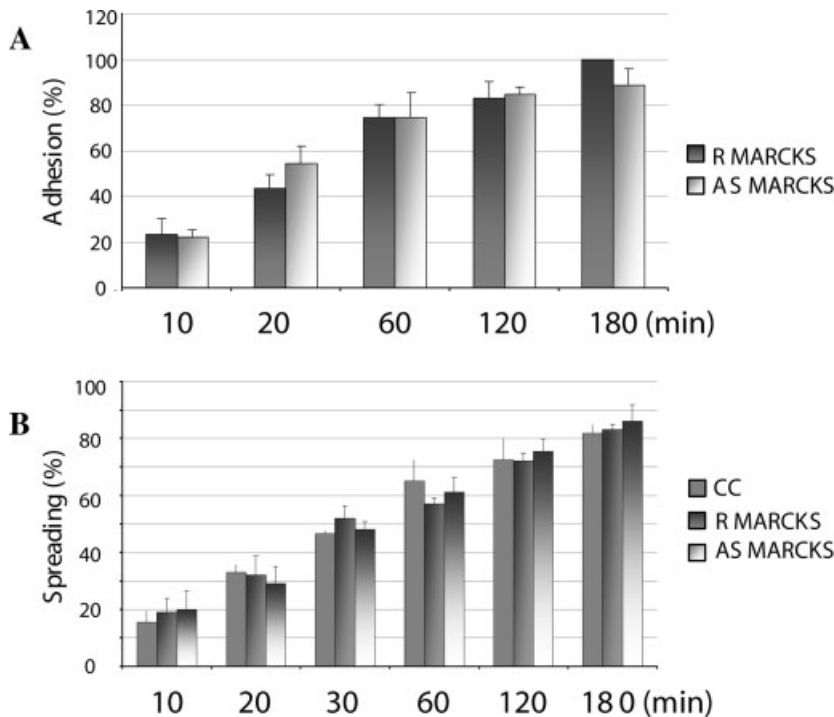


Fig. 3. Myoblast adhesion and spreading remain constant when MARCKS expression is inhibited: Cells were transfected with antisense oligomers directed against MARCKS. After a 36-h culture, myoblasts were harvested and seeded at a concentration of 10^4 cells/cm² in DMEM supplemented with 0.1% of FBS. Cells were fixed using paraformaldehyde 4% at different stages (from 10 to 180 min) and were stained with crystal violet 0.1%. (A) After C2C12 lysis, rates of adhesion were determined by measure of absorbance at 590 nm using a microplate reader. Treated myoblasts adhesion was compared to attachment of C2C12 transfected with appropriated random. (B) Rates of spreading were measured by determination of the ratio (number of spread cells/number of total cells). Treated myoblasts spreading was compared to attachment of C2C12 transfected with appropriated random. R, random; AS, antisense; CC, control cells. *Significantly different from control cells ($\alpha < 0.05$).

A Decrease in MARCKS Expression Has No Effect on the Microtubule Cytoskeleton but Reorganizes Actin Fibers

As previously mentioned, MARCKS is a protein able to link actin. Its involvement in cytoskeleton dynamics during cell migration and spreading has recently been described [Disatnik et al., 2004]. To understand the role of MARCKS in cell adhesion, actin and microtubule cytoskeletons were observed after myoblast transfection with antisense directed against MARCKS. As shown in Fig. 7A, appropriate random treatment did not induce any difference in stress-fiber organization in comparison to untransfected cells. Antisense directed against MARCKS induced an increase in actin filament density. Actin fibers were more numerous and parallel from one end of the cell to the other, aligned with the myoblast axis (Fig. 7B). Moreover, the fluorescence in these myoblasts presented a higher level of fluorescence (34.2%) than in the control myoblasts (Table II).

However, microtubule organization was not disturbed when MARCKS expression decreased significantly (Data not shown).

Localization of Ubiquitous Calpains in Migrating Myoblasts

Ubiquitous calpains were localized in migrating myoblasts to try to explain our previous results. As shown in Fig. 8, calpains were localized in the whole cytosol, but concentrations differed in the various sub-

cellular compartments. μ -calpain was more concentrated around the nucleus and gradually decreased towards the cell periphery, while m-calpain was mainly concentrated in C2C12 membrane projections. These different localizations suggest that μ - and m-calpains play different biological roles during myoblast adhesion and spreading, depending on substrate accessibility.

A Decrease in Calpain Activity Leads to Major Disturbances in the Expression Levels of Proteins Involved in Cytoskeleton Organization

As previously mentioned, calpains mediate cell migration, adhesion, and spreading via proteolysis of many proteins. Spectrin cleavage has already been highlighted in cell de-adhesion [Cuevas et al., 2003], while talin proteolysis has been linked to cell spreading [Franco et al., 2004] and migration [Dourdin et al., 2001]. A proteomic analysis was carried out to complete the list of potential calpain substrates during cell migration, adhesion, and spreading. C2C12 cells over-expressing calpastatin and control cells transfected with the appropriate empty vector were cultured separately. Calpastatin clones overexpress four-fold calpastatin in comparison to control cells and activity of ubiquitous calpains is decreased of 53 and 55% for μ -calpain and m-calpain respectively [Dedieu et al., 2004]. One hundred and thirty four spots were detected under our experimental conditions (Fig. 9). Spot intensities were quantified

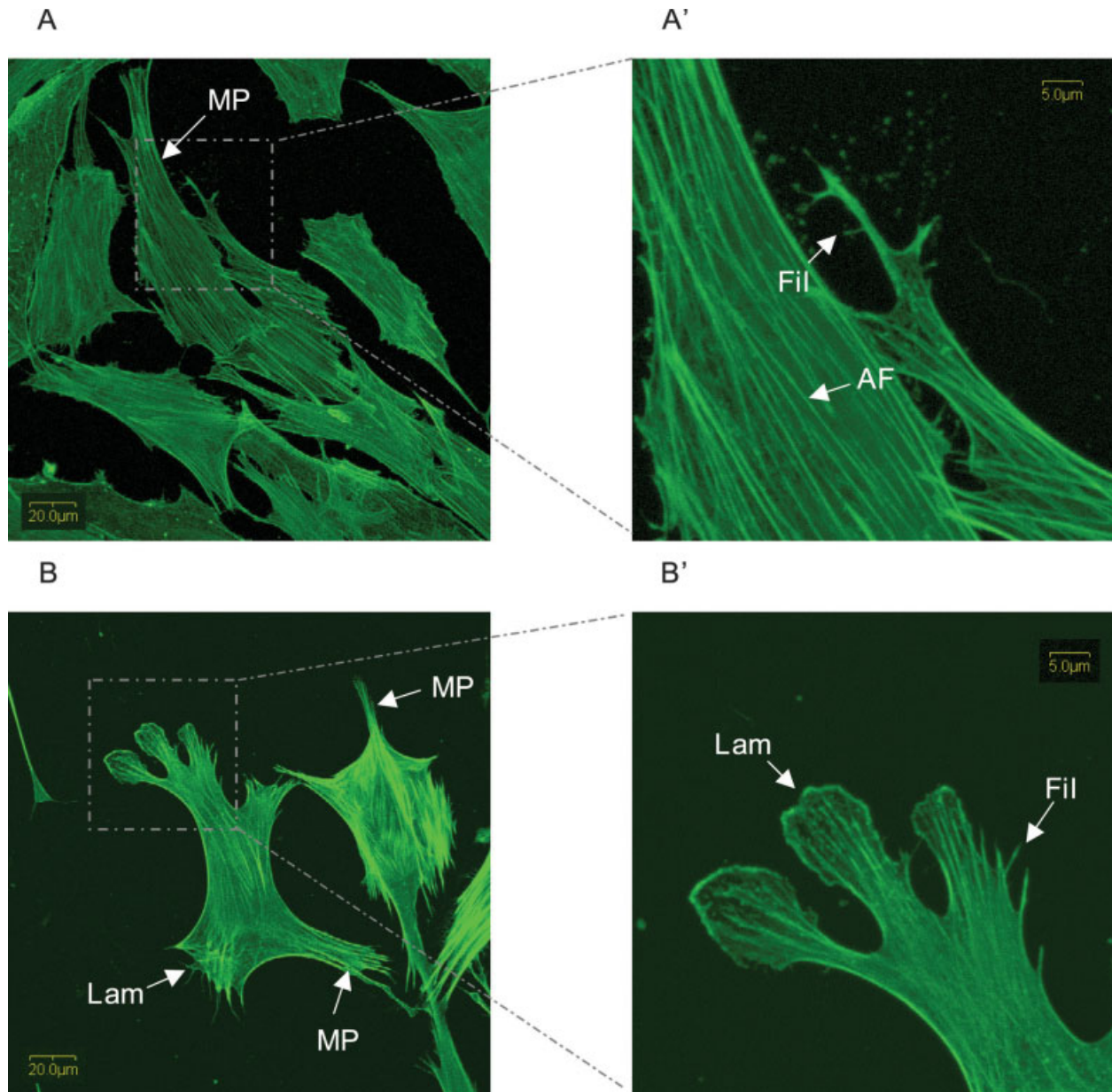


Fig. 4. Stress fiber organization in control C2C12: C2C12 were seeded and cultured in DMEM supplemented with 0.1% FBS during 48 h. After paraformaldehyde fixation, actin cytoskeleton was visualized using FITC-conjugated phalloidin. (A and B) Myogenic cells presented an elongated shape with numerous membrane projections.

Actin fibers (AF) were present in the whole cell, organized in a parallel manner to the axis of the myoblast. Actin fibers sustained membrane projection such as membrane protrusions (MP), lamellipodia (Lam) or filopodia (Fil).

and compared between the two sets of cultures. Only proteins in those spots where intensity varied by over 50% were analyzed. Of the 15 proteins identified, 2 were more strongly expressed in control cells and 13 had a higher expression level in calpastatin clones (Table III). The molecular weights of these proteins ranged from 17.84 (translationally-controlled tumor protein) to 73.528 kDa (Hsp70). They are divided into three classes: metabolic proteins, cell structure proteins, and others (Fig. 10).

DISCUSSION

Inhibition of ubiquitous calpains by antisense strategy led to a decrease in myoblast adhesion and spreading. These results are in agreement with those obtained by Dedieu et al., showing that calcium proteolytic system inhibition by chemical treatments or by over-expression of calpastatin induces defects and delays in myoblast adhesion [Dedieu et al., 2004]. The inhibition of attachment incidental to antisense strategy conducted

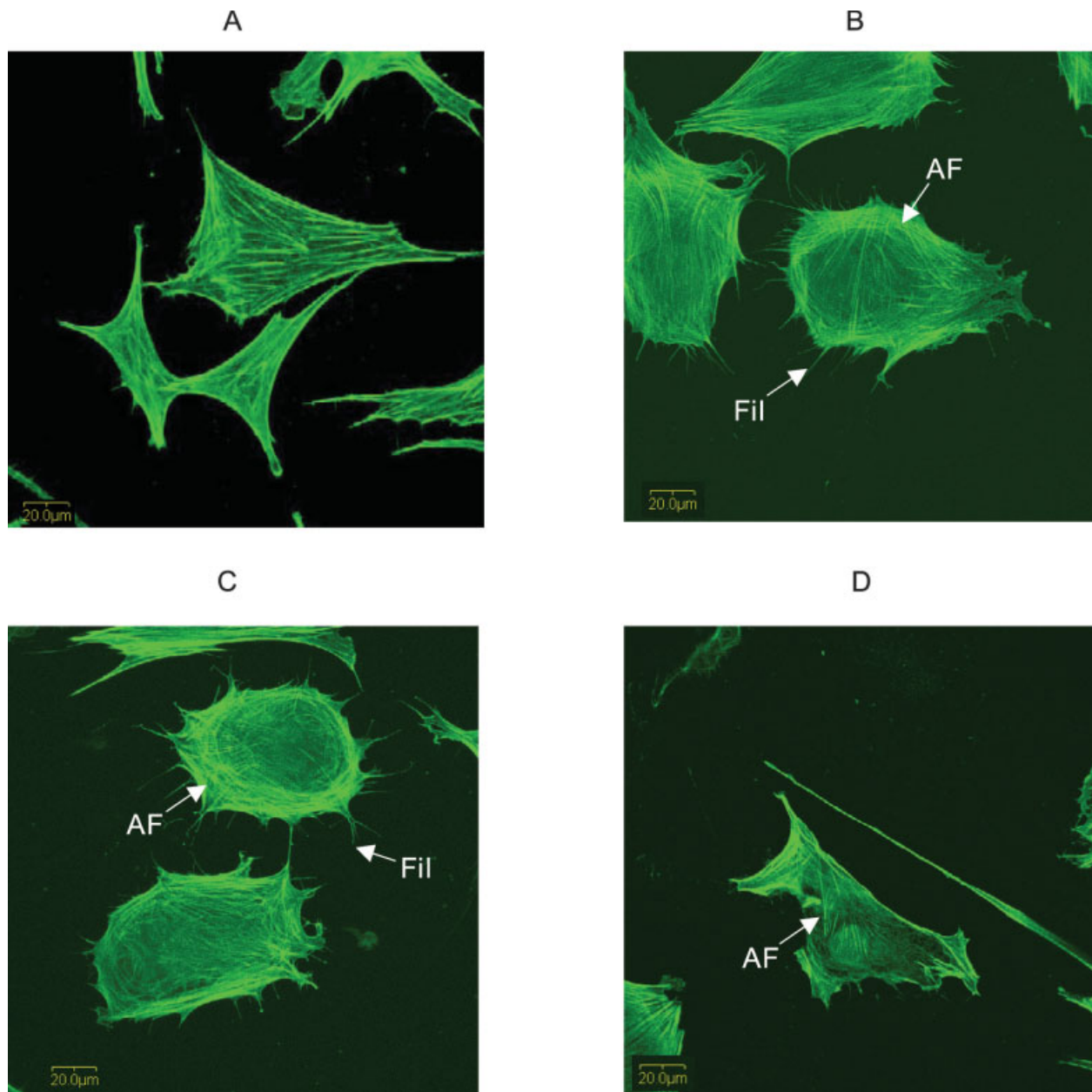


Fig. 5. Inhibition of μ - or m-calpain leads to actin cytoskeleton disorganization: C2C12 were seeded and cultured in DMEM supplemented with 0.1% FBS during 48 h. Then cells were transfected with antisense directed against μ -calpain (B), m-calpain (C), with both types of antisense oligomers (D) or with both types of random sequences (A). After paraformaldehyde fixation, actin cytoskeleton was visualized using FITC-conjugated phalloidin. (B and C) Cells in

against μ - and m-calpain showed that calpain activity is involved in myoblast adhesion. Whereas antisense directed against μ -calpain resulted in a decrease in C2C12 adhesion after 60 min in culture, antisense directed against m-calpain only had a significant effect after 180 min. These results suggested that m-calpain expression may compensate for μ -calpain depletion dur-

which μ - or m-calpain activity was inhibited presented a rounded morphology, without central stress fiber. Nevertheless, some actin fibers remained, organized in a peripheral ring. Furthermore, these myoblasts presented numerous filopodia. (D) Myoblasts transfected with the two types of antisense lost nearly all actin fibers and possessed no more filopodia.

ing the first 60 min in culture and that μ -calpain expression may compensate for m-calpain inhibition in the later stages. Ubiquitous calpains seem to play a redundant role in myoblast early adhesion, i.e. up to 60 min in culture. From this stage, μ -calpain implication is not compensated by m-calpain expression. However, μ -calpain seems to be able to compensate for m-calpain inhibition

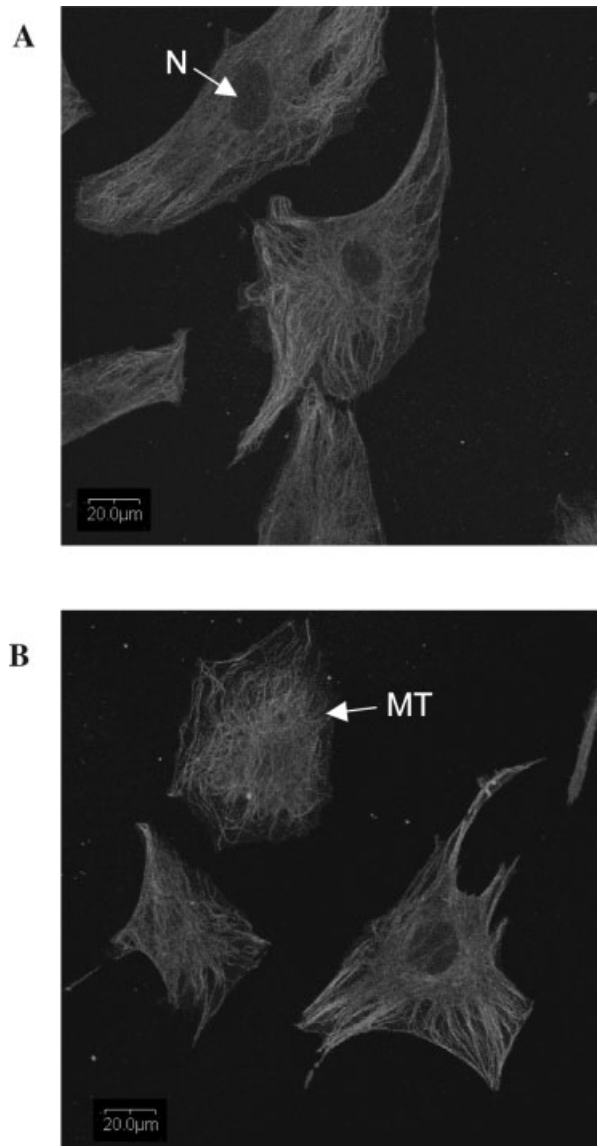


Fig. 6. Microtubules organization is not perturbed by calpain or MARCKS inhibition: (A) Control cells were seeded and cultured in DMEM supplemented with 0.1% FBS during 48 h. After paraformaldehyde fixation, microtubules visualized using anti- β -tubulin antibodies, then using FITC-conjugated secondary antibodies. Control C2C12 presented microtubules (MT) in the whole cell. Their density was high around the nucleus (N) where the centrosome was localized. Microtubules were detectable in membrane projections they sustained. Myoblasts were seeded and cultured 12 h in DMEM supplemented with 0.1% FBS; they were transfected with both antisense directed against μ - and m-calpain (B). Microtubules organization was the same in these cells in comparison to control cells. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

during the first 180 min in culture. An inhibition of myogenic cell spreading was observed from 10 to 180 min in culture after antisense strategy against each ubiquitous calpain. However, inhibition of both isoforms did not induce significantly different spreading compared to that

obtained with antisense treatments directed against either μ - or m-calpain. This result suggests that activity of both calpains is required for normal spreading.

Calpain inhibition seems to regulate cell migration negatively, by inhibiting new focal adhesion formation between the cell and the ECM and destabilizing the cytoskeleton [Potter et al., 1998; Dedieu et al., 2004; Serrano and Devine, 2004]. In this work, we demonstrated that μ - or m-calpain inhibition was sufficient to induce a drastic disturbance in the actin cytoskeleton and the loss of the cell spreading axis. These results indicate that both isoforms of calpain play a pivotal role in organizing stress fibers in the myoblast. Moreover, the expression of one isoform does not seem to offset the involvement of the other isoform. Nevertheless, inhibition of both ubiquitous calpains induces the disappearance of most of the actin fibers, suggesting that μ - and m-calpain act in synergy. Furthermore, a link between actin cytoskeleton disruption and a decrease in cell spreading and adhesion has been demonstrated in macrophages [Dadsetan et al., 2004]. These data support the hypothesis that calpains, by regulating stress fiber organization, also regulate cell adhesion and spreading. Experiments on the putative role of the calcium-dependent proteolytic system in microtubules show that μ - and/or m-calpain inhibition does not induce any changes in microtubule organization. Our results have to be taken into consideration, even if previous experiments emphasized the indirect role of calpains on microtubule organization [Burgess and Reiner, 2001; Buddle et al., 2003; Spira et al., 2003]. Indeed Bhatt and coworkers used nocodazole treatments to show that calpains did not affect microtubule organization, but are required for microtubule-mediated focal complex disassembly [Bhatt et al., 2002]. These data support our results, as we observed changes in myoblast morphology and a decrease in adhesion and spreading, but no disturbance in the microtubule cytoskeleton.

Subcellular localization of calpains is not homogeneous. This may indicate that μ -calpain and m-calpain are differently involved in C2C12 migration, adhesion, and spreading, due to the variable accessibility of potential substrates. Indeed, cytosolic substrates localized near the nucleus are more exposed to μ -calpain proteolysis, as this protease is preferentially concentrated around the nucleus. Potential substrates localized in membrane extensions are likely to be exposed to m-calpain proteolysis, as this isoform is abundantly present in membrane projections. Data obtained from fibroblasts confirmed that cleavage of proteins localized at focal adhesion (e.g. talin, spectrin, FAK, or paxillin) depended on m-calpain action, independently of μ -calpain [Franco et al., 2004]. Moreover, Satish and coworkers emphasized that μ - or m-calpain were activated in different ways in keratinocytes, although they had identical effects on keratinocyte

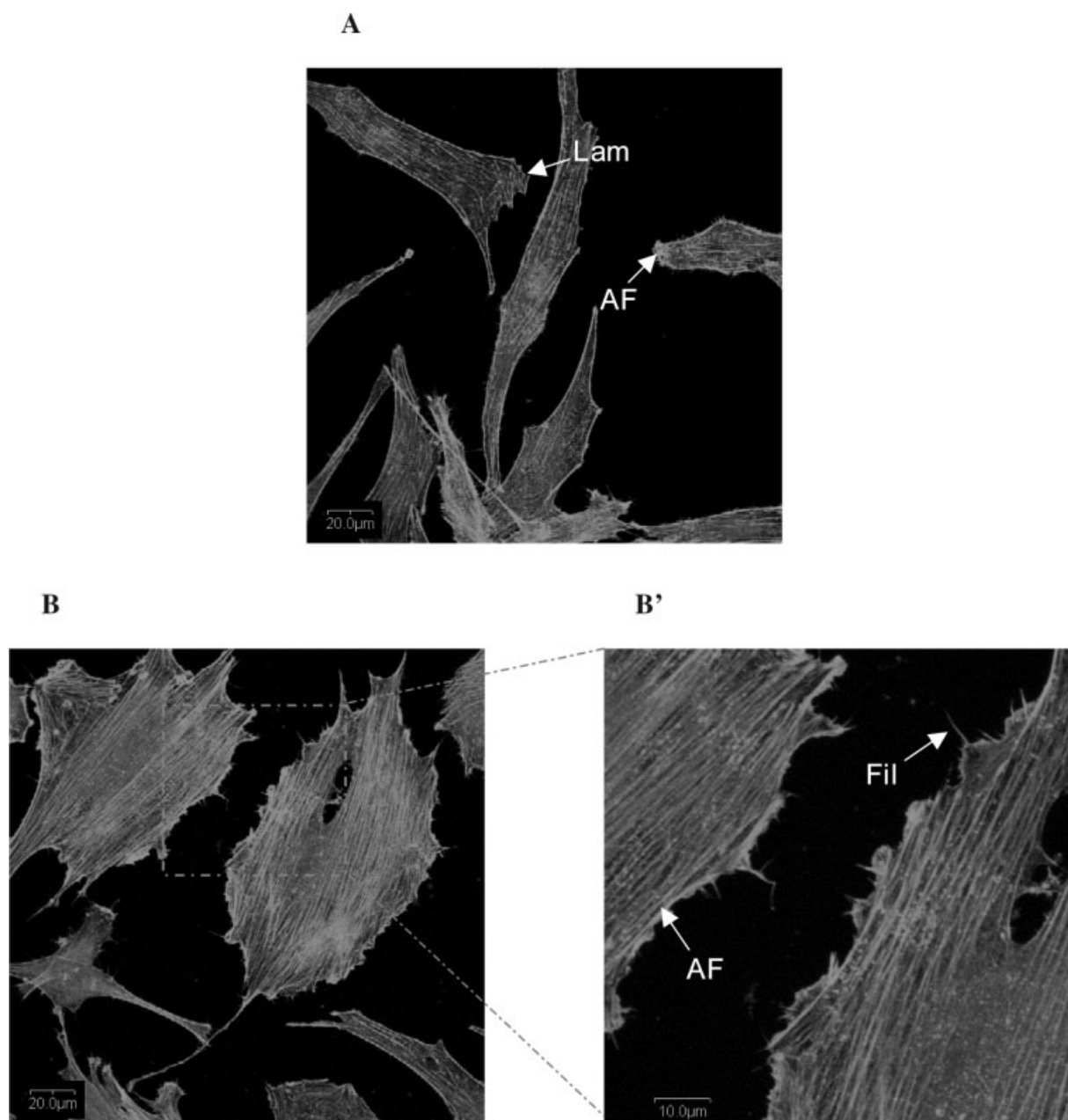


Fig. 7. Actin cytoskeleton is densified when MARCKS expression decreased: C2C12 were seeded and cultured in DMEM supplemented with 0.1% FBS during 12 h. Cells were transfected with antisense directed against MARCKS (B) or with appropriated random (A). After paraformaldehyde fixation, actin cytoskeleton was visualized using FITC-conjugated phalloidin. (A) Cells transfected with the random sequences presented a morphology and an actin organization similar

to untransfected myoblasts. (B) C2C12 transfected with antisense directed against MARCKS presented a higher stress fiber density, moreover, actin fibers were parallel end to end of the cell, following spreading axis of the myoblast. Lam, Lamellipodia; Fil, filopodia. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

motility (cell de-adhesion) [Satish et al., 2005]. These results suggest that the role of each ubiquitous calpain isoform observed in cell adhesion and spreading, as well as stress fiber organization, is regulated by different activation pathways involving the cleavage of distinct substrates.

TABLE II. Quantification of Fluorescence in Control Myoblasts and in Transfected Myoblast in Which the Level of MARCKS Was Lowered

Treatments	Mean of fluorescence (AU)	Standard deviation
R MARCKS	96.50	15.4
AS MARCKS	146.65	19.6

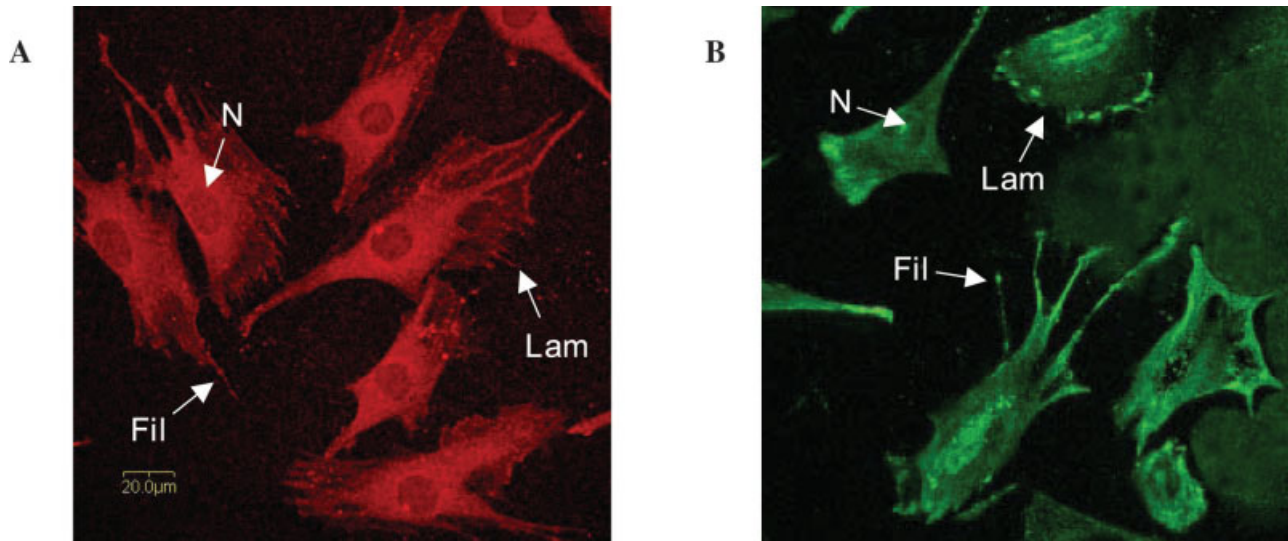


Fig. 8. Ubiquitous calpains have distinct localization in migrating myoblasts: Cells were seeded and cultured in DMEM supplemented with 0.1% FBS during 48 h. After paraformaldehyde fixation, cells were incubated with anti- μ -calpain antibodies (A) or anti-m-calpain antibodies (B). μ -calpain and m-calpain were detected using second-

ary antibodies conjugated to rhodamin or FITC, respectively. (A) μ -calpain was localized in the whole cell and was particularly concentrated around the nucleus. (B) m-calpain was localized in the entire myoblast, its presence was more strongly detected in membrane extensions. Lam, Lamellipodia; Fil, filopodia; N, nucleus.

Experiments using antisense directed against MARCKS showed that MARCKS inhibition had no significant effect on myoblast adhesion and spreading during the 180 min in culture. According to our findings, MARCKS is not involved in adhesion and spreading phenomena. These data are apparently in contradiction with those reported by a few authors, indicating that MARCKS was involved in cell adhesion and spreading. However, Spizz and Blackshear showed that MARCKS expression was necessary but not sufficient to reduce adhesion. Moreover, these authors hypothesized that MARCKS, localized in the plasma membrane, interacted with protein establishing a link between integrins and actin fibers (e.g. vinculin, talin, or paxillin), thus decreasing cell adhesion [Spizz and Blackshear, 2001]. In our experiments we only inhibited MARCKS expression, without modifying the expression of these link proteins. This may explain why the adhesion process remain unchanged after MARCKS inhibition. Concerning cell spreading, data showing a role of MARCKS came from over-expression experiments [Manenti et al., 1997; Disatnik et al., 2004]. We did not observe any significant effect of MARCKS inhibition on myoblast spreading, suggesting that involvement of this protein may be offset by other factors during the first 180 min in culture.

In order to clarify the role of MARCKS in cell adhesion and spreading, we observed actin cytoskeleton and microtubules in C2C12 after antisense treatments directed against MARCKS. Our results show a higher density of stress fibers in transfected cells. Disatnik and coworkers noted that actin polymerization was inhibited

when the MARCKS concentration at the plasma membrane increased [Disatnik et al., 2004]. Moreover, we previously observed that accumulation of MARCKS at the plasma membrane drastically inhibited C2C12 migration [Dedieu et al., 2004]. Therefore, we hypothesize that antisense anti-MARCKS inhibits its expression in the cytosol, particularly at the plasma membrane, and activates actin polymerization. The MARCKS protein may be localized at the centrosome and is assumed to participate in microtubule nucleation in mouse oocytes [Michaut et al., 2005]. However, the microtubule organization in myoblasts remained unchanged after MARCKS inhibition. We hypothesize that MARCKS involvement is different in our cell model than in static cells, such as oocytes. MARCKS only seems to be involved in stress fiber organization, without any effect on the centrosome.

Several studies have identified different calpain substrates in different cell types during cell migration. Experiments with fibroblasts showed an accumulation of ERM proteins after calpain inhibition [Potter et al., 1998]. Franco and coworkers described the cleavage of talin, spectrin, FAK, and paxillin by m-calpain [Franco et al., 2004]. We have previously demonstrated that MARCKS is a substrate for both ubiquitous calpain isoforms in the C2C12 cell line [Dedieu et al., 2003b, 2004]. However, some of these proteins (e.g. FAK, ERM, talin, vinculin, and desmin) do not seem to be proteolyzed by calpains during myoblast migration [Dedieu et al., 2004]. Even if MARCKS is an important substrate for calpains, it is unlikely to be the only calpain substrate involved in myogenic cell motility. We therefore con-

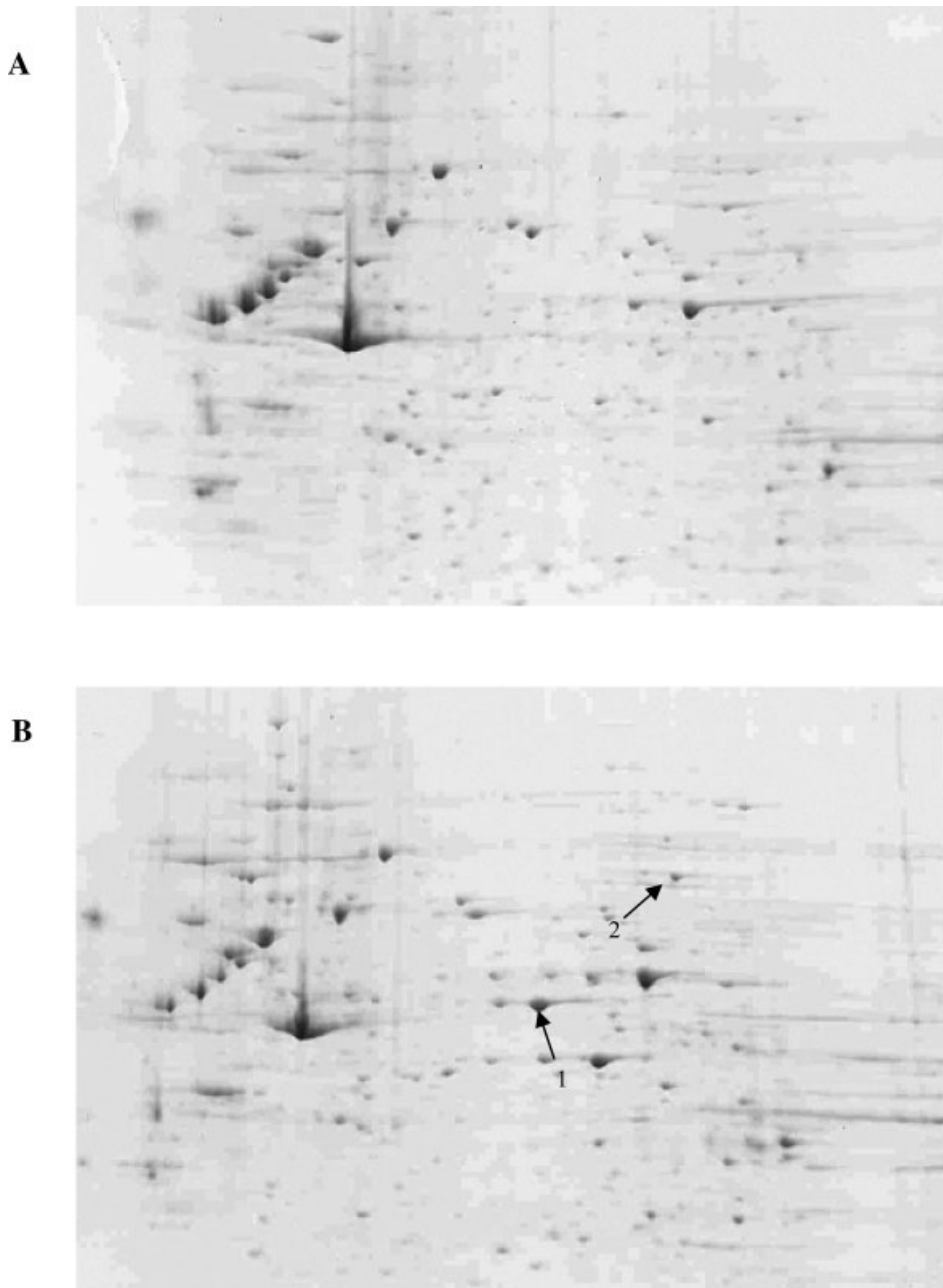


Fig. 9. Comparison protein levels of expression in calpastatin clones and control clones: Control cells (transfected with empty vector) (A) and over-expressing calpastatin clones (B) were cultured. Total proteins were extracted and a IEF then a SDS-PAGE were performed (600 μ g of proteins/gel). After fixation of gels, proteins were visualized after stain with coomassie brilliant blue G250. After analyze of each spot intensity, we detected spot appearing in gel corresponding to calpastatin clones (1) or variations in spot intensity (2).

ducted proteomic analysis to identify new potential substrates for the calcium-dependent proteolytic system. We identified 15 proteins which had different expression levels in calpastatin clones. Only those proteins assumed to be involved in adhesion, spreading, or migration events will be discussed in this section. Two of these proteins, Hsp-70 and vimentin, are detected in smaller quantities when calpastatin is over-expressed. Hsp-70 is a mitochondrial protein that may be localized in other cell compartments, e.g. the endoplasmic reticulum or cytosol [Ran et al., 2000]. Hsp-70 expression in natural killer

cells increases their migration [Gastpar et al., 2004]. Expression of vimentin, a cytosolic protein, is known to increase cell motility [Wang et al., 2004]. These data suggest that ubiquitous calpains regulate Hsp-70 and vimentin expression levels. We suppose that the inhibition of adhesion, spreading, and motility observed in calpastatin clones is due to a drop in the expression of Hsp-70 and vimentin, following a decrease in calpain activity. Thirteen proteins accumulate in calpastatin clones. Some of them appear to act as calpain substrates during myoblast migration, adhesion, or spreading. TCTP (transla-

TABLE III. Summary of Protein Identification

Name	% variation/T	Subcellular localization
Hsp-70	-87.76	Mitochondrial
Vimentin	-72.77	Cytoplasmic
α -enolase	$+\infty$	Cytoplasmic
Elongation factor 1- β	$+\infty$	Cytoplasmic
Tropomyosin α -4-chain	$+\infty$	Cytoplasmic
S-methyl-5-thioadenosine phosphorylase	$+\infty$	Cytoplasmic
α crystallin B chain	$+\infty$	Cytoplasmic
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	$+\infty$	Cytoplasmic
Translationally controlled tumor protein	+606.21	Cytoplasmic
Pyruvate kinase isozyme M2	+63.38	Cytoplasmic
26S protease regulatory subunit 7	+63.38	Cytoplasmic
Phosphoglycerate mutase 1	+61.83	Cytoplasmic
Adenosylhomocysteinase	+59.95	Cytoplasmic
Nucleophosmin	+53.23	Nuclear
Elongation factor 1- δ	+53.23	Cytoplasmic

$+\infty$, Protein was only detected in calpastatin over-expressing cells.

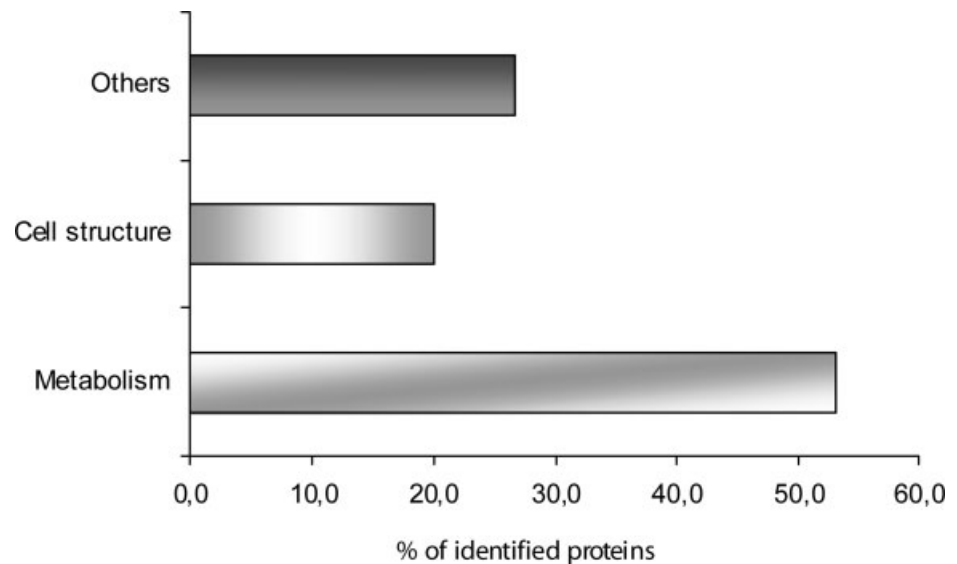


Fig. 10. Functional representation of identified proteins.

tionally-controlled tumor protein) is known to stabilize microtubules and its phosphorylation by polo-like kinase increases microtubule dynamics [Yarm, 2002]. Elongation factors 1 β and 1 δ are cytoplasmic proteins capable of linking microtubules [Janssen and Moller, 1988]. These proteins (TCTP and elongation factors) are accumulated when calpain activity decreases, thus stabilizing the microtubule cytoskeleton. This may, in part, explain why microtubules are not disorganized after antisense treatments directed against ubiquitous calpains.

Adenosylhomocysteinase is a protein capable of linking actin [Kishi et al., 2001]. Cells develop a rounded morphology when this protein is translocated to the cytosol [Yamada and Sameshima, 2004]. Tropomyosin- α is a cytoplasmic protein associated with troponin in muscular fibers and capable of linking actin. Microinjection experiments have shown that tropomyosin- α

accumulation inhibits functional lamellipodia formation [Gupton et al., 2005]. α -crystallin, the transparent protein in the lens, is expressed in many cell types. It belongs to the Hsp-20 family and is capable of linking actin and α -actinin [Dreiza et al., 2005]. Furthermore, its role in adhesion phenomena has been described: an increase in α -crystallin reduces aggregation phenomena in human platelets [McLemore et al., 2004]. Previous findings on the inhibition of myoblast migration, adhesion, and spreading in calpastatin clones [Dedieu et al., 2004], as well as the accumulation of adenosylhomocysteinase, TCTP, elongation factors 1 β and 1 δ , tropomyosin- α , and α -crystallin in these cells, support the hypothesis that these proteins are calpain substrates involved in regulating these phenomena. These data may explain the characteristics observed in myoblasts with reduced calpain activity. Indeed, these myogenic cells present a rounded morphol-

ogy, an unchanged microtubule cytoskeleton, a decrease in lamellipodia, disorganization of actin stress fibers, and a decrease in adhesion and spreading.

CONCLUSION

In these experiments, we have demonstrated the involvement of calpains in myoblast adhesion and spreading. Cell morphology observations by videomicroscopy and cell-diameter measurements are required to follow up this research and describe the spreading dynamics of myogenic cells. This work sheds light on potential calpain substrates, but it is important to localize each of these potential calpain substrates in adhering, spreading, or migrating myoblasts. It is crucial to analyze transduction pathways that activate calpain activity to elucidate the involvement of the calcium-dependent proteolytic system in adhering and moving cells. Experiments are currently in progress using myogenic cells cultured in a medium supplemented with growth factors, together with various components of the ECM. If these treatments activate calpain-mediated adhesion or migration, treated myoblasts would be good candidates for cell therapy for muscular dystrophies.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank very much Dr M. Bonneu for technical assistance in proteomics and A.E. Allain and Dr P. Thiebaut for technical assistance in confocal microscopy.

REFERENCES

- Balcerzak D, Poussard S, Brustis JJ, Elamrani N, Soriano M, Cottin P, Ducastaing A. 1995. An antisense oligodeoxyribonucleotide to m-calpain mRNA inhibits myoblast fusion. *J Cell Sci* 108 (Part 5): 2077–2082.
- Bhatt A, Kaverina I, Otey C, Huttenlocher A. 2002. Regulation of focal complex composition and disassembly by the calcium-dependent protease calpain. *J Cell Sci* 115 (Part 17):3415–3425.
- Bouley J, Chambon C, Picard B. 2004. Mapping of bovine skeletal muscle proteins using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 4(6):1811–1824.
- Bretscher MS. 1996. Moving membrane up to the front of migrating cells. *Cell* 85(4):465–467.
- Brustis JJ, 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(2):320–327.
- Buddle M, Eberhardt E, Ciminello LH, Levin T, Wing R, DiPasquale K, Raley-Susman KM. 2003. Microtubule-associated protein 2 (MAP2) associates with the NMDA receptor and is spatially redistributed within rat hippocampal neurons after oxygen–glucose deprivation. *Brain Res* 978(1/2):38–50.
- Burgess HA, Reiner O. 2001. Cleavage of doublecortin-like kinase by calpain releases an active kinase fragment from a microtubule anchorage domain. *J Biol Chem* 276(39):36397–36403.
- Cottin P, Thompson VF, Sathé SK, Szpacenko A, Goll DE. 2001. Autolysis of μ - and m-calpain from bovine skeletal muscle. *Biol Chem* 382(5):767–776.
- Cuevas BD, Abell AN, Witowsky JA, Yujiri T, Johnson NL, Kesavan K, Ware M, Jones PL, Weed SA, DeBiasi RL, Oka Y, Tyler KL, Johnson GL. 2003. MEKK1 regulates calpain-dependent proteolysis of focal adhesion proteins for rear-end detachment of migrating fibroblasts. *EMBO J* 22(13):3346–3355.
- Dadsetan M, Jones JA, Hiltner A, Anderson JM. 2004. Surface chemistry mediates adhesive structure, cytoskeletal organization, and fusion of macrophages. *J Biomed Mater Res A* 71(3):439–448.
- Dedieu S, Mazeres G, Dourdin N, Cottin P, Brustis JJ. 2003a. Transactivation of capn2 by myogenic regulatory factors during myogenesis. *J Mol Biol* 326(2):453–465.
- Dedieu S, Mazeres G, Poussard S, Brustis JJ, Cottin P. 2003b. Myoblast migration is prevented by a calpain-dependent accumulation of MARCKS. *Biol Cell* 95(9):615–623.
- Dedieu S, Poussard S, Mazeres G, Grise F, Dargelos E, Cottin P, Brustis JJ. 2004. Myoblast migration is regulated by calpain through its involvement in cell attachment and cytoskeletal organization. *Exp Cell Res* 292(1):187–200.
- del Cerro S, Arai A, Kessler M, Bahr BA, Vanderklish P, Rivera S, Lynch G. 1994. Stimulation of NMDA receptors activates calpain in cultured hippocampal slices. *Neurosci Lett* 167(1/2): 149–152.
- Disatnik MH, Boutet SC, Pacio W, Chan AY, Ross LB, Lee CH, Rando TA. 2004. The bi-directional translocation of MARCKS between membrane and cytosol regulates integrin-mediated muscle cell spreading. *J Cell Sci* 117 (Part 19):4469–4479.
- Dourdin N, Brustis JJ, Balcerzak D, Elamrani N, Poussard S, Cottin P, Ducastaing A. 1997. Myoblast fusion requires fibronectin degradation by exteriorized m-calpain. *Exp Cell Res* 235(2):385–394.
- Dourdin N, Bhatt AK, Dutt P, Greer PA, Arthur JS, Elce JS, Huttenlocher A. 2001. Reduced cell migration and disruption of the actin cytoskeleton in calpain-deficient embryonic fibroblasts. *J Biol Chem* 276(51):48382–48388.
- Dreiza CM, Brophy CM, Komalavilas P, Furnish EJ, Joshi L, Pallero MA, Murphy-Ullrich JE, von Rechenberg M, Ho YS, Richardson B, Xu N, Zhen Y, Peltier JM, Panitah A. 2005. Transducible heat shock protein 20 (HSP20) phosphopeptide alters cytoskeletal dynamics. *FASEB J* 19(2):261–263.
- Etienne-Manneville S. 2004. Actin and microtubules in cell motility: Which one is in control? *Traffic* 5(7):470–477.
- Franco S, Perrin B, Huttenlocher A. 2004. Isoform specific function of calpain 2 in regulating membrane protrusion. *Exp Cell Res* 299(1):179–187.
- Gastpar R, Gross C, Roszbacher L, Ellwart J, Riegger J, Multhoff G. 2004. The cell surface-localized heat shock protein 70 epitope TKD induces migration and cytolytic activity selectively in human NK cells. *J Immunol* 172(2):972–980.
- Glading A, Chang P, Lauffenburger DA, 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(4):2390–2398.
- Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J. 2003. The calpain system. *Physiol Rev* 83(3):731–801.
- Gupton SL, Anderson KL, Kole TP, Fischer RS, Ponti A, Hitchcock-DeGregori SE, Danuser G, Fowler VM, Wirtz D, Hanein D, Waterman-Storer CM. 2005. Cell migration without a lamellipodium: Translation of actin dynamics into cell movement mediated by tropomyosin. *J Cell Biol* 168(4):619–631.
- Hartwig JH, Thelen M, Rosen A, Janmey PA, Nairn AC, Aderem A. 1992. MARCKS is an actin filament crosslinking protein regulated by protein kinase C and calcium-calmodulin. *Nature* 356(6370):618–622.

- Janssen GM, Moller W. 1988. Elongation factor 1 β from *Artemia*. Purification and properties of its subunits. *Eur J Biochem* 171(1/2):119–129.
- Kishi Y, Sugo T, Mahadeo D, Cotter D, Sameshima M. 2001. *S*-Adenosyl-L-homocysteine hydrolase is sequestered into actin rods in *Dictyostelium discoideum* spores. *FEBS Lett* 508(3):433–437.
- Lambrechts A, Van Troys M, Ampe C. 2004. The actin cytoskeleton in normal and pathological cell motility. *Int J Biochem Cell Biol* 36(10):1890–1909.
- Lauffenburger DA, Horwitz AF. 1996. Cell migration: A physically integrated molecular process. *Cell* 84(3):359–369.
- Manenti S, Malecaze F, Darbon JM. 1997. The major myristoylated PKC substrate (MARCKS) is involved in cell spreading, tyrosine phosphorylation of paxillin, and focal contact formation. *FEBS Lett* 419(1):95–98.
- McLemore EC, Tessier DJ, Flynn CR, Furnish EJ, Komalavilas P, Thresher JS, Joshi L, Stone WM, Fowl RJ, Brophy CM. 2004. Transducible recombinant small heat shock-related protein, HSP20, inhibits vasospasm and platelet aggregation. *Surgery* 136(3):573–578.
- Michaut MA, Williams CJ, Schultz RM. 2005. Phosphorylated MARCKS: A novel centrosome component that also defines a peripheral subdomain of the cortical actin cap in mouse eggs. *Dev Biol* 280(1):26–37.
- Mouatt-Prigent A, Karlsson JO, Agid Y, Hirsch EC. 1996. Increased m-calpain expression in the mesencephalon of patients with Parkinson's disease but not in other neurodegenerative disorders involving the mesencephalon: A role in nerve cell death? *Neuroscience* 73(4):979–987.
- Nakamura Y, Fukiage C, Shih M, Ma H, David LL, Azuma M, Shearer TR. 2000. Contribution of calpain Lp82-induced proteolysis to experimental cataractogenesis in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41(6):1460–1466.
- Potter DA, Tirnauer JS, Janssen R, Croall DE, Hughes CN, Fiacco KA, Mier JW, Maki M, Herman IM. 1998. Calpain regulates actin remodeling during cell spreading. *J Cell Biol* 141(3):647–662.
- Ran Q, Wadhwa R, Kawai R, Kaul SC, Sifers RN, Bick RJ, Smith JR, Pereira-Smith OM. 2000. Extramitochondrial localization of mortalin/mthsp70/PBP74/GRP75. *Biochem Biophys Res Commun* 275(1):174–179.
- Raynaud F, Carnac G, Marcilhac A, Benyamin Y. 2004. m-Calpain implication in cell cycle during muscle precursor cell activation. *Exp Cell Res* 298(1):48–57.
- Richard I, Broux O, Allamand V, Fougereuse F, Chiannikulchai N, Bourg N, Brenguier L, Devaud C, Pasturaud P, Roudaut C, Hillaire D, Passos Bueno MR, Zatz M, Tischfield JA, Fardeav M, Jackson CE, Cohen D, Beckmann JS. 1995. Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Cell* 81(1):27–40.
- Saito K, Elce JS, Hamos JE, Nixon RA. 1993. Widespread activation of calcium-activated neutral proteinase (calpain) in the brain in Alzheimer disease: A potential molecular basis for neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90(7):2628–2632.
- Satish L, Blair HC, Glading A, Wells A. 2005. Interferon-inducible protein 9 (CXCL11)-induced cell motility in keratinocytes requires calcium flux-dependent activation of μ -calpain. *Mol Cell Biol* 25(5):1922–1941.
- Serrano K, Devine DV. 2004. Vinculin is proteolyzed by calpain during platelet aggregation: 95 kDa cleavage fragment associates with the platelet cytoskeleton. *Cell Motil Cytoskeleton* 58(4):242–252.
- 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(8):2716–2727.
- Spencer MJ, Croall DE, Tidball JG. 1995. Calpains are activated in necrotic fibers from mdx dystrophic mice. *J Biol Chem* 270(18):10909–10914.
- Spira ME, Oren R, Dormann A, Gitler D. 2003. Critical calpain-dependent ultrastructural alterations underlie the transformation of an axonal segment into a growth cone after axotomy of cultured *Aplysia* neurons. *J Comp Neurol* 457(3):293–312.
- Spizz G, Blackshear PJ. 2001. Overexpression of the myristoylated alanine-rich C-kinase substrate inhibits cell adhesion to extracellular matrix components. *J Biol Chem* 276(34):32264–32273.
- Squier MK, Cohen JJ. 1997. Calpain, an upstream regulator of thymocyte apoptosis. *J Immunol* 158(8):3690–3697.
- Sreenan SK, Zhou YP, Otani K, Hansen PA, Currie KP, Pan CY, Lee JP, Ostrega DM, Pugh W, Horikawa Y, Cox NJ, Hanis CL, Burant CF, Fox AP, Bell GI, Polonsky KS. 2001. Calpains play a role in insulin secretion and action. *Diabetes* 50(9):2013–2020.
- Strasser GA, Rahim NA, VanderWaal KE, Gertler FB, Lanier LM. 2004. Arp2/3 is a negative regulator of growth cone translocation. *Neuron* 43(1):81–94.
- Svitkina TM, Bulanova EA, Chaga OY, Vignjevic DM, Kojima S, Vasiliev JM, Borisy GG. 2003. Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *J Cell Biol* 160(3):409–421.
- Temmm-Grove CJ, Wert D, Thompson VF, Allen RE, Goll DE. 1999. Microinjection of calpastatin inhibits fusion in myoblasts. *Exp Cell Res* 247(1):293–303.
- 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(5):1333–1339.
- Wang K, Bekar LK, Furber K, Walz W. 2004. Vimentin-expressing proximal reactive astrocytes correlate with migration rather than proliferation following focal brain injury. *Brain Res* 1024(1/2):193–202.
- Wendt A, Thompson VF, Goll DE. 2004. Interaction of calpastatin with calpain: A review. *Biol Chem* 385(6):465–472.
- Yamada Y, Sameshima M. 2004. Cell shape regulation and co-translocation of actin and adenosyl homocysteinase in response to intermediate hypertonicity. *FEMS Microbiol Lett* 238(2):417–422.
- Yarm FR. 2002. Plk phosphorylation regulates the microtubule-stabilizing protein TCTP. *Mol Cell Biol* 22(17):6209–6221.

Résultats - Chapitre 2 :
Implication des calpaïnes ubiquitaires dans la migration
des myoblastes induite par les facteurs de croissance

Article 2 : Involvement of calpains in growth factor-mediated migration.

Ludovic Leloup, Germain Mazères, Laetitia Daury, Patrick Cottin, and Jean-Jacques Brustis.
The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 38: 2049-2063 (2006).

La migration cellulaire est un phénomène fondamental impliqué dans la réponse immunitaire, la cicatrisation et le développement embryonnaire. Au cours de la myogenèse, la migration des myoblastes est nécessaire à l'alignement et à la fusion de ces cellules myogéniques pour former des myotubes. Chez les fibroblastes, le processus migratoire comprend cinq étapes (Sheetz *et al.*, 1999) et peut se résumer comme une succession d'étapes d'adhésion et de dé-adhésion. L'assemblage et le désassemblage des plaques d'adhésion sont donc essentiels à la migration cellulaire. Les calpaïnes intervenant dans ces processus, elles pourraient jouer en outre un rôle primordial au cours de la migration en dégradant certains de leurs substrats présents dans les plaques d'adhésion tels que la taline, la vimentine, la desmine ou la FAK (Bhatt *et al.*, 2002 ; Dourdin *et al.*, 1999 ; Goll *et al.*, 1991).

Des études réalisées précédemment au laboratoire (Dedieu *et al.*, 2004) ont clairement établi l'implication des calpaïnes dans la migration des cellules myogéniques. En effet, l'inhibition de l'activité des calpaïnes par traitements chimiques ou par surexpression de la calpastatine induit une forte réduction de la migration des myoblastes.

L'objectif de ce travail est double. D'une part nous nous proposons d'analyser de façon détaillée l'implication de chacune des calpaïnes ubiquitaires au cours de la migration des myoblastes. En conséquence, le niveau d'expression des différents acteurs du système protéolytique calcium-dépendant (μ -calpaïne, m-calpaïne, calpastatine) sera mesuré durant le phénomène migratoire. Parallèlement, la morphologie et le cytosquelette d'actine des myoblastes seront étudiés. D'autre part, dans le cadre de la thérapie cellulaire et plus particulièrement pour améliorer la migration et la fusion des cellules transplantées, nous nous proposons d'activer le phénomène migratoire *via* la stimulation des calpaïnes ubiquitaires (surexpression, addition de différents facteurs de croissance).

Principaux résultats :

✓ La migration des myoblastes s'accompagne de profonds changements morphologiques auxquels est associée l'organisation de leur cytosquelette d'actine. Après leur adhésion, les cellules forment d'importantes extensions membranaires terminées le plus souvent par des filopodes. L'actine s'organise alors en « fibres de stress », nombreuses et parallèles au grand axe de migration de la cellule.

✓ La migration des myoblastes s'accompagne également de changements significatifs dans l'expression des calpaïnes ubiquitaires. L'expression de la μ -calpaïne, importante lors de l'adhésion, est réduite de moitié après 24 heures. A l'inverse, l'expression de la m-calpaïne est fortement augmentée après 10 et 24 heures de culture. Ces résultats suggèrent une possible implication de la μ -calpaïne au cours de l'adhésion et de la m-calpaïne lors de la migration.

✓ La surexpression des calpaïnes ubiquitaires ne permet pas d'augmenter la migration des myoblastes. Au contraire, la surexpression de la μ - et de la m-calpaïne (+45 % et +39 % respectivement) induit une réduction significative de la migration des cellules myogéniques (-41 et -43 % respectivement). L'observation des fibres d'actine des cellules transfectées montre une désorganisation importante du cytosquelette d'actine. Ce résultat suggère une dégradation anarchique des protéines impliquées dans l'organisation du cytosquelette d'actine expliquant ainsi la réduction de la migration. L'utilisation de molécules physiologiques pour augmenter la migration des myoblastes *via* les calpaïnes semble donc préférable.

✓ L'addition de facteurs de croissance tels que l'IGF-1, le TGF- β 1 et l'insuline induit une forte stimulation de la migration des myoblastes. Des augmentations des taux de migration allant de 66 à 97 % ont ainsi été observées selon les facteurs de croissance utilisés (66% pour l'IGF-1, 73% pour le TGF- β 1 et 97% en présence d'insuline).

✓ L'activité des calpaïnes est requise pour la migration induite par les facteurs de croissance. En effet, l'ajout de calpeptine (inhibiteur chimique spécifique des calpaïnes) contrecarre les effets des facteurs de croissance, inhibant totalement la migration des cellules myogéniques.

✓ La quantification de l'expression des calpaïnes et de la calpastatine après addition de facteurs de croissance met en évidence une stimulation de l'expression de la m-calpaïne par l'IGF-1, le TGF- β 1 et l'insuline. Cette augmentation de l'expression s'accompagne également d'une hausse de l'activité de cette protéase (de 49% à 99% selon les facteurs de croissance). Concernant la μ -calpaïne, seul le TGF- β 1 induit une stimulation de son expression. Cependant les tests d'activité montrent que cette augmentation n'a aucun effet sur l'activité de l'enzyme. Quant au niveau d'expression de la calpastatine, il reste inchangé après les différents traitements.

L'ensemble de ces résultats montre que la migration des myoblastes s'accompagne de profonds changements dans la morphologie et l'organisation du cytosquelette d'actine. Les deux calpaïnes ubiquitaires évoluent de façon distincte au cours de ce phénomène. La surexpression de ces enzymes entraîne une désorganisation du cytosquelette d'actine ainsi qu'une importante réduction de la migration des myoblastes. L'addition d'IGF-1, de TGF- β 1 ou d'insuline permet d'activer la migration de ces cellules, en stimulant l'expression et l'activité de la m-calpaïne.

Involvement of calpains in growth factor-mediated migration

Ludovic Leloup¹, Germain Mazères¹, Laetitia Daury²,
Patrick Cottin³, Jean-Jacques Brustis*

*Laboratoire Biosciences de l'Aliment, Université Bordeaux I, ISTAB USC-INRA 2009,
avenue des Facultés, 33405 Talence Cedex, France*

Received 9 January 2006; received in revised form 26 April 2006; accepted 26 April 2006
Available online 17 May 2006

Abstract

Previous research in our laboratory has already shown the importance of the role played by ubiquitous calpains during myoblast migration. The aim of this study was to investigate calpain expression during myoblast migration and, to enhance this phenomenon via calpain stimulation. Ubiquitous calpains are members of a large family of calcium-dependent cysteine proteases. They play an important role in numerous biological and pathological phenomena, such as signal transduction, apoptosis, cell-cycle regulation, cell spreading, adhesion, invasion, myogenesis, and motility. Myoblast migration is a crucial step in myogenesis, as it is necessary for myoblast alignment and fusion to form myotubes. This study started by examining changes in calpain expression during migration, then investigated the possibility of activating myoblast migration via the stimulation of calpain expression and/or activity. The migration rate of myoblasts overexpressing μ - or milli-calpain was quantified. The results showed that calpain overexpression dramatically inhibited myoblast migration. Growth-factor treatments were then used to enhance myoblast migration. The results showed that treatment with IGF-1, TGF- β 1, or insulin induced a major increase in migration and caused a significant increase in m-calpain expression and activity. The increase in migration was totally inhibited by adding calpeptin, a calpain-specific inhibitor. These findings suggest that milli-calpain is involved in growth factor-mediated migration.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Calpains; Myoblasts; Migration; Growth factors

Abbreviations: BCA, bicinchoninic acid; DMEM, Dulbecco's modified Eagle medium; DMSO, dimethyl sulfoxide; DTT, DL-dithiothreitol; EGF, epidermal growth factor; EGTA, ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N'-tetraacetic acid; ERK, extracellular-signal regulated kinase; FAK, focal adhesion kinase; FBS, foetal bovine serum; FITC, fluorescein-isothiocyanate; IGF-1, insulin-like growth factor-1; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MARCKS, myristoylated alanine rich C kinase substrate; NBT/BCIP, nitroblue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indoyl-1-phosphate; PBS, phosphate buffer saline; PI3K, phosphatidylinositol 3 kinase; PVDF, polyvinylidene fluoride; TBS, tris-buffer saline; TGF- β 1, transforming growth factor- β 1

* Corresponding author. Tel.: +33 5 40 00 26 36; fax: +33 5 40 00 25 76/84 96.

E-mail addresses: ludovic.leloup@etu.u-bordeaux1.fr (L. Leloup), germain.mazeres@laposte.net (G. Mazères),

l.daury-joucla@istab.u-bordeaux1.fr (L. Daury), p.cottin@istab.u-bordeaux1.fr (P. Cottin), jj.brustis@tpbcm.u-bordeaux1.fr (J.-J. Brustis).

¹ Tel.: +33 5 40 00 26 37; fax: +33 5 40 00 84 96.

² Tel.: +33 5 40 00 21 94; fax: +33 5 40 00 84 96.

³ Tel.: +33 5 40 00 87 59; fax: +33 5 40 00 84 96.

1. Introduction

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, Thompson, Li, Wei, & Cong, 2003). μ -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 one of two small regulatory subunits, *css1* (formerly CAPN4, 30 kDa) or *css2* (about 28 kDa). *Css1*, encoded by the *capns1* gene, is ubiquitous, while *css2* encoded by the *capns2* gene, is tissue specific (Schád, Farkas, Jékely, Tompa, & Friedrich, 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 myogenic factors (Alderton & Steinhardt, 2000; Aversa et al., 2003; Barnoy, Supino-Rosin, & Kosower, 2000; Dedieu, Mazères, Cottin, & Brustis, 2002; Dedieu, Mazères, Dourdin, Cottin, & Brustis, 2003; Li, Thompson, & Goll, 2004; Moldoveanu, Jia, & Davies, 2003; Suzuki, Saido, & Hirai, 1992; Temm-Grove, Wert, Thompson, Allen, & Goll, 1999). The calpastatin gene includes four promoters and its expression is regulated by numerous factors (Raynaud, Jayat-Vignoles, Laforêt, Levéziel, & Amarger, 2005). To inhibit calpain activity, calpastatin requires calcium and, of course, to be colocalised with calpains (Aversa et al., 2003).

Calpains are thought to be involved in many pathological phenomena, such as muscular dystrophies, cataract formation, diabetes, rheumatoid arthritis, neurodegenerative diseases, ischemia, and psoriasis (Biswas, Harris, Singh, & Phoenix, 2004; Cox, Hayes, Roe, Tsuchiya, & Bell, 2004; Matsushita, Shimada, Kawara, Takehara, & Sato, 2005; Menard & El-Amine, 1996; Nixon, 2003; Perrin, Vergely, & Rochette, 2004; Richard et al., 2000; Singh, Dandekar, Elimban, Gupta, & Dhalla, 2004), 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, Ramachandra, Shabram, & Demers, 2000; Carragher & Frame, 2002; Dedieu et al., 2004; Franco et al., 2004; Glading, Uberall, Keyse, Lauffenburger, & Wells, 2001; Mamoune, Luo, Lauffenburger, & Wells, 2003; Mazères, Leloup, Daury, Cottin, & Brustis, 2006; Polster, Basanez, Etxebarria, Hardwick, & Nicholls, 2005; Sato & Kawashima, 2001). Calpains play a critical role in

myogenesis and, more particularly, the early stages of this phenomenon, myoblast migration and fusion. Calpain activity increases significantly during fusion and the calpain-specific inhibitor, calpastatin, inhibits myoblast migration and fusion (Barnoy, Glaser, Nechama, & Kosower, 1996; Barnoy, Maki, & Kosower, 2005; Cottin et al., 1994; Dedieu et al., 2004; Temm-Grove et al., 1999).

Cell migration is a fundamental, critical function. In 1999, Sheetz and collaborators observed fibroblast migration and described it as a five-stage phenomenon: cell membrane extension, adhesion to the substrate, contraction of the cytoplasm, release of the contact site at the rear of the cell, and, finally, recycling the membrane receptors from the rear to the front of the migrating cell (Sheetz, Felsenfeld, Galbraith, & Choquet, 1999). The migration process is involved in many biological phenomena, including wound repair, embryo development, tumour invasion, and immune response. Cell migration is an essential stage in myogenesis as it is necessary for the alignment and fusion of myoblasts. Among the many proteins implicated in cell migration, several are indispensable, particularly those present in focal adhesions. These proteins, such as FAK (focal adhesion kinase), talin, vinculin, paxillin, desmin, MARCKS, and zyxin, form a connection between the actin cytoskeleton and integrins. The assembly and disassembly of these complexes is responsible for cell motility (Lambrechts, Van Troys, & Ampe, 2004; Petit & Thiery, 2000). Calpains are known to regulate the dynamics of these complexes and, consequently, migration, by cleaving some of these myofibrillar or cytoskeletal associated proteins, such as talin, vimentin and desmin (Bhatt, Kaverina, Otey, & Huttenlocher, 2002; Dourdin et al., 1999; Goll, Dayton, Singh, & Robson, 1991). Several studies have suggested that μ -calpain may play a role in the assembly of focal adhesion at the front of the cell, whereas m-calpain may regulate the disassembly of these complexes at the rear of the cell, thus making cell migration possible (Glading, Lauffenburger, & Wells, 2002).

Previous studies have also shown that fibroblast migration is regulated by several growth factors, particularly epidermal growth factor (EGF). EGF is capable of increasing fibroblast migration by modulating calpain activation via the ERK/MAPK pathway (Glading, Chang, Lauffenburger, & Wells, 2000; Satish, Babu, Tran, Hebda, & Wells, 2004). Some growth factors are responsible for increases in myoblast migration (Allen, Teitelbaum, & Kurachi, 2003; Lafrenière, Mills, Tremblay, & Fahime, 2004). However, the implication of calcium-dependent proteolysis in this phenomenon

has not been clearly established for these myogenic cells.

Results previously obtained in our laboratory strongly suggest that calpains are involved in myoblast migration. Indeed, inhibiting calpain activity with specific inhibitors or decreasing calpain expression by anti-sense strategy causes a major inhibition in myoblast migration (Dedieu et al., 2003, 2004). In this study, we initially examined myoblast migration, the morphology and actin cytoskeleton of migrating myoblasts, and, correlatively, changes in calpain expression during this phenomenon. Secondly, we experimented ways of increasing myoblast migration by enhancing calpain activity, to confirm its crucial role in this process. Consequently, we analysed the migration, morphology, and actin cytoskeleton of myoblasts overexpressing calpains. The effect of treatment with various growth factors on myoblast migration, as well as calpain expression and activity, was also studied. The results show, for the first time, that calpains are involved in growth factor-mediated myoblast migration and, consequently, that calpains are essential factors in myoblast migration.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) and foetal bovine serum (FBS) were from Gibco-BRL. Culture dishes were from Fisher-Scientific. The BCA (bicinchoninic acid) protein assay kit was purchased from Pierce and the PVDF (polyvinylidene fluoride) membrane from Millipore. NBT (nitroblue tetrazolium) and BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indoyl-1-phosphate) were purchased from Promega. The various growth factors used (insulin, IGF-1, and TGF- β 1) were from Sigma–Aldrich and calpeptin from Calbiochem. The Qiagen DNA extraction kit and Effectene Transfection Reagent were used for transient transfections.

2.2. Antibodies

Antibodies for m-calpain were raised in sheep as previously described (Brustis et al., 1994).

The antibodies for β -tubulin and calpastatin were from Santa Cruz Biotechnology (H-235 sc-9104 for tubulin and H-300 sc-20779 for calpastatin). The specific antibodies for μ -calpain (C-0355) and all the secondary antibodies were purchased from Sigma–Aldrich.

2.3. Cell culture

Mouse myoblasts (C2C12 cell line) were grown in DMEM supplemented with 10% FBS (v/v) in a 5% CO₂ atmosphere at 37 °C.

2.4. In vitro wound-healing assay

C2C12 myoblasts were grown to about 80% confluence in DMEM supplemented with 10% FBS. Then, the growth medium was replaced with DMEM supplemented with 0.1% FBS. After 48 h quiescence, some cells were scraped off with a pipette tip to obtain an acellular area. The cells were washed with PBS and new medium (DMEM with 0.1% FBS) was added. After 24 h, the cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min, dehydrated overnight using ethanol, and stained with Hansen's hemalun for 9 min. The cells that migrated into the cell-free area were observed by light microscopy (Hund–Wetzlar) and counted.

2.5. Growth-factor treatments

IGF-1 (insulin-like growth factor) was dissolved in 10 mM HCl (final concentration: 0.5 mg/mL) and added to the medium in various concentrations (10, 20, 30, and 40 ng/mL). TGF- β 1 (transforming growth factor) was reconstituted to a concentration of 10 μ g/mL using HCl solution (4 mM) and added to the medium in several concentrations (5, 10, 15, and 20 ng/mL). Insulin (10 mg/mL in 25 mM HEPES) was used at four different concentrations (5, 7.5, 10, and 15 μ g/mL). The growth factor concentrations used were those recommended by the supplier. PBS was used to dilute the growth factor and also as control. For the in vitro wound-healing assay, the three growth factors were added to the new medium after the cells had been scraped off and washed. The results obtained after growth-factor treatments were compared with the control and expressed as a percentage. For immunoblotting and casein zymography, growth factors and PBS (control) were added to the medium (DMEM + 0.1% FBS) for 24 h.

2.6. Calpain inhibitor treatments

The chemical calpain inhibitor, calpeptin (Z-Leu-Nle-CHO), purchased from Calbiochem, was dissolved in DMSO and used at four different concentrations (20, 40, 60, and 80 μ M). This calpain inhibitor had already been used at these concentrations in our laboratory (Dedieu et al., 2004). Calpeptin was added to the medium

at the same time as the growth factors and incubated for 24 h.

2.7. Plasmids and transient transfections

Three plasmids were used for transient transfections. The pCAPN1 plasmid (pEMSV), containing the cDNA encoding for the CAPN1 protein, was used to overexpress μ -calpain. The pCAPN2 plasmid (pCMV), containing the cDNA encoding for CAPN2, was used to overexpress m-calpain. An empty plasmid, pEMSV, was used as an internal control.

For transfection, C2C12 myoblasts were grown to about 80% confluence in DMEM plus 10% FBS. The medium was then replaced with DMEM containing 0.1% FBS and the various plasmids were transfected at a concentration of 0.25 $\mu\text{g DNA/cm}^2$ using Effectene Transfection Reagent with an Effectene (μL)/DNA (μg) ratio of 4:1. After 48 h in culture, the cells were lysed to extract the proteins or used for an in vitro wound-healing assay.

2.8. Protein extraction and quantification

The cells were washed using PBS and detached from culture plates by scraping in PBS (pH 7.5) containing EGTA (5 mM), DTT (0.5 mM), Na_3N (1 mM), leupeptin (20 μM), benzamidin (10 mM), and PMSF (1 mM). Cells were sonicated and centrifuged at $15,000 \times g$ and 4°C for 10 min. Proteins were quantified using a BCA protein assay kit. 30 μg of each sample were placed in sample buffer (0.05 mM Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 0.01% bromophenol blue, 30% glycerol, and 1% DTT) and boiled for 5 min.

2.9. Electrophoresis and immunoblotting

The samples were loaded and run on a 10% SDS-PAGE, as described by Laemmli (1970). The separated proteins were transferred onto PVDF membrane using semi-dry transfer (0.8 mA by cm^2), 45 min for β -tubulin, μ -, and m-calpains and 1 h 15 min for calpastatin. The membranes were blocked at room temperature for 90 min 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 in TBS and incubated with the primary antibodies in TBS containing 1% milk at room temperature for 3 h. The following antibody dilutions were used: 1/1000 for m-calpain antibodies, 1/500 for β -tubulin, 1/5000 for μ -calpain, and 1/250 for calpastatin. The membranes were washed in TBS and incubated with the secondary

antibodies (alkaline phosphatase conjugated antibodies, 1/10,000) in TBS containing 1% milk for 90 min. After washing, the NBT/BCIP were used as detection substrates.

2.10. Densitometric analysis

The apparent density of the band on the membranes was observed and estimated with a video densitometer (Gel-Doc 2000, Quantity One software, Bio Rad), corrected according to β -tubulin expression.

2.11. Casein zymography

Calpain proteolytic activities were tested using the casein zymography method described by Arthur and Mykles (2000). The cells were incubated in DMEM plus 0.1% FBS with or without growth factors for 24 h. The cells were then washed and lysed in a non-denaturing buffer. The samples were run under non-denaturing conditions on acrylamide gels containing FITC-casein (10 mg/mL) in presence of EDTA (5 mM). The gels were incubated in three successive buffers containing Ca^{2+} (5 mM) and DTT (10 mM) (twice for 30 min and once overnight). At the same time, identical gels were incubated in three buffers containing EDTA (5 mM, negative control) instead of Ca^{2+} . Calpain proteolytic activities were observed and estimated using a phospho-fluo imager (Typhoon 8600, Amersham Biosciences).

2.12. Immunofluorescence microscopy

C2C12 myoblasts were grown on glass slides coated with gelatine (1 mg/mL) in DMEM plus 0.1% FBS. After 5 or 24 h, cells were washed using PBS, fixed with paraformaldehyde (4%), and dehydrated overnight using ethanol. The cells were then permeabilised using PBS containing 1% Triton X-100. The actin fibres were stained with phalloidin-FITC (0.5 μM) for 40 min. After three washings, the cells were observed using an immunofluorescence microscope (Polyvar, Reichert-Jung) or confocal microscopy (Olympus, Fluoview).

2.13. Statistical analysis

The statistical significance of the difference between multiple groups was determined using ANOVA. When F was associated with a probability $p < 0.05$, inter-group comparisons were conducted using Student's t -test. Unless indicated, all data are expressed as

means \pm S.E.M. and are representative of an average of at least three separate experiments.

3. Results and discussion

3.1. Analysis of myoblast migration

As previously mentioned, myoblast migration is an essential step in myogenesis. Observation of myoblasts in culture has shown that, in the first hours after seeding, the cells adhere but do not migrate. After the adhesion step, which takes about 4–5 h, the cells migrate and align. When the myoblasts are aligned, they stop migrating and prepare fusion (at least 48 h after seeding). We examined myoblast morphology, particularly the actin cytoskeleton during this phenomenon.

As shown in Fig. 1A, no membrane protusion and only very few stress fibres were observed in adhering

cells that did not migrate. In contrast, as soon as the myogenic cells migrated (Fig. 1B and C), they had numerous, large membrane protusions, often prolonged by filopodia. The actin cytoskeleton was well developed in these elongated cells. Actin fibres were organised parallel to the main axis of the cell and also sustained membrane projections (Fig. 1C and C'). The morphology of migrating myoblasts is very different from that of fibroblasts, examined by several authors under the same culture conditions. In contrast to fibroblasts, myoblasts mainly form large membrane protrusions, long filopodia, and very few lamellipodia. These observations suggest that the migration strategy of myogenic cells may be somewhat different from that of fibroblasts.

As calpains were thought to be involved in the rehandling of the actin cytoskeleton, the evolution of calpain expression during these important changes associated with migration was also studied.

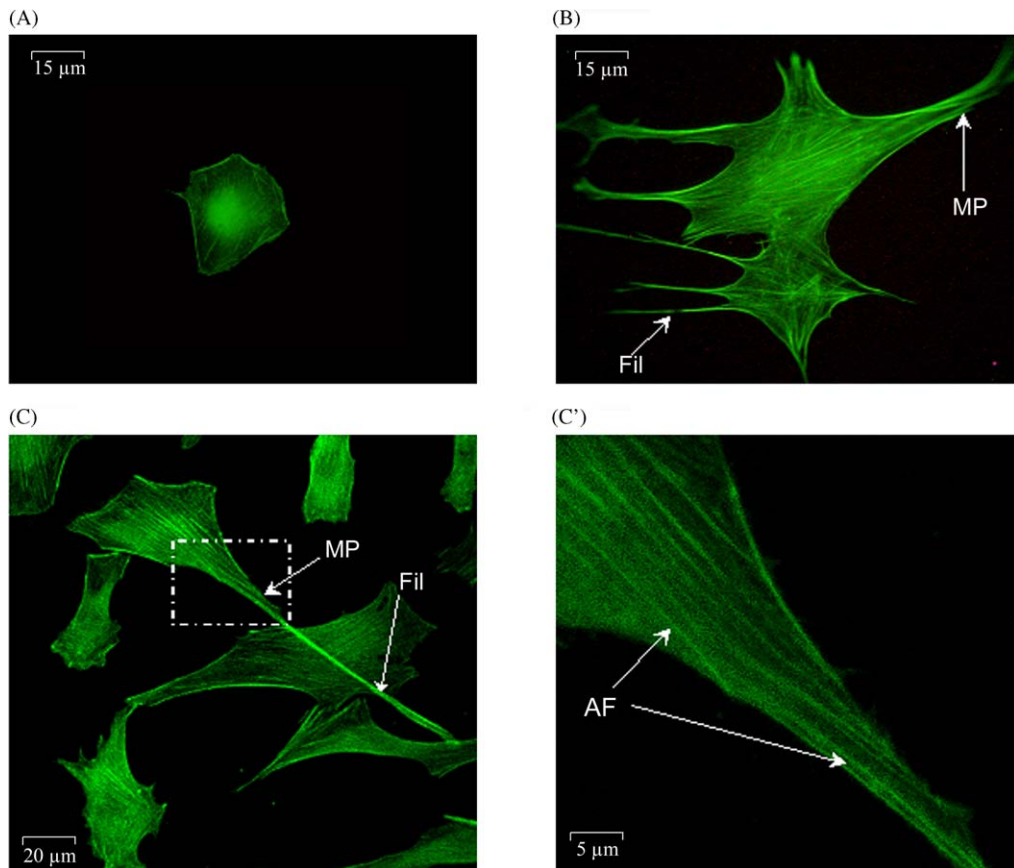


Fig. 1. Cell morphology and stress-fibre organisation. C2C12 myoblasts were plated onto cover slips coated with gelatine during 5 (A) or 24 h (B, C and C'). Cells were fixed with PAF 4%, then dehydrated and permeabilised with Triton X-100 (1%). Actin was stained with phalloidin-FITC (0.5 μ M). Images were collected using an immunofluorescence microscope (A and B) and confocal microscopy (C and C'). After 5 h in culture (A), the adhering cells presented very few actin fibres and no membrane protusion. After 24 h in culture (B, C and C'), the migrating cells presented numerous membrane protrusions (MP) and filopodia (Fil). The actin fibres (AF) were organised parallel to the axis of myoblast migration and sustained the membrane projections.

3.2. Analysis of calpain expression during myoblast migration

In order to study changes in calpain expression during myoblast migration, Western blots were carried out at four different times: 0 h after seeding, 5 h after seeding (end of adhesion and spreading), then 10 and 24 h after seeding (myoblasts in full migration). As reported in Fig. 2A and B, there were major changes in μ -calpain and m-calpain expression. μ -Calpain expression decreased dramatically, by 56%, between 0 and 24 h (Fig. 2E). In contrast, m-calpain expression increased between the time of seeding and 24 h. Maximum expression, about a 44% increase, was noted after 10 h in culture (Fig. 2F). These results show that the important changes observed in cell morphology are accompanied by significant mod-

ifications in calpain expression. These results clearly indicated that the expression pattern of each ubiquitous calpain during myoblast migration was totally different: μ -calpain expression decreased while m-calpain expression increased. These results, together with those previously obtained in our laboratory (Dedieu et al., 2003), confirm that m-calpain is implicated in the myoblast migration process. Some previous studies (Glading et al., 2002) have reported that μ -calpain is implicated in cell spreading and adhesion, which may explain the high expression of μ -calpain before myoblast migration and its decrease during the migration process.

Expression of calpastatin, the endogenous calpain inhibitor, was also studied. Major changes were observed in calpastatin expression, as shown in Fig. 2C and G. Calpastatin levels increased significantly after 5 h (about

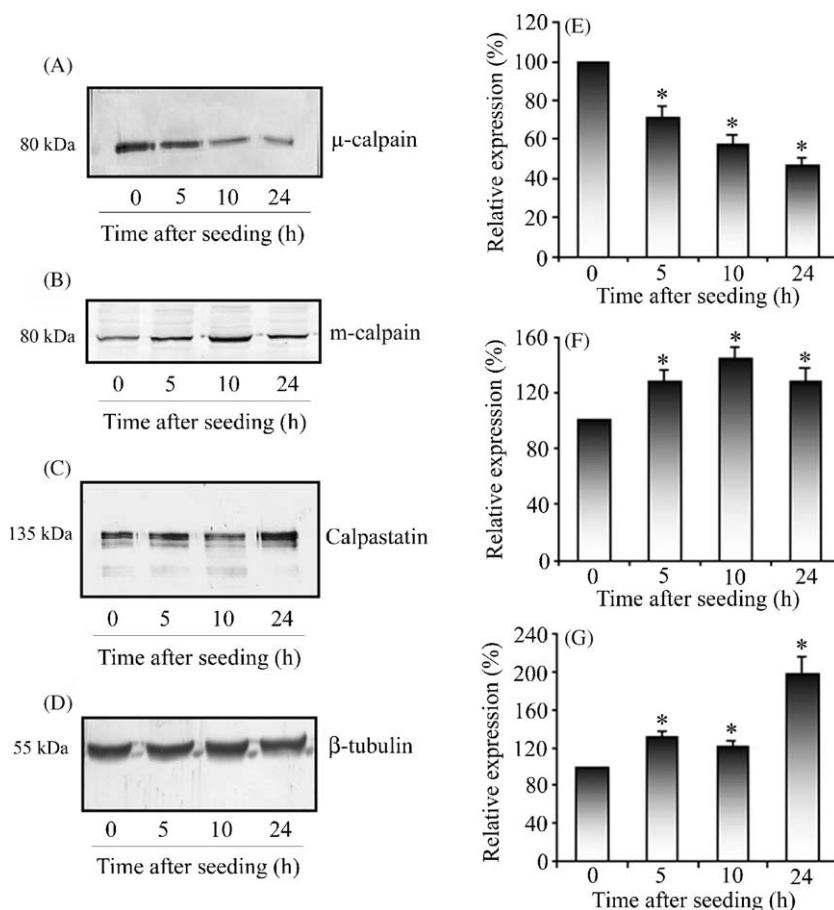


Fig. 2. Expression of μ -calpain (A and E), m-calpain (B and F), and calpastatin (C and G) in C2C12 myoblasts at different times after seeding. Myogenic cells were seeded in quiescent medium (DMEM plus 0.1% FBS). Proteins from the myoblasts were extracted 0, 5, 10, and 24 h after seeding and subjected to SDS-PAGE. Immunodetection was carried out using specific antibodies for μ -calpain (A), m-calpain (B), calpastatin (C), and β -tubulin (D). Sample loading was controlled by immunodetection of β -tubulin (D). Pictures shown are representative of at least three separate sets of cultures. The expressions of μ -calpain (E), m-calpain (F) and calpastatin (G) were quantified and expressed as a percentage compared to the levels obtained at time 0. Bars on the graph represent the standard deviation for at least three separate experiments. *Significantly different from the control ($\alpha < 0.05$).

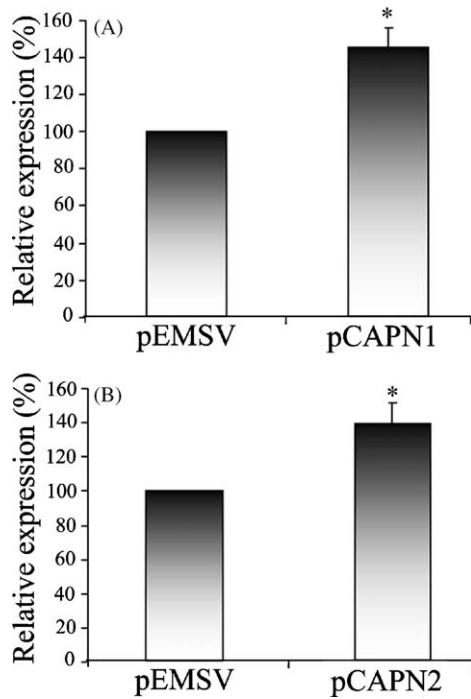


Fig. 3. Overexpression of ubiquitous calpains by transfection. Myoblasts were transfected with pCAPN1 (coding for catalytic subunit of μ -calpain, A) or pCAPN2 (m-calpain, B) plasmids. After 48 h in culture, total proteins were harvested and subjected to an SDS-PAGE. Results were expressed in comparison to cells transfected with an appropriate empty vector (pEMS). Results were representative of at least three experiments. *Significantly different from control ($\alpha < 0.05$).

31%), while the increase after 10 h in culture was smaller (20%). A huge increase (97%) was also observed after 24 h in culture (Fig. 2G).

3.3. Calpain overexpression reduces myoblast migration

As the calcium-dependent proteolytic system is apparently involved in regulating migration (Dedieu et al., 2004), it was hypothesised that myoblast migration could be enhanced by increasing calpain expression. In these experiments, C2C12 myoblasts were transfected with pCAPN1 (containing cDNA encoding for μ -calpain), pCAPN2 (containing cDNA encoding for m-calpain), or pEMS (control) plasmids in order to overexpress μ - or m-calpain in these cells. As shown in Fig. 3, μ -calpain expression increased in the cells transfected with pCAPN1 in comparison to those transfected with pEMS. Similarly, m-calpain expression increased after transfection with the pCAPN2 plasmid. Measurements in transfected cells indicated that m-calpain expression increased by 39% with pCAPN2 and μ -calpain expres-

sion increased by 45% after transfection with pCAPN1. In contrast, μ -calpain levels remained unchanged after transfection with pCAPN2, as did m-calpain levels in cells transfected with pCAPN1 (data not shown).

The migration rates of cells transfected with pCAPN1 or pCAPN2 were quantified by wound-healing assays and compared with those of cells transfected with pEMS. The results were expressed as percentages, as shown in Fig. 4. In both cases, a reduction in myoblast migration was observed. μ -Calpain overexpression induced a decrease in migration of about 41%, while migration of cells overexpressing m-calpain decreased by about 43%.

In order to study possible morphological changes and/or cytoskeletal disorders caused by μ - or m-calpain overexpression in C2C12 myoblasts, transfected cells were fixed 48 h after transfection and stained using FITC-phalloidin. As shown in Fig. 5, calpain overexpression induced major changes in the organisation of the actin fibres. Although the cells transfected with pCAPN1

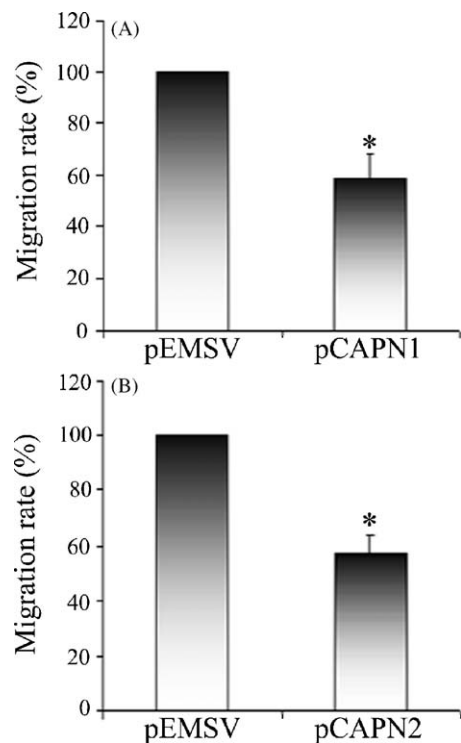


Fig. 4. Quantification of myoblast migration after ubiquitous calpain overexpression. The myoblasts were transfected with pCAPN1 (coding for catalytic subunit of μ -calpain, A) or pCAPN2 (m-calpain, B) plasmids. After 48 h in culture, C2C12 migration was studied by wound-healing assays. Results were expressed in comparison to cells transfected with an appropriate empty vector. Results were representative of at least three experiments. *Significantly different from control ($\alpha < 0.05$).

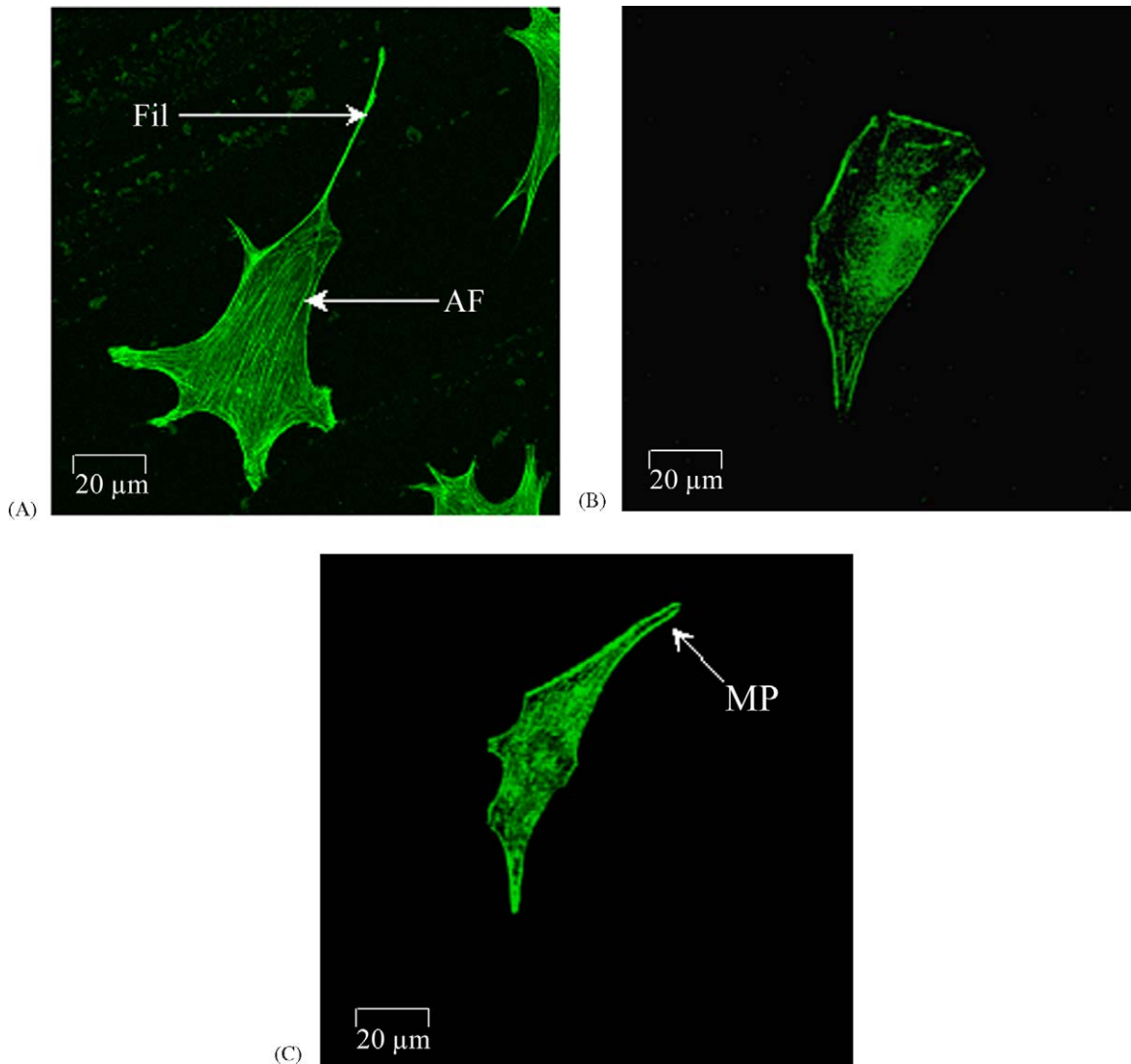


Fig. 5. Cell morphology and stress-fibre organisation of myoblasts transfected with empty plasmids (A), or plasmids coding for μ -calpain (B) or m-calpain (C). C2C12 myoblasts were transfected with pEMSV (empty, A), pCAPN1 (coding for μ -calpain, B) or pCAPN2 (m-calpain, C) plasmids. After 48 h, cells were fixed, dehydrated, and permeabilised using Triton X-100 (1%). The actin cytoskeleton was stained with phalloidin-FITC (0.5 μ M). Images were collected using an immunofluorescence microscope. The actin cytoskeleton observed for the cells transfected with pCAPN1 and pCAPN2 (B and C, respectively) was disorganised and these cells had few actin fibres (AF). However, they were elongated in shape with membrane protrusions (MP) and filopodia (Fil).

or pCAPN2 presented the same elongated shape as control myoblasts, the actin cytoskeleton was totally disorganised. The cells were coloured for actin but stress fibres had practically disappeared. Thus, calpain overexpression clearly disorganises actin fibres, which is probably responsible for the decrease in migration. Many studies have already shown the implication of calpains in the organisation of the actin cytoskeleton (Dourdin et al., 2001; Potter et al., 1998) and the important role played by the actin cytoskeleton in migration (Webb, Parsons, & Horwitz, 2002; Wehrle-Haller & Imhof, 2003).

Like many others proteases, calpain activities are controlled and regulated by numerous factors to avoid abnormal proteolysis. Under our experimental conditions, calpain overexpression was not physiological and the regulation of calpain activity was probably severely disturbed. An anarchistic proteolysis caused by this overexpression may be responsible for the disorganisation of the cytoskeleton and impaired migration. Moreover, the physiological localisation of calpains in myoblasts (Mazères et al., 2006) was almost certainly disturbed by overexpression, thus inducing anarchistic proteoly-

sis. Consequently, it seems highly probable that over-expression of proteases known to degrade numerous cytoskeletal proteins, e.g. talin, desmin, and MARCKS, induced dramatic changes in adhesion and migration. It may also be assumed that the degradation of certain proteins known to be responsible for the stability of the actin cytoskeleton, e.g. fascin, troponin or tropomyosin, by calpains was responsible for stress-fibre disorganisation. Indeed, some of these proteins are potential calpain

substrates (Barnoy, Glaser, & Kosower, 1998; Gao et al., 1997). Moreover, calpains are known to be capable of degrading RhoA, which is involved in actin filament assembly (Kulkarni, Goll, & Fox, 2002). Consequently, as non-physiological modifications in the calpain balance induced dramatic changes in myoblast motility, we decided to use physiological pathways to enhance migration via calpain stimulation. Growth factors are excellent candidates, as some of them, e.g. EGF, are

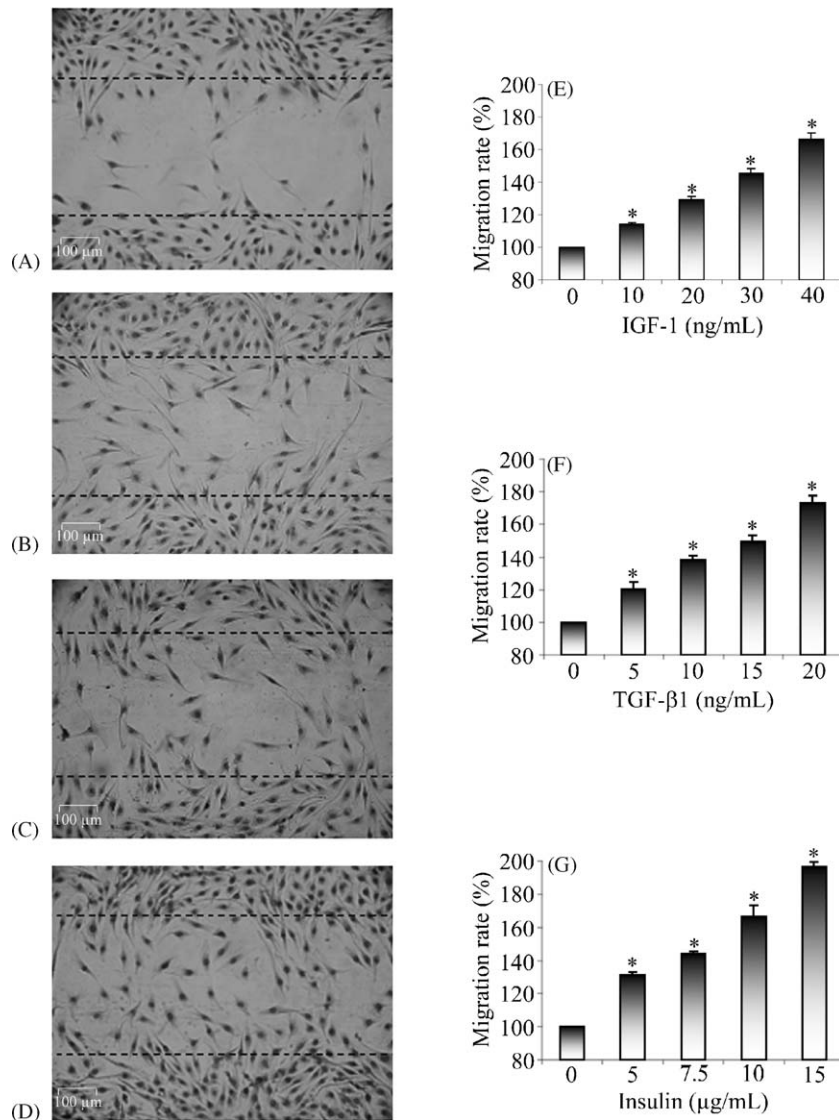


Fig. 6. Quantification of myoblast migration after growth-factor treatments. C2C12 myoblasts were cultured for 24 h until 80% of confluence. After 48 h in a quiescent medium, confluent myoblasts were scraped using a plastic pipette tip in order to create a wound. The medium was removed and replaced with DMEM with PBS (control, A), IGF-1 (40 ng/mL, B; 10–40 ng/mL, E), TGF-β1 (20 ng/mL, C; 5–20 ng/mL, F), or insulin (15 μg/mL, D; 5–15 μg/mL, G). After 24 h treatment, the cells were fixed, coloured and counted. Results obtained after growth-factor treatments were expressed as a percentage in comparison to cells treated with PBS only. Experiments were repeated four times and error scale bars show standard deviation. *Significantly different from control ($\alpha < 0.05$).

capable of stimulating migration in other cell types, such as fibroblasts (Glading et al., 2000; Iwabu, Smith, Allen, Lauffenburger, & Wells, 2004).

3.4. Myoblast motility is enhanced by growth-factor treatments

Taking into account previous work on myoblast fusion, two growth factors and a hormone were chosen: insulin-like growth factor 1 (IGF-1), transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), and insulin (Cottin et al., 1994). Each growth factor was used at four different concentrations in wound-healing assays to establish the concentration that had an optimal effect on myoblast migration.

As shown in Fig. 6, increased migration was observed with all treatments. Under our experimental conditions and at the concentrations used, the maximum effect was obtained with insulin. In contrast, the least marked effect was observed after adding IGF-1. Migration rates, expressed as percentages, are shown in Fig. 6. We observed that all three treatments were capable of significantly increasing migration in a dose-dependent manner: maximum effects were obtained at the highest concentrations.

As reported in Fig. 6E, IGF-1 treatment induced increases in migration ranging from 14.1% (10 ng/mL) to 66.4% (40 ng/mL). As shown in Fig. 6F, the lowest concentration of TGF- β 1 (5 ng/mL) induced an increase of 20.3% and the highest concentration (20 ng/mL) induced the maximum increase (73.2%). Insulin treatment had the greatest impact: 15 μ g/mL insulin increased myoblast migration by 96.6% (Fig. 6G).

These findings are consistent with results obtained using other growth factors (Allen et al., 2003) or cell types (keratinocytes (Shirakata et al., 2005); fibroblasts (Iwabu et al., 2004)) and clearly show that IGF-1, TGF- β 1, and insulin stimulate myoblast migration.

3.5. Calpain activity is required for growth factor-induced myoblast migration

To confirm the involvement of calpains in the increased migration mediated by growth factors, calpain activity was inhibited by adding calpeptin, a pharmacological calpain inhibitor. Wound-healing assays took place in the presence of IGF-1, TGF- β 1, and insulin, with or without calpain inhibitor. As presented in Fig. 7, calpeptin strongly inhibited growth factor-mediated migration. In fact, in the presence of calpeptin (80 μ M), myoblast migration induced by IGF-1 was inhibited by 90.7%. The addition of 80 μ M calpeptin inhibited

TGF- β 1-induced and insulin-mediated migration by 92.5% and 83.4%, respectively. As indicated in Fig. 7, calpeptin restricted growth factor-induced migration in a dose-dependent manner.

Wound-healing assays were also carried out using C2C12 that stably overexpress calpastatin, the specific, endogenous calpain inhibitor. These cells (already described by Dedieu et al., 2004) were treated with the various growth factors at the same concentrations used for the calpeptin experiments. Migration was measured and compared to the migration of untransfected cells under the same conditions. Like calpeptin, calpastatin overexpression induced a strong inhibition in growth factor-mediated migration. Indeed, calpastatin overexpression reduced the migration induced by IGF-1,

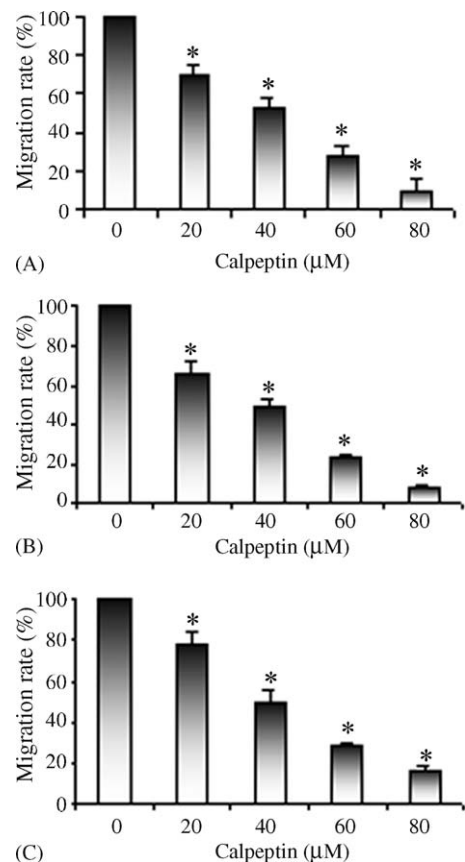


Fig. 7. Calpeptin blocks growth factor-induced myoblast migration. The effect of calpeptin, a pharmacological calpain inhibitor, on growth factor-induced migration was studied using an in vitro wound-healing assay. IGF-1 (A, 40 ng/mL), TGF- β 1 (B, 20 ng/mL), or insulin (C, 15 μ g/mL) were added to the medium, with or without calpeptin (20, 40, 60 or 80 μ M). After 24 h in culture, migration was quantified and expressed as a percentage in comparison to the results obtained with growth factors in the absence of calpeptin. Each experiment was performed in triplicate. *Significantly different from control ($\alpha < 0.05$).

TGF- β 1, and insulin by 87.7%, 94.7% and 93.6%, respectively (data not shown). These results confirm those obtained using calpeptin, supporting the hypothesis that the calcium-dependent proteolytic system plays an important role in growth factor-induced migration.

3.6. *m*-Calpain expression increased by growth-factor and hormone treatments

To confirm that the calcium-dependent proteolytic system is required for growth factor-induced migration and elucidate the involvement of calpains in this phenomenon, the expression of ubiquitous calpains and their endogenous inhibitor, calpastatin, were studied. The expression rate of each protein was measured 24 h after adding growth factors or insulin. The concentrations used were capable of inducing a maximum increase in migration (40 ng/mL for IGF-1, 20 ng/mL for TGF- β 1, and 15 μ g/mL for insulin).

The Western blots and quantification of each protein are presented in Fig. 8. Firstly, we observed that only TGF- β 1 had an effect on μ -calpain expression. Indeed, expression increased about 1.5-fold when TGF- β 1 was added. No significant variations in μ -calpain expression levels were observed after IGF-1 or insulin treatments (Fig. 8A and E).

In contrast, the three treatments significantly enhanced expression levels of *m*-calpain. In the presence of IGF-1, the amount of *m*-calpain increased by 28.8% and the effect of TGF- β 1 was even more marked (about 35%). The maximum effect, a 53% increase, was observed after insulin treatment (Fig. 8B and F). Correlatively with migration, we observed that IGF-1 had the least marked effect and insulin the strongest.

No significant variations in calpastatin expression (Fig. 8C and G) were observed after a 24-h treatment with the various growth factors.

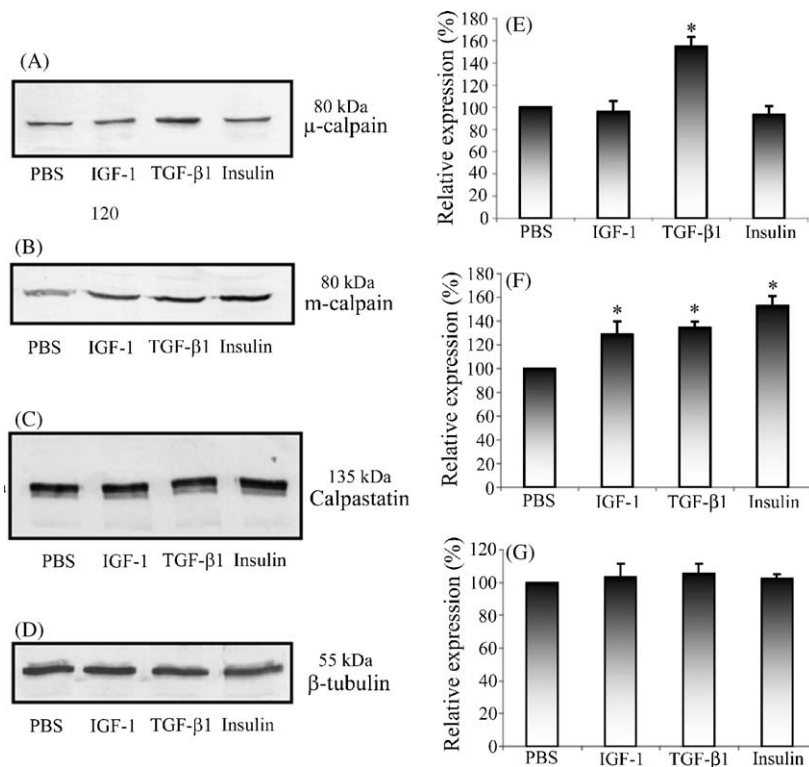


Fig. 8. Expression of μ -calpain (A and E), *m*-calpain (B and F), and calpastatin (C and G) in C2C12 myoblasts after different growth-factor treatments. Myogenic cells were incubated in a quiescent medium with PBS, IGF-1 (40 ng/mL), TGF- β 1 (20 ng/mL), or insulin (15 μ g/mL) for 24 h. Total proteins were extracted from the myoblasts and subjected to SDS-PAGE. Immunodetection was carried out using anti- μ -calpain (A), anti-*m*-calpain (B), anti-calpastatin (C), and anti- β -tubulin antibodies (D). Sample loading was controlled by immunodetection of β -tubulin (D). Pictures shown are representative of three experiments. Expressions of μ -calpain (E), *m*-calpain (F) and calpastatin (G) were quantified and expressed as a percentage compared to the expression level obtained in the presence of PBS. Bars on the graph represent the standard deviation for three separate experiments. *Significantly different from the corresponding control ($\alpha < 0.05$).

It is interesting to note that no significant changes were observed in myoblast morphology or stress fibres after growth-factor treatment (data not shown).

3.7. Growth-factor treatments induced an increase in m-calpain activity

The activities of ubiquitous calpains were studied using casein zymography to verify that higher calpain expression was accompanied by an increase in activity and determine whether growth factors were also capable of activating calpains. As in the protease expression level study, cells were treated with growth factors for 24 h.

The results obtained using casein zymography are presented in Fig. 9A. Firstly, no significant variations in μ -calpain activity were observed after the various treatments, as shown in Fig. 9B. Indeed, the μ -calpain activity measured after treatment was the same as control. The increase in μ -calpain expression demonstrated by Western blotting after TGF- β 1 treatment had no effect on the activity measurement, suggesting that μ -calpain synthesised after the addition of TGF- β 1 had very little or no activity. Calpains are proteases whose activity is strongly controlled by numerous factors, such as calpastatin, phospholipids, and phosphorylation. It is now acknowledged that different phosphorylations either activate (e.g. ERK) or inhibit (e.g. PKA) calpain activity. These regulations prevent a strongly detrimental anarchistic proteolysis. We hypothesise that the fact that activity of the μ -calpain overexpressed after TGF- β 1 addition did not increase under our experimental conditions was due to strong regulation.

In contrast, significant increases in m-calpain activity were observed after adding IGF-1, TGF- β 1, and insulin (49%, 62%, and 99%, respectively, Fig. 9C). In contrast to μ -calpain, the results obtained for m-calpain correlated with Western blotting observations.

Under our experimental conditions, as previously described for calpain expression, insulin had the strongest effect and IGF-1 the weakest.

It is not surprising that growth factors did not have the same effect on μ - and m-calpain. Indeed, a recent study showed that m-calpain was involved in EGF-mediated keratinocyte migration, while μ -calpain was implicated in IP-9-mediated migration (Satish, Blair, Glading, & Wells, 2005). Consequently, m-calpain and μ -calpain may both be involved in migration but not by the same pathways. This differential implication of the two ubiquitous calpain isoforms in migration may explain why the growth factors used in this study increased μ -calpain expression but had no effect on activity, while they induced a major increase in m-calpain expression and

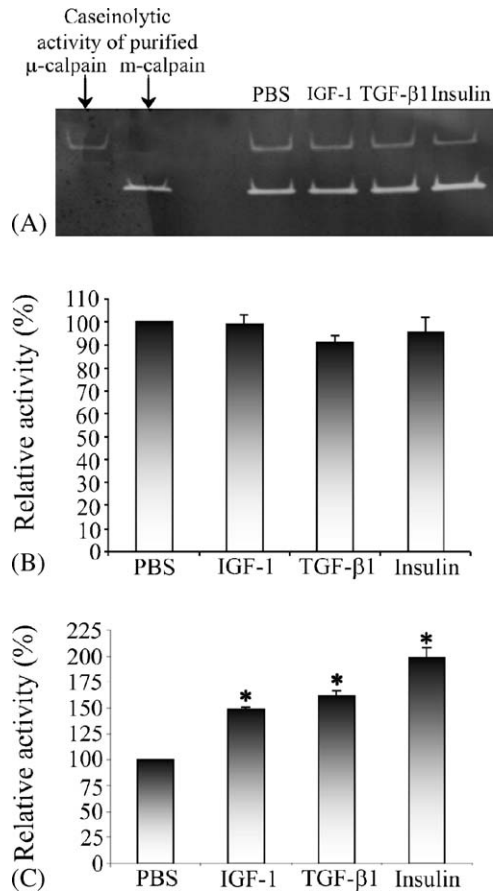


Fig. 9. Quantification of calpain activity by casein zymography. Myoblasts were incubated for 24 h in a quiescent medium in the presence of PBS, IGF-1 (40 ng/mL), TGF- β 1 (20 ng/mL), or insulin (15 μ g/mL). Total proteins were extracted under non-denaturing conditions and migrated in gels containing FITC-casein. Gels were then incubated in Ca^{2+} buffers three times. FITC-casein gels were observed using Typhoon (A). Image shown was representative of three different experiments. μ -Calpain activity (B) and m-calpain activity (C) were quantified and expressed as a percentage compared to control. Bars on the graphs represent the standard deviation for three separate experiments. *Significantly different from the control ($\alpha < 0.05$).

activity. Moreover, no variation in calpastatin expression was observed after adding growth factors, suggesting that the increase in calpain activity was not controlled by the endogenous inhibitor.

The increase in m-calpain activity was probably due to the increase in m-calpain expression after the addition of growth factors. However, this increase may also be due to post-translational regulation, e.g. phosphorylation, of this protease. Several pathways may be involved in the significant increases in m-calpain expression and activity. Concerning the expression of m-calpain, earlier studies have already shown that myogenic factors, in particular MyoD and myogenin, are able to up-regulate

capn2 expression (Dedieu et al., 2003). In addition, other work has shown that growth factors, particularly IGFs, are able to enhance the transcriptional activity of MyoD and MEF2, via activation of the PI3K/Akt pathway (Xu & Wu, 2000). Activation of MyoD and MEF2 transcriptional activity by PI3K/Akt may thus be responsible for the increase in m-calpain expression observed after IGF-1 and insulin treatments. Although the effects of TGF- β 1 are mainly mediated by the well-characterised Smad pathway (Heldin, Miyazono, & Ten Dijke, 1997; Yamamoto et al., 1997), it is also capable of increasing migration of epithelial cells by activating the ERK/MAPK pathway (Imamichi et al., 2005). The ERK/MAPK pathway is also capable of inducing an increase in MyoD expression and activity (Gredinger, Gerber, Tamir, Tapscott, & Bengal, 1998). The three growth factors used in this study may, thus, be capable of acting on MyoD expression and/or activity and, therefore, regulating m-calpain expression.

The increase in m-calpain expression observed with growth factors was probably responsible for its increased activity. However, the increase in activity observed after growth-factor treatments was clearly larger than the increase in m-calpain expression. One hypothesis is that the growth factors are involved in a post-translational regulation, such as phosphorylation.

As previously stated, the three growth factors used are capable of activating the ERK/MAPK pathway. We suggest that m-calpain activity may be enhanced by phosphorylation on serine 50 via this signalling pathway. This type of EGF activation has already been demonstrated in fibroblasts (Glading et al., 2000). The ERK/MAPK pathway may also induce an increase in MyoD expression and/or transcriptional activity, leading to an increase in m-calpain expression.

Taken together, our findings confirm the importance of the role played by calcium-dependent proteolysis in myoblast migration and the regulation of growth factor-mediated migration. Indeed, our results show that growth-factor treatments enhance myoblast migration and that calcium-dependent proteolysis is strongly involved in this phenomenon. The major increase in m-calpain expression and activity after growth-factor treatments indicate that m-calpain plays a role in growth factor-mediated migration, but we cannot exclude the possibility that μ -calpain may also be implicated in this phenomenon. The signalling pathways used by the growth factors to recruit m-calpain are still unclear, but ongoing research in our laboratory should give us a clearer understanding of this phenomenon. Moreover, the respective roles played by each calpain in growth factor-mediated migration are still unclear. Experiments

are currently in progress in our laboratory to elucidate this point.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Association Française contre les Myopathies (AFM-11302) and from Institut National de Recherche Agronomique (INRA-France, PHASE department).

References

- 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.
- Allen, D. L., Teitelbaum, D. H., & Kurachi, K. (2003). Growth factors stimulation of matrix metalloproteinase expression and myoblast migration and invasion in vitro. *Am. J. Cell Physiol.*, *284*, 805–815.
- Arthur, J. S., & Mykles, D. L. (2000). Calpain zymography with casein or fluorescein isothiocyanate casein. *Meth. Mol. Biol.*, *144*, 109–116.
- 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.
- Averna, M., De Tullio, R., Capini, P., Salamino, F., Pontremoli, S., & Melloni, E. (2003). Changes in calpastatin localisation and expression during calpain activation: A new mechanism for the regulation of intracellular Ca²⁺-dependent proteolysis. *Cell. Mol. Life Sci.*, *60*, 2669–2678.
- Barnoy, S., Glaser, T., & Kosower, N. S. (1998). The calpain-calpastatin system and protein degradation in fusing myoblasts. *Biochim. Biophys. Acta*, *1402*, 52–60.
- Barnoy, S., Glaser, T., Nechama, S., & Kosower, N. S. (1996). The role of calpastatin (the specific inhibitor) in myoblast differentiation and fusion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, *220*, 933–938.
- Barnoy, S., Maki, M., & Kosower, N. S. (2005). Overexpression of calpastatin inhibits L8 myoblast fusion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, *332*, 697–701.
- Barnoy, S., Supino-Rosin, L., & Kosower, N. S. (2000). Regulation of calpain and calpastatin in differentiating myoblasts: mRNA levels, protein synthesis and stability. *Biochem. J.*, *351*, 413–420.
- Bhatt, A., Kaverina, I., Otey, C., & Huttenlocher, A. (2002). Regulation of focal complex composition and disassembly by the calcium-dependent protease calpain. *J. Cell Sci.*, *115*, 3415–3425.
- Biswas, S., Harris, F., Singh, J., & Phoenix, D. A. (2004). The in vitro retardation of porcine cataractogenesis by the calpain inhibitor, SJA 6017. *Mol. Cell Biochem.*, *261*, 169–173.
- Brustis, J.-J., Elamrani, N., Balcerzak, D., Safwate, A., Soriano, M., Poussard, S., Cottin, P., & Ducastaing, A. (1994). Rat myoblast fusion requires exteriorised m-calpain activity. *Eur. J. Cell Biol.*, *64*, 320–327.
- Carragher, N. O., & Frame, M. C. (2002). Calpain: A role in cell transformation and migration. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, *34*, 1539–1543.
- 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*, S19–S25.
- Dedieu, S., Mazères, G., Cottin, P., & Brustis, J.-J. (2002). Involvement of myogenic factors during fusion in the cell line C2C12. *Int. J. Dev. Biol.*, *46*, 235–241.
- Dedieu, S., Mazères, G., Dourdin, N., Cottin, P., & Brustis, J.-J. (2003). Transactivation of *capn2* by myogenic regulatory factors during myogenesis. *J. Mol. Biol.*, *326*, 453–465.
- Dedieu, S., Poussard, S., Mazères, 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.
- 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., Bhatt, A. K., Dutt, P., Greer, P. A., Arthur, J. S. C., Elce, J. S., & Huttenlocher, A. (2001). Reduced cell migration and disruption of the actin cytoskeleton in calpain-deficient embryonic fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, *276*, 48382–48388.
- 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.
- Gao, W. D., Atar, D., Liu, Y., Perez, N. G., Murphy, A. M., & Marban, E. (1997). Role of troponin I proteolysis in the pathogenesis of stunned myocardium. *Circ. Res.*, *80*, 393–399.
- 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., Lauffenburger, D. A., & Wells, A. (2002). Cutting to the chase: Calpain proteases in cell motility. *Trends Cell Biol.*, *12*, 46–54.
- 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., Dayton, W. R., Singh, I., & Robson, R. M. (1991). Studies of the alpha-actinin/actin interaction in the Z-disk by using calpain. *J. Biol. Chem.*, *266*, 8501–8510.
- Goll, D. E., Thompson, V. F., Li, H., Wei, W., & Cong, J. (2003). The calpain system. *Physiol. Rev.*, *83*, 731–801.
- Gredinger, E., Gerber, A. N., Tamir, Y., Tapscott, S. J., & Bengal, E. (1998). Mitogen-activated protein kinase pathway is involved in the differentiation of muscle cells. *J. Biol. Chem.*, *273*, 10436–10444.
- Heldin, C. H., Miyazono, K., & Ten Dijke, P. (1997). TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*, *390*(6659), 465–471.
- Imamichi, Y., Waidmann, O., Hein, R., Eleftheriou, P., Giel, K., & Menke, A. (2005). TGF beta-induced focal complex formation in epithelial cells is mediated by activated ERK and JNK MAP kinases and is independent of Smad4. *Biol. Chem.*, *386*, 225–236.
- Iwabu, A., Smith, K., Allen, F. D., Lauffenburger, D. A., & Wells, A. (2004). Epidermal growth factor induces fibroblast contractility and motility via a protein kinase C delta-dependent pathway. *J. Biol. Chem.*, *279*, 14551–14560.
- Kulkarni, S., Goll, D. E., & Fox, J. E. (2002). Calpain cleaves RhoA generating a dominant-negative form that inhibits integrin-induced actin filament assembly and cell spreading. *J. Biol. Chem.*, *277*, 24435–24441.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structure protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, *227*, 680–685.
- Lafrenière, J. F., Mills, P., Tremblay, J. P., & Fahime, E. E. (2004). Growth factors improve the in vivo migration of human skeletal myoblasts by modulating their endogenous proteolytic activity. *Transplantation*, *77*, 1741–1747.
- Lambrechts, A., Van Troys, M., & Ampe, C. (2004). The actin cytoskeleton in normal and pathological cell motility. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, *36*, 1890–1909.
- 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.
- 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.
- 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.
- Mazères, 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.
- Menard, H. A., & El-Amine, M. (1996). The calpain-calpastatin system in rheumatoid arthritis. *Immunol. Today*, *17*, 545–547.
- Moldoveanu, T., Jia, Z., & Davies, P. L. (2003). Calpain activation by cooperative Ca²⁺ binding at two non-EF-hand sites. *J. Biol. Chem.*, *279*, 6106–6114.
- Nixon, R. A. (2003). The calpains in aging and aging-related diseases. *Ageing Res. Rev.*, *2*, 407–418.
- Perrin, C., Vergely, C., & Rochette, L. (2004). Calpains and cardiac diseases. *Ann. Cardiol. Angeiol. (Paris)*, *53*, 259–266.
- Petit, V., & Thiery, J.-P. (2000). Focal adhesions: Structure and dynamics. *Biol. Cell*, *92*, 477–494.
- Potter, A. P., Tirnauer, J. S., Janssen, R., Croall, D. E., Hughes, C. N., Fiacco, K. A., Mier, J. W., Maki, M., & Herman, I. M. (1998). Calpain regulates actin remodeling during cell spreading. *J. Cell Biol.*, *141*, 647–662.
- 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.
- Raynaud, P., Jayat-Vignoles, C., Laforêt, M. P., Levéziel, H., & Amarger, V. (2005). Four promoters direct expression of the calpastatin gene. *Arch. Biochem. Biophys.*, *437*, 69–77.
- 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 kappa B alpha/nuclear factor kappa B pathway perturbation in mice. *J. Cell Biol.*, *151*, 1583–1590.
- Satish, L., Babu, M., Tran, K. T., Hebda, P. A., & Wells, A. (2004). Keloid fibroblast responsiveness to epidermal growth factor and activation of downstream intracellular signaling pathways. *Wound Repair Regen.*, *12*, 183–192.
- Satish, L., Blair, H. C., Glading, A., & Wells, A. (2005). Interferon-inducible protein 9 (CXCL11)-induced cell motility in keratinocytes requires calcium flux-dependent activation of m-calpain. *Mol. Cell Biol.*, *25*, 1922–1941.
- Sato, K., & Kawashima, S. (2001). Calpain function in the modulation of signal transduction molecules. *Biol. Chem.*, *382*, 743–751.
- Schád, E., Farkas, A., Jékely, G., Tompa, P., & Friedrich, P. (2002). A novel human small subunit of calpains. *Biochem. J.*, *362*, 383–388.

- Sheetz, M. P., Felsenfeld, D., Galbraith, C. G., & Choquet, D. (1999). Cell migration as a five-step cycle. *Biochem. Soc. Symp.*, 65, 223–243.
- Shirakata, Y., Kimura, R., Nanba, D., Iwamoto, R., Tokumaru, S., Morimoto, C., Yokota, K., Nakamura, M., Sayama, K., Mekada, E., Higashiyama, S., & Hashimoto, K. (2005). Heparin-binding EGF-like growth factor accelerates keratinocyte migration and skin wound healing. *J. Cell Sci.*, 118, 2363–2370.
- Singh, R. B., Dandekar, S. P., Elimban, V., Gupta, S. K., & Dhalla, N. S. (2004). Role of proteases in the pathophysiology of cardiac disease. *Mol. Cell Biochem.*, 263, 241–256.
- Suzuki, K., Saido, T. C., & Hirai, S. (1992). Modulation of cellular signals by calpain. *Ann. NY Acad. Sci.*, 674, 218–227.
- Temm-Grove, C. J., Wert, D., Thompson, V. F., Allen, R. E., & Goll, D. E. (1999). Microinjection of calpastatin inhibits fusion in myoblasts. *Exp. Cell Res.*, 247, 293–303.
- Webb, D. J., Parsons, J. T., & Horwitz, A. F. (2002). Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells—over and over and over again. *Nat. Cell Biol.*, 4, E97–E100.
- Wehrle-Haller, B., & Imhof, B. A. (2003). Actin, microtubules and focal adhesion dynamics during cell migration. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 35, 39–50.
- Yamamoto, N., Akiyama, S., Katagiri, T., Namiki, M., Kurokawa, T., & Suda, T. (1997). Smad1 and smad5 act downstream of intracellular signalings of BMP-2 that inhibits myogenic differentiation and induces osteoblast differentiation in C2C12 myoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 238, 574–580.
- Xu, Q., & Wu, Z. (2000). The insulin-like growth factor-phosphatidylinositol 3-kinase-Akt signaling pathway regulates myogenin expression in normal myogenic cells but not in rhabdomyosarcoma-derived RD cells. *J. Biol. Chem.*, 275, 36750–36757.

Résultats - Chapitre 3 :
Implication de la voie de signalisation ERK/MAPK lors de
l'activation de la m-calpaïne et de la migration des myoblastes

Article 3 : Involvement of ERK/MAP Kinase signalling pathway in m-calpain activation and myogenic cell migration.

Ludovic Leloup, Laetitia Daury, Germain Mazères, Patrick Cottin, and Jean-Jacques Brustis.
The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. En révision (2007).

Notre précédent travail a clairement démontré que les facteurs de croissance IGF-1, TGF- β 1 et insuline activent la migration des myoblastes *via* la stimulation de l'expression et de l'activité des calpaïnes. Toutefois, la ou les voies de signalisation cellulaire impliquées dans ce phénomène restent encore inconnues.

Selon un petit nombre de travaux, les trois facteurs de croissance utilisés au cours de nos investigations sont susceptibles d'activer plusieurs voies de signalisation cellulaire dont les principales sont la voie ERK/MAPK (Imamichi *et al.*, 2005 ; Phornphutkul *et al.*, 2004 ; Willaime-Morawek *et al.*, 2005 ; cf. Introduction) et la voie PI3K/Akt (Martin *et al.*, 2006 ; Rodriguez-Barbero *et al.*, 2006 ; Scott *et al.*, 2005; cf. Introduction).

D'autres facteurs pourraient intervenir en aval des voies de signalisation cellulaire, c'est notamment le cas des facteurs myogéniques MyoD et myogénine. Ces derniers pourraient être responsables de l'augmentation du niveau d'expression de la m-calpaïne observée après l'addition des facteurs de croissance. En effet, des travaux réalisés précédemment au laboratoire ont mis en évidence l'existence d'une régulation du gène *capn2* par ces deux MRF (Dedieu *et al.*, 2003). De plus, selon les travaux de Xu et Wu (2000) et de Gredinger *et al.* (1998), les voies ERK/MAPK et PI3K/Akt pourraient stimuler l'expression et/ou l'activité de ces deux facteurs.

Le but de ce travail est donc d'identifier la (les) voie(s) de signalisation cellulaire utilisée(s) par les facteurs de croissance pour stimuler l'expression et l'activité de la m-calpaïne et corrélativement augmenter la migration des myoblastes. Dans un premier temps, la migration des myoblastes a été quantifiée après traitements aux facteurs de croissance, en présence ou en absence d'inhibiteur des voies ERK/MAPK et PI3K/Akt. Ces investigations

permettent d'identifier l'inhibiteur susceptible de contrecarrer les effets des facteurs de croissance sur la migration et d'en déduire la voie de signalisation responsable de ce phénomène. Pour établir une corrélation avec l'évolution des calpaïnes, l'expression et l'activité de la m-calpaïne ont été quantifiées dans les mêmes conditions expérimentales. L'éventuelle implication de MyoD et de la myogénine a été testée en mesurant par qRT-PCR l'évolution des messagers en présence des différents facteurs de croissance.

Principaux résultats :

✓ La voie de signalisation ERK/MAPK est responsable de l'augmentation de la migration induite par les trois facteurs de croissance. La voie PI3K/Akt ne semble pas impliquée dans ce phénomène. En effet l'inhibiteur de MEK1 (PD98059) contrecarre les effets de l'IGF-1, du TGF- β 1 et de l'insuline sur la migration des myoblastes. *A contrario*, le LY294002 (inhibiteur de PI3K) n'a aucun effet sur la migration induite par les facteurs de croissance.

✓ La voie ERK/MAPK est responsable de la stimulation de l'expression de la m-calpaïne par les facteurs de croissance. En effet l'ajout de l'inhibiteur de MEK1 suffit à prévenir l'augmentation d'expression induite par l'IGF-1, le TGF- β 1 et l'insuline.

✓ La voie de signalisation ERK/MAPK est également impliquée dans l'augmentation de l'activité de la m-calpaïne. Ces résultats concernant l'activité protéolytique sont corrélés avec ceux obtenus lors de l'étude de l'expression de cette protéase.

✓ Le niveau d'expression du gène *myod* reste inchangé après ajout d'IGF-1 et d'insuline. Au contraire, l'addition de TGF- β 1 entraîne une forte réduction de ce niveau d'expression. L'ajout de l'inhibiteur PD98059 ne permettant pas de contrecarrer les effets du TGF- β 1, l'inhibition de l'expression de MyoD par ce facteur semble indépendante de la voie ERK/MAPK. La réduction importante de l'expression de ce facteur ne semble pas déterminante lors de la migration induite par le TGF- β 1. Des investigations similaires ont été réalisées pour la myogénine. Aucune variation du niveau d'expression n'ayant été observée, ce MRF ne semble pas impliqué dans la migration induite par les facteurs de croissance.

En conclusion, nos résultats montrent que les facteurs de croissance IGF-1, TGF- β 1 et insuline stimuleraient la migration des myoblastes ainsi que l'expression et l'activité de la m-calpaïne *via* la voie de signalisation ERK/MAPK. La voie PI3K/Akt ainsi que les MRF MyoD et myogénine ne semblent pas intervenir dans ce phénomène.

Classification: Original article

Involvement of the ERK/MAP Kinase signalling pathway in milli-calpain activation and myogenic cell migration

Ludovic Leloup¹, Laetitia Daury¹, Germain Mazères¹, Patrick Cottin¹, Jean-Jacques Brustis^{1,2}

Contacts:

Ludovic Leloup: ludovic.leloup@etu.u-bordeaux1.fr tel: +33 (0)5 40 00 36 48

Laetitia Daury: l.daury-joucla@istab.u-bordeaux1.fr tel: +33 (0)5 40 00 21 94

Germain Mazères: germain.mazeres@laposte.net tel: +33 (0)5 40 00 26 37

Patrick Cottin: p.cottin@istab.u-bordeaux1.fr tel: +33 (0)5 40 00 87 59

Jean-Jacques Brustis: jj.brustis@tpbcm.u-bordeaux1.fr tel: +33 (0)5 40 00 26 36

¹ Université Bordeaux 1, Laboratoire Biosciences de l'Aliment, INRA USC-2009, ISTAB, avenue des Facultés, 33405 Talence cedex, France.

Fax number: +33 (0)5 40 00 84 96

² Corresponding author: jj.brustis@tpbcm.u-bordeaux1.fr

Fax number: +33 (0)5 40 00 25 76

Abstract

Myogenic cell migration plays a crucial role in myogenesis, a phenomenon strongly implicating calpains. Recent research in our laboratory showed that IGF-1, TGF- β 1, and insulin were able to strongly stimulate myoblast migration by increasing milli-calpain expression and activity. However the signalling pathways involved in these phenomena remain unknown. Consequently, the aim of this study was to identify the signalling pathway(s) used by growth factors to stimulate milli-calpain expression and activity, resulting in increased myoblast migration. For this purpose, wound healing assays were carried out in the presence of growth factors with or without specific inhibitors of ERK/MAP kinase and PI3K/Akt pathways. The results clearly showed that only the ERK/MAPK pathway was involved. Secondly, in order to determine whether this pathway was also involved in milli-calpain regulation, the expression and activity of this protease were studied in cells treated with growth factor, alone or with ERK/MAP kinase inhibitor. The results obtained demonstrated that the ERK/MAPK pathway mediated the regulation of milli-calpain expression and activity by growth factors. The possible implication of MyoD and myogenin in these phenomena was then studied. Our findings showed clearly that the effects of growth factors were mediated by the ERK/MAPK pathway, while the PI3K/Akt pathway, MyoD, and myogenin were probably not involved.

Keywords: milli-calpain; myoblast migration; growth factors; ERK/MAPK pathway.

Abbreviations

BCA, bicinchoninic acid; DMEM, Dulbecco's modified Eagle medium; DMSO, dimethyl sulfoxide; DTT, DL-dithiothreitol; EGF, epidermal growth factor; EGTA, ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid; ERK, extracellular-signal regulated kinase; FAK, focal adhesion kinase; FBS, foetal bovine serum; IGF-1, insulin-like growth factor-1; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MARCKS, myristoylated alanine rich C kinase substrate; MEK, MAPK/ERK kinase; MEF-2, myocyte enhancer factor-2; NBT/BCIP, nitroblue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indoyl-1-phosphate; PBS, phosphate buffer saline; PKB, protein kinase B; PI3K, phosphatidylinositol 3 kinase; PVDF, polyvinylidene fluoride; TBS, tris buffer saline; TGF- β 1, transforming growth factor- β 1.

1. Introduction

The mammalian calpain family includes 14 different calcium-dependent neutral cysteine proteases. The members of this large family of tissue-specific or ubiquitous enzymes are also classified according to the presence or absence of EF-Hand. So-called “typical” calpains contain EF-Hand, whereas “atypical” calpains do not (Goll, Thompson, Li, Wei, & Cong, 2003). μ -calpain and m-calpain (also called calpain I and calpain II) are two ubiquitous members of this family. These typical calpains are heterodimeric enzymes constituted by a catalytic and a regulatory subunit. The μ -calpain catalytic subunit (CAPN1, 80 kDa) is encoded by the *capn1* gene and the m-calpain catalytic subunit (CAPN2, 80 kDa) by *capn2*. CAPN1 and CAPN2 are associated with one of the two small regulatory subunits, Css1 (for Calpain Small Subunit 1) or Css2. Css1 (former CAPN4) is a ubiquitous protein (30 kDa), encoded by the *capns1* gene, whereas Css2 is a tissue-specific protein (about 28 kDa), encoded by *capns2* (Schád, Farkas, Jékely, Tompa, & Friedrich, 2002). As calpains are proteases, their activities are regulated by numerous factors to prevent anarchistic proteolysis. Calcium is a necessary factor for calpain activation (Alderton & Steinhardt, 2000; Moldoveanu, Hosfield, Jia, Elce, & Davies, 2001; Pal, Elce, & Jia, 2001). However, the calcium concentrations necessary for calpain activation (5 to 50 μ M for μ -calpain and 0.2 to 1 mM for m-calpain, in vitro) are higher than the intracellular calcium concentration (0.2 to 1 μ M). Calpain activation thus requires other factors, such as phospholipid binding, autoproteolytic cleavage, and phosphorylation (by ERK) (Fernandez-Montalvan et al., 2006; Glading et al., 2004; Goll, Thompson, Li, Wei, & Cong, 2003; Inomata, Kasai, Nakamura, & Kawashima, 1988; Li, Thompson, & Goll, 2004; Saido, Shibata, Takenawa, Murofushi, & Suzuki, 1992; Suzuki, Saido, & Hirai, 1992). Myogenic regulatory factors (MRF) such as MyoD and myogenin also stimulate calpain activity and expression (Dedieu, Mazères,

Dourdin, Cottin, & Brustis, 2003). On the contrary, calpain activity is downregulated by calpastatin, its endogenous inhibitor, (Averna et al., 2003; Barnoy, Supino-Rosin, & Kosower, 2000; Temm-Grove, Wert, Thompson, Allen, & Goll, 1999), as well as PKA phosphorylation (Shiraha, Glading, Chou, Jia, & Wells, 2002).

Previous studies have shown that the calpain family may be implicated in several pathological phenomena, such as cataract formation, psoriasis, tumoral invasion, diabetes, rheumatoid arthritis, ischemia, neurodegenerative diseases, and muscular dystrophies (Biswas, Harris, Singh, & Phoenix, 2004; Cox, Hayes, Roe, Tsuchiya, & Bell, 2004; David, Shearer, & Shih, 1993; Mamoune, Luo, Lauffenburger, & Wells, 2003; Matsushita, Shimada, Kawara, Takehara, & Sato, 2005; Menard & El-Amine, 1996; Richard et al., 2000; Saito, Elce, Hamos, & Nixon, 1993; Tidball & Spencer, 2000). Moreover, calpains are also thought to be involved in numerous physiological and biological processes, such as signal transduction, cell-cycle regulation, apoptosis, myogenesis, cell adhesion, spreading, and motility (Atencio, Ramachandra, Shabram, & Demers, 2000; Carragher & Frame, 2002; Cottin et al., 1994; Dedieu et al., 2004; Huttenlocher et al., 1997; Mazères, Leloup, Daury, Cottin, & Brustis, 2006; Potter et al., 1998; Sato & Kawashima, 2001; Tan, Wu, De Veyra, & Greer, 2006).

Myoblast migration is an early, critical stage in myogenesis. Calpains may play a pivotal role in this process, since calpain inhibition by chemical inhibitors or calpastatin overexpression dramatically reduces myoblast motility (Dedieu et al., 2004). Inhibiting migration prevents myoblast alignment and fusion, and, thus, formation of multinucleated myotubes. Migration is a crucial phenomenon, described by various authors as a four- or five-stage process: cell membrane extension, formation of new focal adhesions at the front of the cell, contraction of the cytoplasm, and release of the contact sites at the rear of the migration cell. The fifth step consists of recycling the membrane receptor from the rear to the front of

the cell (Lauffenburger & Horwitz, 1996; Sheetz, Felsenfeld, Galbraith, & Choquet, 1999). Cell migration is also involved in other biological processes, such as wound repair, embryo development, tumour invasion, and immune response. Calpains are involved in cell migration, possibly by cleaving numerous proteins present in focal adhesions, including FAK (focal adhesion kinase), desmin, vinculin, paxillin, MARCKS (myristoylated alanin-rich C kinase substrate), and talin (Bhatt, Kaverina, Otey, & Huttenlocher, 2002; Dourdin et al., 1999; Goll, Dayton, Singh, & Robson, 1991). These proteins form complexes and link the actin cytoskeleton to integrins. The assembly and disassembly of these complexes, in particular by calpains, is responsible for cell migration (Lambrechts, Van Troys, & Ampe, 2004; Petit & Thiery, 2000).

Cell migration may be enhanced by numerous factors, particularly growth factors (Lafrenière, Mills, Tremblay, & Fahime, 2004). Epidermal growth factor (EGF), for example, is able to strongly increase fibroblast motility by activating calpains via the ERK/MAP kinase pathway (Glading, Chang, Lauffenburger, & Wells, 2000; Satish, Babu, Tran, Hebda, & Wells, 2004). Our recent work on myoblast migration showed that insulin-like growth factor (IGF-1), transforming growth factor (TGF- β 1), and insulin were capable of increasing myoblast motility significantly by enhancing m-calpain expression and activity (Leloup, Mazères, Daury, Cottin, & Brustis, 2006). Calpain activity was also shown to be required for growth factor-mediated migration. Indeed, inhibiting calpain activity by adding calpeptin or overexpressing calpastatin blocked the effects of growth-factors on myoblast migration (Leloup, Mazères, Daury, Cottin, & Brustis, 2006).

However, the signalling pathways involved in this phenomenon were not elucidated. Several signalling pathways were potentially responsible for myoblast migration and m-calpain activation by growth factors such as IGF-1, TGF- β 1, and insulin. The ERK/MAPK signalling pathway may phosphorylate m-calpain on serine 50, thus enhancing its activity

(Glading, Chang, Lauffenburger, & Wells, 2000). This pathway may also increase the expression and activity of MyoD (Gredinger, Gerber, Tamir, Tapscott, & Bengal, 1998), an MRF capable of upregulating m-calpain expression in myoblasts (Dedieu, Mazères, Dourdin, Cottin, & Brustis, 2003). Previous research demonstrated that IGF-1 and insulin were able to activate the ERK/MAPK pathway (Phornphutkul, Wu, Yang, Chen, & Gruppuso, 2004; Willaime-Morawek, Arbez, Miriani, & Brugg, 2005), while the effects of TGF- β 1 were mainly mediated by the well-characterised Smad pathway (Heldin, Miyazono, & Ten Dijke, 1997; Yamamoto et al., 1997). However, recent studies have shown that this factor is also capable of increasing epithelial cell migration via the ERK/MAPK pathway (Imamichi et al., 2005). The three growth factors studied were thus able to activate this signalling pathway.

The PI3K/Akt pathway (also known as the PI3K/ PKB signalling pathway) may also be involved in the activation of myoblast migration and m-calpain by growth factors. Several previous works showed that growth factors, particularly members of the IGF family, were able to activate this signalling pathway (Martin et al., 2006; Scott, Khan, & Duronio, 2005; Zaka, Rafi, Rao, Luzi, & Wenger, 2005), thus regulating numerous phenomena, such as corneal epithelial cell migration (Lee et al., 2006). Moreover the PI3K/Akt pathway activated by IGF-1 enhances the transcriptional activity of MyoD and MEF-2 (Xu & Wu, 2000) and may thus be involved in IGF-1 and insulin-mediated activation of migration and m-calpain activity.

In this work, we studied the possible implication of the ERK/MAP kinase and PI3K/Akt signalling pathways in activating the migration, as well as the m-calpain expression and activity, as observed after growth-factor treatments (Leloup, Mazères, Daury, Cottin, & Brustis, 2006). Myoblast migration, together with m-calpain expression and activity, were, therefore, measured in the presence of growth factors and specific MEK1 and PI3K inhibitors.

Moreover, the possible implication of MyoD and myogenin in these phenomena was also studied. The results obtained showed that the augmentation of myoblast migration, as well as m-calpain expression and activity, by growth factors was mediated by the ERK/MAPK pathway, but not PI3K/Akt, and that, apparently, neither MyoD nor myogenin were involved in regulating myoblast migration.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) and Foetal Bovine Serum (FBS) were purchased from Gibco-BRL. Culture dishes were from Fisher-Scientific. The various growth factors used (IGF-1, TGF- β 1, and insulin) were purchased from Sigma-Aldrich. The selective and cell-permeable inhibitors of MAP kinase and PI3 kinase, PD98059 and LY294002, respectively, were from Calbiochem. The BCA (bicinchoninic acid) protein assay kit was purchased from Pierce and the PVDF (polyvinylidene fluoride) membrane from Millipore. BCIP / NBT (5-bromo-4-chloro-3-indoyl-1-phosphate / nitroblue tetrazolium) colour development substrate, SV Total RNA Isolation System and random primers were purchased from Promega. M-MLV Reverse Transcriptase was from Invitrogen and the specific primers used in quantitative PCR were synthesised by Sigma-Genosys. The q-PCR were carried out using LightCycler[®] FastStart DNA Master SYBR Green I from Roche Diagnostics.

2.2. Antibodies

Primary antibodies used against m-calpain were raised in sheep, as previously described (Brustis et al., 1994). The primary antibodies for β -tubulin were from Santa-Cruz Biotechnology (H-235 sc-9104). Secondary antibodies were purchased from Sigma-Aldrich.

2.3. Cell culture

Mouse myoblasts (C2C12 cell line) were grown in DMEM supplemented with 10 % FBS (v/v) in a 5 % CO₂ atmosphere at 37°C.

2.4. In vitro wound healing assay

C2C12 myoblasts were grown in DMEM plus 10 % FBS to about 80 % confluence. Then, the growth medium was replaced with DMEM supplemented with 0.1 % FBS. After 48 h quiescence, an acellular area was produced at the centre of the plate, using a pipette tip to scrape off the cells. The cells were washed and DMEM supplemented with 0.1 % FBS was added. After 24 h, the cells were washed with PBS, fixed using 4 % paraformaldehyde for 15 min, and dehydrated with 70 % ethanol overnight. Then, the cells were stained with Hansen's Hemalun for 9 min. The cells that migrated into the acellular area were observed by light microscopy (Leica) and counted.

2.5. Growth-factor treatments

Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) was reconstituted to a concentration of 0.5 mg/mL, using 10 mM HCl solution, and added to the medium at 40 ng/mL. Transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) was dissolved in 4 mM HCl solution (final concentration: 50 μ g/mL) and added to the medium at a concentration of 20 ng/mL. Insulin (10 mg/mL in 25 mM HEPES) was used at 15 μ g/mL. The same growth factor concentrations were used in a previous study to enhance myoblast migration (Leloup, Mazères, Daury, Cottin, & Brustis, 2006). PBS was used to dilute the growth factors and also as control.

For the in vitro wound healing assay, the three growth factors were added to the new medium after the cells had been scraped off and washed. The results obtained after growth-factor treatments (24 h) were compared with those obtained using PBS and expressed as a

percentage. For immunoblotting and casein zymography, growth factors and PBS (control) were added to the medium (DMEM supplemented with 0.1 % FBS) for 24 h.

2.6. MEK and PI3K inhibitor treatments

PD98059 (2'-amino-3'-methoxyflavone), a potent, specific inhibitor of MAP kinase kinase (also known as MAPK/ERK kinase or MEK), was used to inhibit the ERK / MAP kinase signalling pathway. PD98059 acts by inhibiting the phosphorylation of MAP kinase (ERK) by MEK and subsequent phosphorylation of MAP kinase substrates. PD98059 (IC₅₀=1-20µM) was reconstituted to a concentration of 10 mg/mL using DMSO and used at four different concentrations (5, 10, 25, and 50 µM).

LY294002 (2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one), a highly selective phosphatidyl inositol 3 kinase (PI3K) inhibitor, was used to inhibit the PI3K / Akt signalling pathway. LY294002 inhibits PI3K by acting on the ATP-binding site of the enzyme (IC₅₀=1.4 µM). LY294002 was dissolved in DMSO (final concentration: 10 mg/mL) and added to the medium at four different concentrations: 1, 2, 5, and 10 µM.

The inhibitors were added to the medium at the same time as the growth factors and incubated for 24 h.

2.7. Protein extraction and quantification

After treatment, the cells were washed with PBS and detached from the culture plates by scraping in PBS (pH 7.5) containing DTT (0.5 mM), EGTA (5 mM), NaN₃ (1 mM), PMSF (1 mM), leupeptin (20 µM), and benzamidin (10 mM). The detached cells were sonicated and centrifuged at 15,000 x g and 4°C for 10 min. The proteins extracted were then quantified using the BCA protein assay kit. 30 µg of each sample were placed in sample buffer (0.05

mM Tris-HCl pH 6.8, 4 % SDS, 0.01 % bromophenol blue, 30 % glycerol, and 1 % DTT) and boiled for 5 min.

2.8. Electrophoresis and immunoblotting

Protein samples were loaded on 10 % polyacrylamide SDS-PAGE, as described by Laemmli (1970). The proteins were then transferred onto a PVDF membrane using semi-dry electrotransfer (0.8 mA by cm²) for 45 min. The membranes were blocked for 90 min, using TBS (50 mM Tris buffer pH 8, 138 mM NaCl, 2.7 mM KCl) containing 5 % skim milk (at room temperature). The membranes were washed in TBS and incubated in TBS containing 1 % skim milk and the primary antibodies for 3 h (at room temperature). The following dilutions were used: 1/1,000 for m-calpain and 1/500 for β -tubulin antibodies. The membranes were washed in TBS and incubated with the secondary antibodies in TBS containing 1 % skim milk. The antibodies were conjugated with alkaline phosphatase and diluted to 1/10,000. After washing, BCIP/NBT were used as detection substrates.

2.9. Densitometric analysis

The density of the bands on the membrane was quantified after scanning with a video densitometer (Gel-Doc 2000, Quantity One software, Bio Rad). The results obtained were corrected with respect to β -tubulin expression, used as internal control.

2.10. Casein zymography

Calpain proteolysis activities were estimated using the casein zymography method, described by Arthur and Mykles in 2000. The cells were incubated in DMEM supplemented with 0.1 % FBS containing PBS, IGF-1, TGF- β 1, or insulin, with or without PD98059, for 24 h. After washing, the cells were lysed using non-denaturing buffer and total proteins were

quantified using the BCA protein assay kit. The samples were loaded on acrylamide gels containing FITC-casein (10 mg/mL) and run at 125 V for 3 h in the presence of EDTA (5 mM). The gels were then incubated in three successive buffers containing Ca^{2+} (5 mM) and DTT (10 mM) (twice for 30 min and once overnight). At the same time, identical gels were incubated in buffers containing EDTA (5 mM) instead of Ca^{2+} , as negative controls. Calpain activity was observed and estimated using a phosphor-fluo imager (Typhoon 8600, Amersham Biosciences). The results obtained after incubation with and without PD98059 were compared and expressed as a percentage of the latter.

2.11. Extraction of total RNA and reverse transcription

After treatment with PBS, IGF-1, TGF- β 1, or insulin in the presence or absence of PD98059, cells were washed and detached from the culture plates by scraping. 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, 1 μg RNA was reverse transcribed to cDNA using random primers and M-MLV reverse transcriptase. The cDNA obtained were conserved at -20°C and used in q-PCR.

2.12. Specific primers

Specific primers were used to study myogenin (Myf1) and MyoD (Myf3) expression. Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as control. For GAPDH the following primers were used: 5'-AAG GTC ATC CCA GAG CTG AAC GG-3' (forward) and 5'-ACA ACC TGG TCC TCA GTG TAG CC-3' (reverse). Specific MyoD primers were: 5'-GAC AGG ACA GGA CAG GGA GG-3' (forward) and 5'-GCA CCG CAG TAG AGA AGT GT-3' (reverse). The primers used for myogenin were as follows: 5'-CCT TTT CCG

ACC TGA TGG AG-3' (forward) and 5'-TCC TGG GTT GGG ACC GAA-3' (reverse). These primers were generated from the respective mRNA sequences obtained from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) gene bank.

2.13. Quantitative PCR

Quantitative PCR was performed using Roche LightCycler[®] FastStart DNA Master SYBR Green I kit. 10 μ L enzyme was added to the Reaction Mix and 2 μ L of the mix obtained added to 9.6 μ L water, 2.4 μ L MgCl₂ (final concentration: 4 mM), and 2 μ L of each primer, at a concentration of 5 μ M. The resulting 18 μ L sample was transferred into precooled LightCycler[®] capillaries purchased from Roche Diagnostics. Then, 2 μ L cDNA or standard were added to the mix. For the negative control, 2 μ L water were added instead of cDNA. The following program was used for GAPDH: initial 10 min at 95°C and 40 cycles of 10 s at 95°C, 5 s at 60°C, and 10 s at 72°C. For myogenin and MyoD, the annealing temperature was 62°C instead of 60°C and the elongation time 12 s instead of 10 s. At the end of the run, the specificity of the reaction was verified by analysing the melting curves. Crossing points were calculated using the second derivative maximum method in the LightCycler[®] software. Sample equality was verified by analysing the expression of GAPDH, the housekeeping gene. MyoD and myogenin expression after growth factor treatments were compared with control cell values (treated with PBS) and expressed as percentages.

2.14. Statistical analysis

The statistical significance of the difference between multiple groups was determined using ANOVA. When F was associated with a probability $p < 0.05$, intergroup comparisons were conducted using Student's t -test. Unless indicated, all data are expressed as means \pm S.E.M. and represent an average of at least three separate experiments.

3. Results and discussion

3.1. Growth factors activate myoblast migration via the ERK/MAPK pathway

In order to identify the signalling pathway involved in growth factor-mediated migration, wound healing assays were carried out in the presence of growth factors and increasing concentrations of PD98059 (an MEK inhibitor) or LY294002 (a PI3K inhibitor). Four different concentrations of each inhibitor were used (5 to 50 μ M for PD98059 and 1 to 10 μ M for LY294002). These experiments were also carried out using the inhibitors (at maximum concentrations) without growth factor in order to verify their effect on basal migration. The images in Fig. 1 illustrate the results obtained without growth factor (Fig. 1A, B and C) and with insulin (Fig. 1D, E and F). Images for IGF-1 and TGF- β 1 are not presented but the data are shown in figure 2. No significant difference was observed between Fig. 1A (basal migration), 1B (with PD98059), and 1C (with LY294002), showing that the inhibitors had no effect on basal migration. In the case of insulin-treated cells (Fig. 1D, E, and F), a marked inhibition of insulin-induced migration was observed when PD98059 was added (Fig. 1E). On the contrary, no significant difference was observed after LY294002 treatment (Fig. 1F).

Myoblast migration obtained after growth factor treatments was quantified and expressed as a percentage (100 % for experiment carried out without growth factor or inhibitor). The results are presented in Fig. 2.

As shown in Fig. 2A, B, and C, adding PD98059 induced a significant reduction in growth factor-mediated migration. IGF-1-induced migration decreased from 166 % to 105 % with 50 μ M PD98059. Migration induced by TGF- β 1 and insulin was also significantly inhibited after PD98059 treatment (Fig. 2B and C), from 173 % to 102 % and from 196 % to 120 %, respectively. As observed for IGF-1-treated cells, the migration measured after

PD98059 treatment was similar to that of control cells. However, in contrast to the results observed for IGF-1-induced migration, 25 μ M PD98059 was sufficient to totally block TGF- β 1-mediated migration.

Unlike PD98059, LY294002 did not induce a significant decrease in growth factor-mediated migration, as shown in Fig. 2D, E, and F. Indeed, adding LY294002 did not reduce IGF-1-, TGF- β 1-, and insulin-mediated migration, even at maximum concentration (10 μ M).

These results clearly showed that MEK activity and, thus, the ERK/MAPK signalling pathway, were required for growth factor-mediated migration, while PI3K activity was not indispensable and, thus, that the effect of IGF-1, TGF- β 1, and insulin on myoblast migration was independent of the PI3K/Akt pathway. These results are consistent with those obtained for other growth factors and cell types (Glading, Chang, Lauffenburger, & Wells, 2000), except for corneal epithelial cells, where the effect of IGF-1 on migration is mediated by the PI3K/Akt rather than the ERK/MAPK pathway (Lee et al., 2006).

3.2. The ERK/MAPK pathway is involved in the up-regulation of m-calpain expression by growth factors.

Our recent studies showed that treatment with IGF-1, TGF- β 1, or insulin enhanced myoblast migration by strongly increasing m-calpain expression (Leloup, Mazères, Daury, Cottin, & Brustis, 2006). In order to determine whether ERK/MAPK was involved in this growth factor-mediated increase, we analysed m-calpain expression by immunoblotting. The effects of LY294002 on m-calpain expression were not studied, since, according to the results presented above, the PI3K/Akt pathway was not involved in growth factor-induced migration. The cells were treated with the various growth factors in the presence or absence of PD98059 (50 μ M) for 24 h. The impact of PD98059 on m-calpain expression in the absence of growth factors was also studied. Calpain expression was then measured (Fig. 3).

As shown in Fig. 3A, m-calpain expression was unchanged after PD98059 treatment, indicating that this inhibitor had no effect on basal migration (Fig. 2) or m-calpain expression. In contrast, PD98059 treatment induced a significant decrease in m-calpain expression in the presence of growth factors, e.g.: expression in IGF-1 treated cells decreased by about 30 % (Fig. 3B). This MEK inhibitor had similar effects on cells treated with TGF- β 1 and insulin, i.e.: m-calpain expression decreased by about 39 and 35 %, respectively (Fig. 3C and D). The fact that PD98059 blocked the effect of IGF-1, TGF- β 1, and insulin on m-calpain expression suggested that the ERK/MAPK signalling pathway was implicated in the up-regulation of m-calpain expression, irrespective of the growth factor used, i.e.: the growth factors (IGF-1, TGF- β 1, and insulin) activated the ERK/MAPK pathway, which, in turn, up-regulated m-calpain expression and, consequently, enhanced myoblast migration. These results are in agreement with those obtained by Glading and collaborators, using EGF on fibroblasts (Glading, Chang, Lauffenburger, & Wells, 2000).

3.3. MEK activity is required for the growth factor-mediated increase in m-calpain activity.

Results reported in our previous publications showed that growth factor treatments induced a major increase in m-calpain activity. M-calpain activity increased by 49, 62, and 99 % following IGF-1, TGF- β 1, and insulin treatment, respectively (Leloup, Mazères, Daury, Cottin, & Brustis, 2006). This was probably partly due to the increase in expression after growth factor treatment, but may also have been due to phosphorylation of m-calpain by ERK. In order to determine whether PD98059 was able to inhibit the m-calpain activity increased by growth factor treatment, casein zymographies were carried out after treatment with growth factors in the presence or absence of PD98059 (50 μ M). Zymography was also carried out on samples treated with PD98059 but no growth factors, to verify that PD98059

had no effect on basal m-calpain activity. Activity measurements after the various treatments, expressed as percentages, are presented in Fig. 4.

As shown in Fig. 4A, adding 50 μ M PD98059 had no effect on m-calpain activity in the absence of growth factors. This result correlated with those obtained for m-calpain expression, showing that PD98059 had no effect on m-calpain expression in the absence of growth factor (Fig. 3A). On the contrary, PD98059 treatment significantly inhibited m-calpain activity following IGF-1, TGF- β 1, and insulin treatments (Fig. 4B, C and D). Indeed, m-calpain activity, increased by IGF-1, decreased by 32 % after PD98059 treatment. Similarly, increased activity following TGF- β 1- and insulin-treatment, decreased by 38 and 43 % following PD98059 addition, respectively. These results correlated with those for m-calpain expression (Fig. 3). Indeed, like m-calpain expression, m-calpain activity, increased by growth factor treatment, was reduced by adding PD98059. This correlation is partly explained by the fact that m-calpain activity is strongly related to enzyme expression. These findings confirm the importance of the ERK/MAPK pathway in the regulation of m-calpain expression and activity by IGF-1, TGF- β 1, and insulin. As shown in Fig. 4, μ -calpain activity remained unchanged after the various treatments. This result is in agreement with our previous work, showing that μ -calpain activity was not regulated by growth factor treatments (Leloup, Mazères, Daury, Cottin, & Brustis, 2006).

3.4. Effects of growth factor treatments on MyoD and myogenin expression

As previously stated, MyoD (or Myf3) and myogenin (Myf1) are transcription factors capable of regulating m-calpain expression (Dedieu, Mazères, Dourdin, Cottin, & Brustis, 2003). It was hypothesised that, by activating the ERK/MAPK pathway, the three growth factors used in this work enhanced MyoD and/or myogenin expression, which, in turn, increased m-calpain expression and activity, and consequently stimulated myoblast migration.

In order to determine whether MyoD and myogenin were implicated in the regulation of migration and m-calpain expression by growth factors, the mRNA expressions of these MRF were measured by Reverse Transcription-quantitative PCR. The GAPDH housekeeping gene was used as internal control. MyoD and myogenin expression after treatment was compared with the expression of untreated cells and expressed as a percentage, as shown in Fig. 5 and 6, respectively.

As shown in Fig. 5A, no significant modifications in the quantity of MyoD mRNA were observed after IGF-1 and insulin treatment. In contrast, TGF- β 1 treatment induced a marked reduction in MyoD expression: mRNA was reduced by 82 %. If the reduction in MyoD expression was implicated in the increase in migration induced by TGF- β 1, it should be mediated by the ERK/MAPK pathway, like growth factor-induced migration. In order to determine whether the inhibition of MyoD expression by TGF- β 1 was mediated by the ERK/MAPK signalling pathway, further experiments were carried out in the presence of 50 μ M PD98059 (Fig. 5B). PD98059 treatment had no significant effect on the reduction in MyoD mRNA induced by TGF- β 1. Inhibition of the ERK/MAPK pathway did not block the effect of TGF- β 1 on MyoD expression, showing that it was not mediated by this signalling pathway. As the effect of TGF- β 1 on myoblast migration and m-calpain expression were mediated by the ERK/MAPK pathway and the reduction in MyoD expression by another pathway, this decrease in MyoD expression was unlikely to be implicated in TGF- β 1-stimulated migration. Previous research demonstrated that this growth factor was able to block MyoD expression, thus inhibiting myogenesis (Brennan, Edmonson, Li, & Olson, 1991). Moreover, a more recent study showed that TGF- β 1 inhibited myoblast differentiation and MyoD expression by activating the Smad pathway (Zhu, Goldschmidt-Clermont, & Dong, 2004). Thus, it could be suggested that, on the one hand, TGF- β 1 enhanced myoblast migration by activating m-calpain expression via the ERK/MAPK pathway and, on the other

hand, it inhibited myoblast differentiation by blocking MyoD expression via the Smad pathway, indicating that TGF- β 1 intervened in two different phenomena via two separate pathways.

The insulin and IGF-1 growth factors had no effect on MyoD expression, but could enhance MyoD transcriptional activity. However, previous studies showed that this phenomenon was mediated by the PI3K/Akt pathway, rather than ERK/MAPK. Consequently, this hypothesis is unlikely.

As shown in Fig. 6, no significant variations in myogenin expression levels were observed after growth factor treatment. Indeed, neither IGF-1 nor insulin were able to up-regulate myogenin expression. Moreover, in contrast to the results observed for MyoD, TGF- β 1 treatment had no effect on myogenin expression. As in the case of MyoD, IGF-1 could up-regulate myogenin expression in other cell types, but these effects were mediated by the PI3K/Akt pathway. A recent publication demonstrated that IGF-1 treatment induced an increase in myogenin expression by activating the PI3K/Akt pathway and inhibiting ERK/MAPK (Tiffin, Adi, Stokoe, Wu, & Rosenthal, 2004). According to this work, myogenin is probably not implicated in the stimulation of myoblast migration by growth factors.

Taken together, our results clearly showed that the effects of IGF-1, TGF- β 1, and insulin treatment on calpain and myoblast migration were mediated by the ERK/MAPK signalling pathway. In contrast, these phenomena were apparently totally independent of the PI3K/Akt pathway. MyoD and myogenin, reported to be activated by IGF-1 and insulin via Akt (Tiffin, Adi, Stokoe, Wu, & Rosenthal, 2004; Xu & Wu, 2000), were apparently not involved in this transduction pathway. The marked inhibition of MyoD expression by TGF- β 1 is probably mediated by the Smad pathway and implicated in the inhibition of myoblast

differentiation. This effect of TGF- β 1 is probably totally independent of myoblast migration. Although ERK/MAPK was clearly identified as the signalling pathway involved in growth factor-mediated migration, certain mechanisms are still unclear and are currently under investigation in our laboratory.

Acknowledgement

This work was supported by grants from Association Française contre les Myopathies (AFM-11302) and the Institut National de Recherche Agronomique (INRA-France, PHASE department).

References

- 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.
- Arthur, J. S., & Mykles, D. L. (2000). Calpain zymography with casein or fluorescein isothiocyanate casein. *Methods Mol. Biol.*, 144, 109-116.
- 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.
- Averna, M., De Tullio, R., Capini, P., Salamino, F., Pontremoli, S., & Melloni, E. (2003). Changes in calpastatin localisation and expression during calpain activation: a new mechanism for the regulation of intracellular Ca²⁺-dependent proteolysis. *Cell. Mol. Life Sci.*, 60, 2669-2678
- Barnoy, S., Supino-Rosin, L., & Kosower, N. S. (2000). Regulation of calpain and calpastatin in differentiating myoblasts: mRNA levels, protein synthesis and stability. *Biochem. J.*, 351, 413-420.
- Bhatt, A., Kaverina, I., Otey, C., & Huttenlocher, A. (2002). Regulation of focal complex composition and disassembly by the calcium-dependent protease calpain. *J. Cell Sci.*, 115, 3415-3425.
- Biswas, S., Harris, F., Singh, J., & Phoenix, D. A. (2004). The in vitro retardation of porcine cataractogenesis by the calpain inhibitor, SJA 6017. *Mol. Cell Biochem.*, 261, 169-173.
- Brennan, T. J., Edmonson, D. G., Li, L., & Olson, E. N. (1991). Transforming growth factor beta represses the actions of myogenin through a mechanism independent of DNA binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 3822-3826.
- Brustis, J.-J., Elamrani, N., Balcerzak, D., Safwate, A., Soriano, M., Poussard, S., Cottin, P., & Ducastaing, A. (1994). Rat myoblast fusion requires exteriorised m-calpain activity. *Eur. J. Cell Biol.*, 64, 320-327.
- Carragher, N. O., & Frame, M. C. (2002). Calpain: a role in cell transformation and migration. *Int. J. Bioch. Cell Biol.*, 34, 1539-1543.

- Cottin, P., Brustis, J. J., Poussard, S., Elamrani, N., Broncard, S., & Ducastaing, A. (1994). Ca²⁺-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, S19-25.
- 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.
- Dedieu, S., Mazères, G., Dourdin, N., Cottin, P., & Brustis, J.-J. (2003). Transactivation of capn2 by myogenic regulatory factors during myogenesis. *J. Mol. Biol.*, 326, 453-465.
- Dedieu, S., Poussard, S., Mazères, 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.
- 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.
- Fernandez-Montalvan, A., Assfalg-Machleidt, I., Pfeiler, D., Fritz, H., Jochum, M., & Machleidt, W. (2006). Mu-calpain binds to lipid bilayers via the exposed hydrophobic surface of its Ca²⁺-activated conformation. *Biol. Chem.*, 387, 617-627.
- 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., 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., Dayton, W. R., Singh, I., & Robson, R. M. (1991). Studies of the alpha-actinin/actin interaction in the Z-disk by using calpain. *J. Biol. Chem.*, 266, 8501-8510.
- Goll, D. E., Thompson, V. F., Li, H., Wei, W., & Cong, J. (2003). The calpain system. *Physiol. Rev.*, 83, 731-801.

Gredinger, E., Gerber, A. N., Tamir, Y., Tapscott, S. J., & Bengal, E. (1998). Mitogen-activated protein kinase pathway is involved in the differentiation of muscle cells. *J. Biol. Chem.*, *273*, 10436-10444.

Heldin, C. H., Miyazono, K., & Ten Dijke, P. (1997). TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*, *390* (6659), 465-471.

Huttenlocher, A., Palecek, S. P., Lu, Q., Zhang, W., Mellgren, R. L., Lauffenburger, D. A., Ginsberg, M. H., & Horwitz, A. F. (1997). Regulation of cell migration by the calcium-dependent protease calpain. *J. Biol. Chem.*, *272*, 32719-32722.

Imamichi, Y., Waidmann, O., Hein, R., Eleftheriou, P., Giel, K., & Menke, A. (2005). TGF beta-induced focal complex formation in epithelial cells is mediated by activated ERK and JNK MAP kinases and is independent of Smad4. *Biol. Chem.*, *386*, 225-236.

Inomata, M., Kasai, Y., Nakamura, M., & Kawashima, S. (1988). Activation mechanism of calcium-activated neutral proteases. Evidence for the existence of intramolecular and intermolecular autolyses. *J. Biol. Chem.*, *263*, 19783-19787.

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

Lafrenière, J. F., Mills, P., Tremblay, J. P., & Fahime, E. E. (2004). Growth factors improve the in vivo migration of human skeletal myoblasts by modulating their endogenous proteolytic activity. *Transplantation*, *77*, 1741-1747.

Lambrechts, A., Van Troys, M., & Ampe, C. (2004). The actin cytoskeleton in normal and pathological cell motility. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, *36*, 1890-1909.

Lauffenburger, D. A., & Horwitz, A. F. (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell*, *84*, 359-369.

Lee, H. K., Lee, J. H., Kim, M., Kariya, Y., Miyazaki, K., & Kim, E. K. (2006). Insulin-like growth factor-1 induces migration and expression of laminin-5 in cultured human corneal epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, *47*, 873-882.

Leloup, L., Mazères, 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.

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.

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.

Martin, M. J., Melnyk, N., Pollard, M., Bowden, M., Leong, H., Podor, T. J., Gleave, M., & Sorensen, P. H. (2006). The insulin-like growth factor I receptor is required for Akt activation and suppression of anoikis in cell transformed by the ETV6-NTRK3 chimeric tyrosine kinase. *Mol. Cell Biol.*, *26*, 1754-1769.

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.

Mazères, 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.

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

Moldoveanu, T., Hosfield, C. M., Jia, Z., Elce, J. S., & Davies, P. L. (2001). Ca²⁺-induced structural changes in rat m-calpain revealed by partial proteolysis. *Biochem. Biophys. Acta*, *1545*, 245-254.

Pal, G. P., Elce, J. S., & Jia, Z., (2001). Dissociation and aggregation of calpain in the presence of calcium. *J. Biol. Chem.*, *276*, 47233-47238.

Petit, V., & Thiery, J.-P. (2000). Focal adhesions: structure and dynamics. *Biol. Cell*, *92*, 477-494.

Phornphutkul, C., Wu, K. Y., Yang, X., Chen, Q., & Gruppuso, P. A. (2004). Insulin-like growth factor-I signaling is modified during chondrocyte differentiation. *J. Endocrinol.*, *183*, 477-486.

Potter, A. P., Tirnauer, J. S., Janssen, R., Croall, D. E., Hughes, C. N., Fiacco, K. A., Mier, J. W., Maki, M., & Herman, I. M. (1998). Calpain regulates actin remodeling during cell spreading. *J. Cell Biol.*, *141*, 647-662.

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.

Saido, T. C., Shibata, M., Takenawa, T., Murofushi, H., & Suzuki, K. (1992). Positive regulation of mu-calpain action by polyphosphoinositides. *J. Biol. Chem.*, *267*, 24585-24590.

Saito, K., Elce, J. S., Hamos, J. E., & Nixon, R. A. (1993). Widespread activation of calcium-activated neutral proteinase (calpain) in the brain in Alzheimer disease: a potential molecular basis for neuronal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *90*, 2628-2632.

Satish, L., Babu, M., Tran, K. T., Hebda, P. A., & Wells, A. (2004). Keloid fibroblast responsiveness to epidermal growth factor and activation of downstream intracellular signaling pathways. *Wound Repair Regen.*, *12*, 183-192.

Sato, K., & Kawashima, S. (2001). Calpain function in the modulation of signal transduction molecules. *Biol. Chem.*, *382*, 743-751.

Schád, E., Farkas, A., Jékely, G., Tompa, P., & Friedrich, P. (2002). A novel human small subunit of calpains. *Biochem. J.*, *362*, 383-388.

Scott, A., Khan, K. M., & Duronio, V. (2005). IGF-I activates PKB and prevents anoxic apoptosis in Achilles tendon cells. *J. Orthop. Res.*, *23*, 1219-1225.

Sheetz, M. P., Felsenfeld, D., Galbraith, C. G., & Choquet, D. (1999). Cell migration as a five-step cycle. *Biochem. Soc. Symp.*, *65*, 223-243.

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.

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

Tan, Y., Wu, C., De Veyra, T., & Greer, P. A. (2006). Ubiquitous calpains promote both apoptosis and survival signals in responses to different cell death stimuli. *J. Biol. Chem.*, 281, 17689-17698.

Temm-Grove, C. J., Wert, D., Thompson, V. F., Allen, R. E., & Goll, D. E. (1999). Microinjection of calpastatin inhibits fusion in myoblasts. *Exp. Cell Res.*, 247, 293-303.

Tidball, J. G., & Spencer, M. J. (2000). Calpains and muscular dystrophies. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 32, 1-5.

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.

Willaime-Morawek, S., Arbez, N., Miriani, J., & Brugg, B. (2005). IGF-I protects cortical neurons against ceramide-induced apoptosis via activation of the PI-3K/Akt and ERK pathways; is this protection independent of CREB and Bcl-2? *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 142, 97-106.

Xu, Q., & Wu, Z. (2000). The Insulin-like Growth Factor-phosphatidylinositol 3-kinase-Akt signaling pathway regulates myogenin expression in normal myogenic cells but not in rhabdomyosarcoma-derived RD cells. *J. Biol. Chem.*, 275, 36750-36757.

Yamamoto, N., Akiyama, S., Katagiri, T., Namiki, M., Kurokawa, T., & Suda, T. (1997). Smad1 and Smad5 act downstream of intracellular signalings of BMP-2 that inhibits myogenic differentiation and induces osteoblast differentiation in C2C12 myoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 238, 574-580.

Zaka, M., Rafi, M. A., Rao, H. Z., Luzzi, P., & Wenger, D. A. (2005). Insulin-like growth factor-1 provides protection against psychosine-induced apoptosis in cultured mouse oligodendrocyte progenitor cells using primarily the PI3K/Akt pathway. *Mol. Cell Neurosci.*, 30, 398-407.

Zhu, S., Goldschmidt-Clermont, P. J., & Dong, C. (2004). Transforming growth factor-beta-induced inhibition of myogenesis is mediated through Smad pathway and is modulated by microtubule dynamic stability. *Circ. Res.*, 94, 617-625.

Figure captions

Fig. 1. Observation of myoblast migration with or without insulin, in the presence or absence of PD98059 or LY294002. C2C12 myoblasts were cultured for 24 h until 80 % confluence. After 48 h in a quiescent medium, cells were scraped using a pipette tip to create an acellular area. The medium was removed and replaced with DMEM plus: (A) PBS, (B) PBS and 50 μ M PD98059, (C) PBS and 10 μ M LY294002, (D) insulin (15 μ g/mL), (E) insulin and PD98059, (F) insulin and LY294002. After 24 h, the cells were fixed, dehydrated, coloured, and observed. The experiments were repeated three times.

Fig. 2. Effects of PD98059 and LY294002 on basal and growth factor-mediated myoblast migration. C2C12 myoblasts were cultured for 24 h until 80 % confluence. After 48 h in a quiescent medium, cells were scraped using a pipette tip to create an acellular area. The medium was replaced with DMEM containing PBS (control), IGF-1 (A and D), TGF- β 1 (B and E), or insulin (C and F). The specific MEK inhibitor (PD98059) was added at four different concentrations (5, 10, 25, and 50 μ M; A, B, and C). Similarly, LY29402 was added at 1, 2, 5, or 10 μ M (D, E and F). After 24 h treatment, the cells were fixed, dehydrated, coloured, and counted. Results were expressed as a percentage in comparison to cells treated with PBS only. Experiments were repeated three times and error scale bars show standard deviation. *: significantly different from cells treated with growth factors but no inhibitors ($\alpha < 0.05$).

Fig. 3. m-calpain expression in C2C12 myoblasts after PD98059 treatment. C2C12 cells were incubated in a quiescent medium with: (A) PBS (control), (B) IGF-1 (40 ng/mL), (C) TGF- β 1 (20 ng/mL), (D) insulin (15 μ g/mL) in the presence or absence of PD98059 (50 μ M) for 24 h. Total proteins were then extracted and subjected to SDS-PAGE. Immunodetection was carried out using anti-m-calpain and anti- β -tubulin antibodies. Sample loading was controlled by immunodetection of β -tubulin. Images represent three separate experiments. M-calpain was quantified and expressed as a percentage in comparison to expression in cells untreated with PD98059. Bars on the graph represent the standard deviation for three separate experiments. *: significantly different from the corresponding control ($\alpha < 0.05$).

Fig. 4. Quantification of calpain activity by casein zymography. Myogenic cells were incubated in a quiescent medium with: (A) PBS (control), (B) IGF-1 (40 ng/mL), (C) TGF- β 1

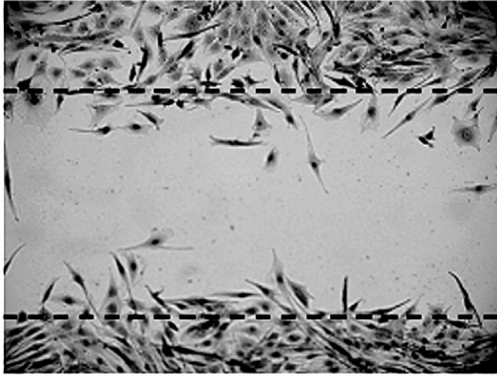
(20 ng/mL), (D) insulin (15 µg/mL), in the presence or absence of PD98059 (50 µM) for 24 h. Total proteins were extracted under non-denaturing conditions and migrated in gels containing FITC-casein. Gels were then incubated three times in Ca²⁺ buffer. The gels were observed and activity quantified. Activity was expressed as a percentage in comparison to that observed in cells untreated with PD98059. Bars on the graph represent the standard deviation for four separate experiments. *: significantly different from the corresponding control ($\alpha < 0.05$).

Fig. 5. Quantification of MyoD mRNA expression using RT-qPCR. C2C12 cells were treated using PBS (control), IGF-1 (40 ng/mL), TGF-β1 (20 ng/mL), or insulin (15 µg/mL) for 24 h. Total RNAs were extracted and 1 µg was reverse transcribed using random primers. Expression of the GAPDH housekeeping gene was used as an internal control. MyoD expression was then quantified using qPCR with specific MyoD primers. The results were expressed as a percentage in comparison to control (A). The same experiment was carried out with TGF-β1 and PD98059 (50 µM; B). Bars on the graphs represent the standard deviation for three separate experiments. *: significantly different from the corresponding control ($\alpha < 0.05$).

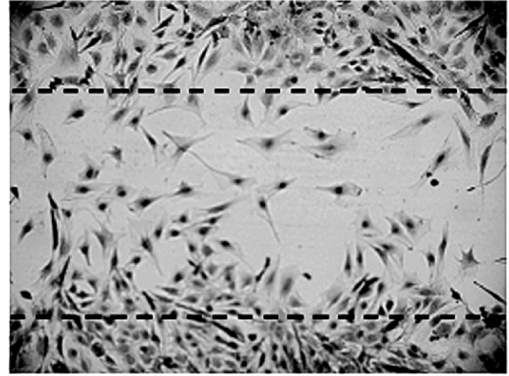
Fig. 6. Quantification of myogenin mRNA expression using RT-qPCR. C2C12 cells were treated using PBS (control), IGF-1 (40 ng/mL), TGF-β1 (20 ng/mL), or insulin (15 µg/mL) for 24 h. Total RNA were extracted and 1 µg was reverse transcribed using random primers. Myogenin expression was then quantified using qPCR with specific myogenin primers. Expression of the GAPDH housekeeping gene was used as an internal control. The results were expressed as a percentage in comparison to control. Bars on the graphs represent the standard deviation for three separate experiments. *: significantly different from the corresponding control ($\alpha < 0.05$).

Figure 1

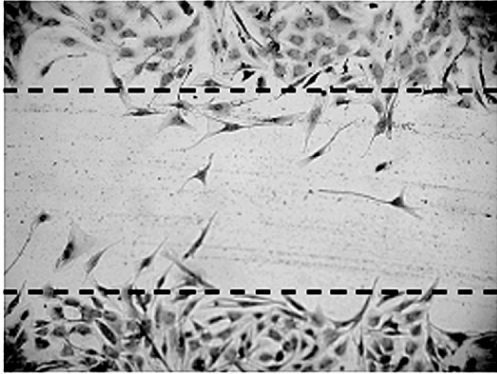
A



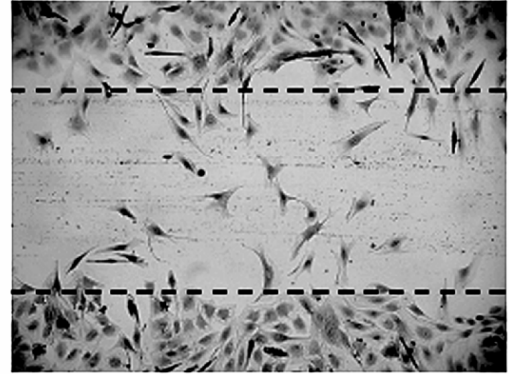
D



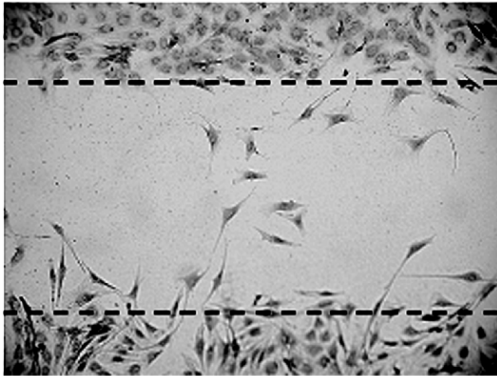
B



E



C



F

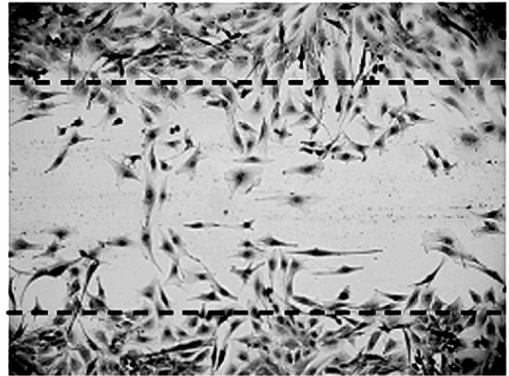


Figure 2

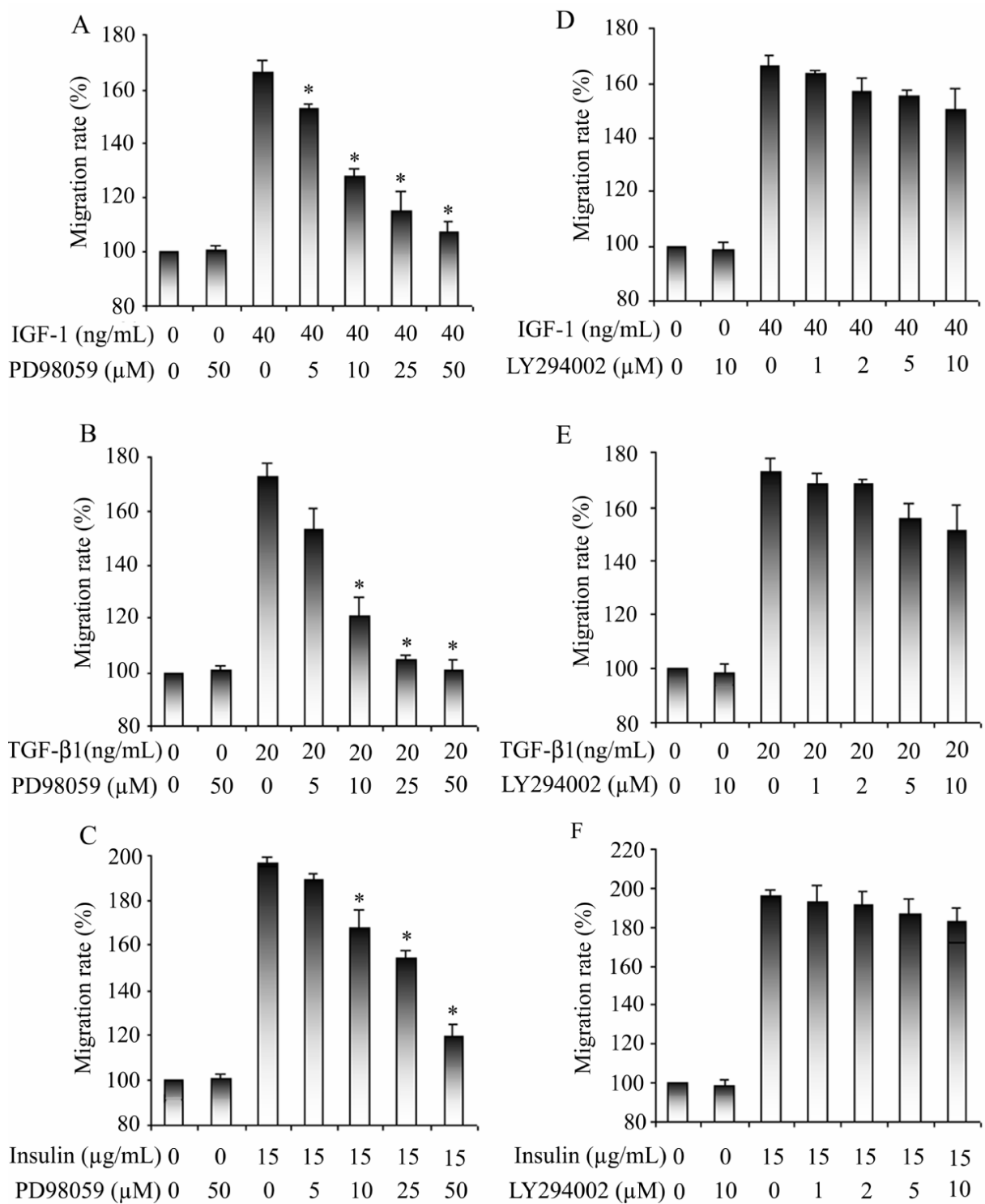


Figure 3

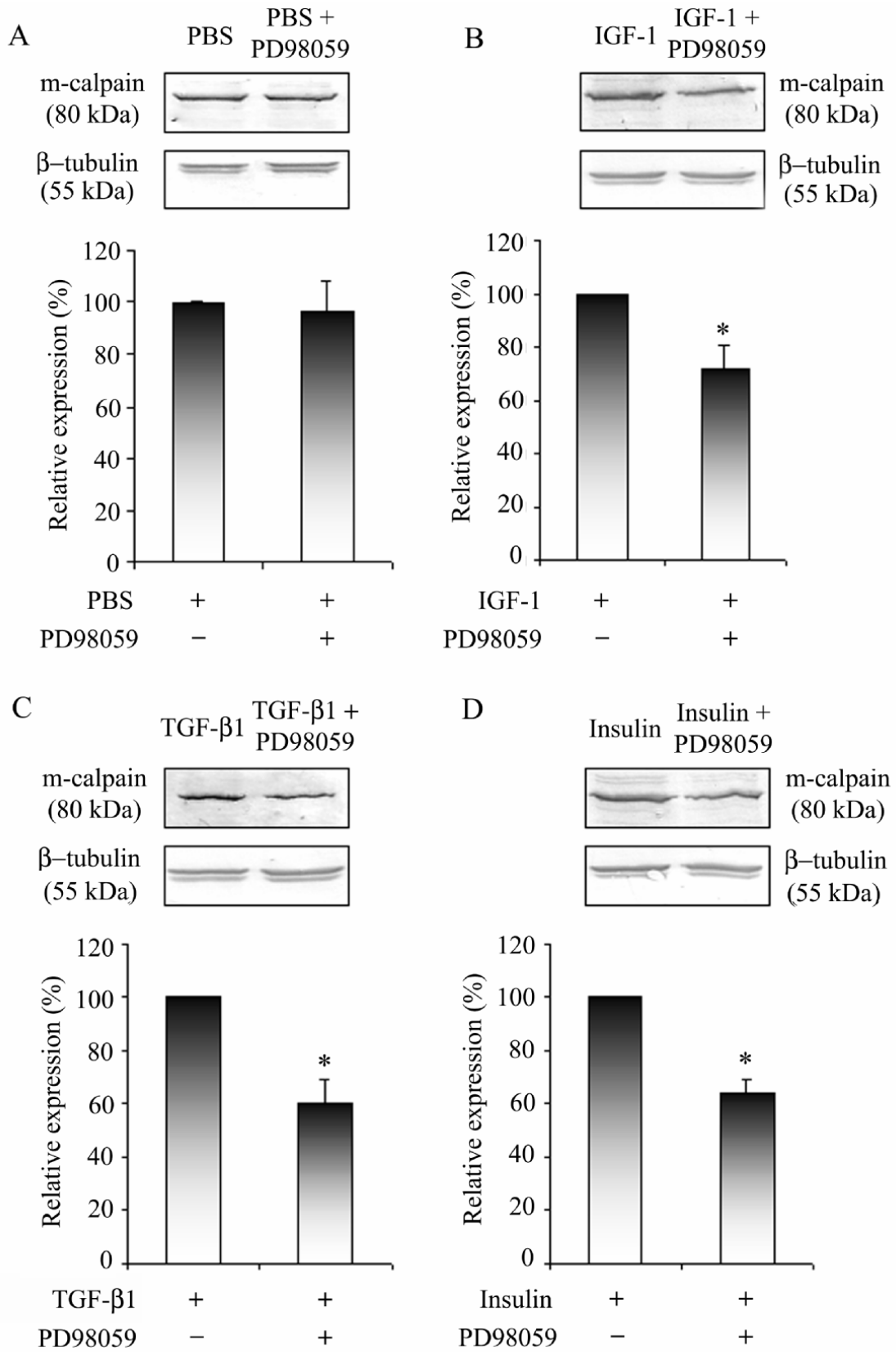


Figure 4

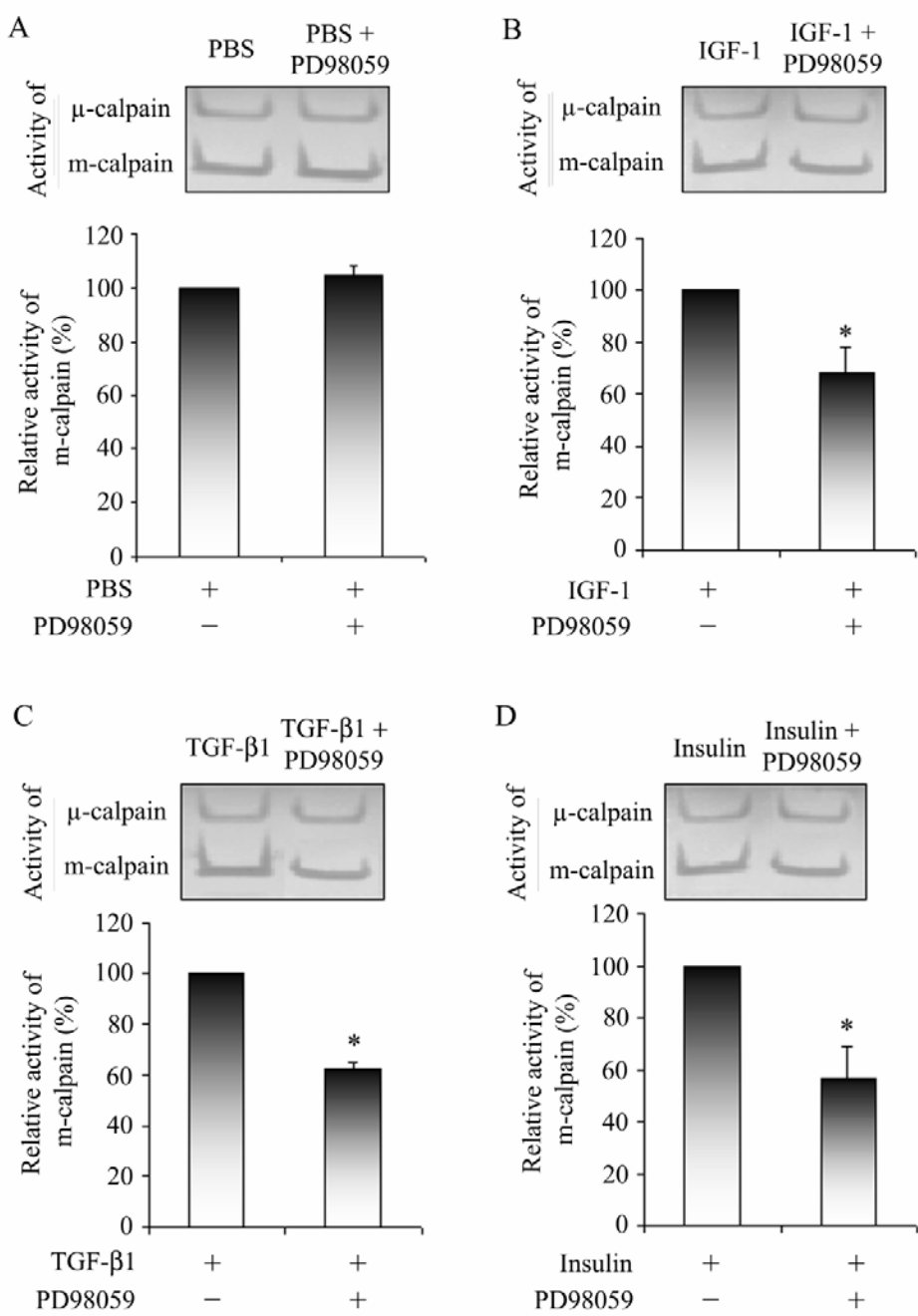


Figure 5

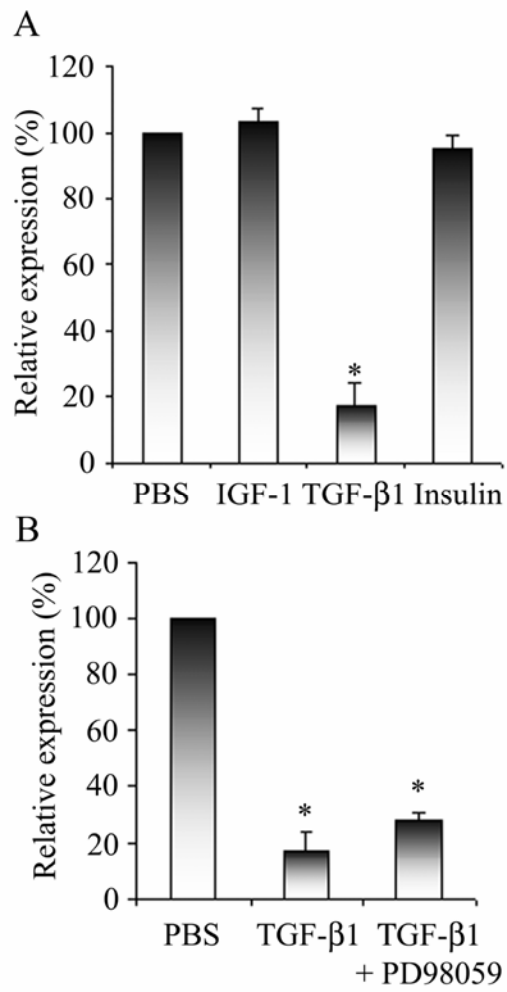
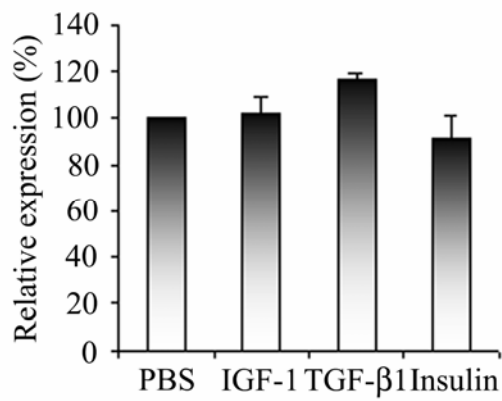


Figure 6



Résultats - Chapitre 4 :
Implication du système protéolytique calcium-dépendant
dans l'invasion tumorale des rhabdomyosarcomes

Article 4 : Calpains play a crucial role in rhabdomyosarcoma cell invasion.

Article en préparation

L'invasion tumorale est un phénomène hautement pathologique responsable de la formation des métastases. Les cellules tumorales devenues « invasives » sont capables de dégrader la lame basale et de la franchir afin d'envahir les tissus sains environnants. Ce processus requiert notamment de grandes quantités de protéases. Après avoir rejoint les vaisseaux sanguins ou lymphatiques, elles peuvent se disséminer dans l'ensemble de l'organisme.

Quelques études récemment publiées montrent que les calpaïnes ubiquitaires pourraient jouer un rôle important dans la transformation des cellules et dans le développement des tumeurs (Carragher *et al.*, 2002 et 2004 ; Ohguchi *et al.*, 2005).

L'invasion tumorale et l'implication des calpaïnes dans ce phénomène restent encore mal connues et nécessitent une étude plus détaillée au cours des différentes étapes de la dissémination métastatique. Cette étude constitue l'objectif de ce travail que nous avons réalisé sur des cellules tumorales musculaires appelées rhabdomyosarcomes (RMS). Les résultats obtenus sont présentés sous forme d'article.

1. Introduction

Les calpaïnes forment une grande famille de cystéine protéases dont l'activité est dépendante du calcium. Chez les mammifères, cette famille compte 14 membres différents (de la calpaïne 1 à la calpaïne 15, absence de calpaïne 4), classés selon leur expression (ubiquitaire ou tissu-spécifique) et selon la présence ou l'absence d'un domaine calmodulin-like (calpaïne typique ou atypique respectivement). La μ - et la m-calpaïne sont les membres les plus étudiés de cette famille. Ces deux enzymes, ubiquitaires et typiques, sont des hétérodimères constitués d'une sous-unité catalytique de 80 kDa (calpaïne 1 et calpaïne 2 respectivement) et d'une sous-unité régulatrice de 28 kDa (C_{ss}1 ou C_{ss}2) (Goll *et al.*, 2003 ; Schád *et al.*, 2002). Le calcium est nécessaire à l'activation de ces deux protéases mais les concentrations requises sont très différentes. La μ -calpaïne nécessite des concentrations de l'ordre du μ M tandis que la m-calpaïne requiert des concentrations proches du mM (Goll *et al.*, 2003). D'autres facteurs interviennent également dans l'activation des calpaïnes, c'est notamment le cas des phospholipides membranaires, des phosphorylations (par ERK), et de l'autoprotéolyse (Averna *et al.*, 2003 ; Glading *et al.*, 2004 ; Li *et al.*, 2004 ; Saido *et al.*, 1992). L'activité de la μ - et de la m-calpaïne est également régulée par leur inhibiteur endogène, la calpastatine (ou CAST).

Les substrats des calpaïnes sont nombreux et de différents types, on distingue en effet des protéines du cytosquelette (taline, tropomyosine, desmine,...), des enzymes (FAK, PKC), mais aussi des facteurs de transcription et des protéines associées à la membrane (Goll *et al.*, 2003). La grande diversité de ces substrats suggère une intervention des calpaïnes dans de nombreux phénomènes biologiques. Des études ont d'ailleurs mis en évidence l'implication de ces enzymes dans le développement embryonnaire, l'apoptose, la régulation du cycle cellulaire, l'adhésion, l'étalement, la migration cellulaire et la myogenèse (Atencio *et al.*, 2000 ; Dedieu *et al.*, 2004 ; Glading *et al.*, 2001 ; Leloup *et al.*, 2006 ; Mazères *et al.*, 2006). Les calpaïnes joueraient également un rôle dans de nombreux phénomènes pathologiques tels que les dystrophies musculaires, le diabète, la cataracte et les maladies d'Alzheimer, de Parkinson et d'Huntington (Biswas *et al.*, 2004 ; Cox *et al.*, 2004 ; Crocker *et al.*, 2003 ; Gafni & Ellerby, 2002 ; Higuchi *et al.*, 2005 ; Richard *et al.*, 2000). De plus, des études récentes montrent que la μ - et la m-calpaïne seraient impliquées dans la transformation des cellules et dans le développement de certains cancers (Carragher *et al.*, 2002 et 2004). Le système protéolytique calcium-dépendant de ces cellules est profondément dérégulé ce qui semble entraîner le plus souvent une augmentation importante de l'activité des calpaïnes. En

outre, selon les résultats de Mamoune *et al.* (2003) et d'Ohguchi *et al.* (2005), l'inhibition de l'activité de ces enzymes permet de réduire les capacités migratoires et invasives des cellules cancéreuses (cancer de la peau et de la prostate).

L'invasion tumorale est un phénomène pathologique impliqué dans la dissémination métastatique. Ce processus qui aboutit à la formation de métastases a été décrit par Steeg en 2003. Les cellules tumorales qui se sont développées dans leur tissu d'origine (cancer *in situ*) vont acquérir des capacités invasives. Ces cellules vont alors dégrader la lame basale qui les sépare du reste de l'organisme. Elles traversent alors la matrice lysée et envahissent les tissus sains environnants. Certaines cellules vont ensuite rejoindre la circulation sanguine ou lymphatique et ainsi atteindre des organes plus ou moins éloignés où elles formeront des métastases. L'invasion tumorale nécessite la formation de structures membranaires particulières appelées podosomes et invadopodes. Ces structures se caractérisent par une polymérisation de l'actine importante en réseau dense appelé *meshwork* et par la présence de grandes quantités de protéases telles que les MMP (Burgstaller & Gimona, 2005). De nombreuses protusions pénétrant à l'intérieur de la matrice extracellulaire (MEC) sont également observées au niveau des invadopodes, ce qui n'est pas le cas au niveau des podosomes dont la structure se rapproche de celle des plaques d'adhésion (Baldassarre *et al.*, 2003). Des travaux récents suggèrent que les podosomes serviraient à « tester » la MEC. En présence d'une matrice adéquate, ces structures évolueraient en invadopodes, permettant ainsi la dégradation de la MEC (Buccione *et al.*, 2004). Les calpaïnes pourraient intervenir dans la formation de ces structures membranaires mais également au cours de la dégradation de la MEC ; certaines protéines de la matrice sont des substrats potentiels de ces enzymes.

Dans ce travail nous nous sommes intéressés aux capacités invasives de cellules tumorales musculaires, les rhabdomyosarcomes (RMS). Ces cellules expriment, comme les cellules musculaires saines, les protéines spécifiques du muscle telles que les facteurs myogéniques (MRF), la desmine et la myosine (Dias *et al.*, 1990 ; Parham *et al.*, 1991). L'observation microscopique des rhabdomyosarcomes a permis de différencier plusieurs types de RMS dont les principaux sont les rhabdomyosarcomes alvéolaires (ARMS) et embryonnaires (ERMS). Les RMS sont responsables du cancer du muscle qui atteint principalement les enfants de moins de 15 ans. Ils se développent au niveau des extrémités, de la tête ou du cou. Ce type de cancer qui apparaît le plus souvent de manière sporadique, est dû à des altérations génétiques non héréditaires. Dans le cas des ARMS, la translocation des bras longs des chromosomes 2 et 13 entraîne la fusion des gènes *PAX3* et *FKHR* (Turc-Carel *et al.*, 1986). Le facteur de transcription résultant de cette fusion régulerait de façon aberrante

l'expression de ses gènes cibles. La fusion des gènes *PAX7* (chromosome 1) et *FKHR* est également observée chez certains ARMS. Quant aux ERMS, ils présentent une expression anormalement élevée de l'IGF-2 due soit à une perte de la répression de l'allèle maternel du gène codant pour ce facteur de croissance (LOI, *loss of imprinting*) soit à une duplication de l'allèle paternel (LOH, *loss of heterozygosity*) (Scrabble *et al.*, 1989). L'IGF-2 serait responsable de la croissance dérégulée de certaines cellules tumorales dont les ERMS (El Badry *et al.*, 1990). Les RMS peuvent acquérir des capacités invasives et ainsi former des métastases au niveau des poumons, des os, de la moelle osseuse et des nodules lymphatiques, ce qui réduit les chances de guérison à moins de 20% (Dagher & Helman, 1999).

Le but de ce travail est d'étudier le système protéolytique neutre calcium-dépendant des RMS et sa possible implication dans l'invasion tumorale. Dans un premier temps, la morphologie, l'organisation du cytosquelette d'actine et l'adhésion des ARMS et des ERMS ont été étudiées et comparées à celles de cellules musculaires saines (C2C12 et LHCNM2). Puis, l'expression et l'activité des principaux composants du système protéolytique calcium-dépendant (μ -calpaïne, m-calpaïne, calpastatine) ont été quantifiées et comparées. Enfin les capacités invasives des RMS ont été mesurées en présence ou en absence d'un inhibiteur chimique spécifique des calpaïnes, la calpeptine. Nos résultats démontrent clairement que le système protéolytique calcium-dépendant des RMS est fortement altéré. Cette dérégulation est probablement à l'origine de la désorganisation du cytosquelette d'actine et du défaut d'adhésion que présentent ces cellules. Les RMS possèdent d'importantes capacités invasives qui sont fortement réduites par l'inhibition de l'activité des calpaïnes ce qui suggère une forte implication de ces protéases lors du processus invasif.

2. Matériel et méthodes

2.1. Réactifs et matériel

Les milieux de culture 199 et DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) ainsi que le FBS (fœtal bovine serum) sont fournis par Gibco-BRL. Le matériel de culture cellulaire provient de chez Fisher-Scientific (boîtes de culture) et de chez BD Biosciences (inserts de culture, chambres de Boyden). Le kit de dosage protéique BCA (bicinchoninic acid) de Pierce est utilisé en western blot ainsi que la membrane PVDF (polyvinylidene fluoride) de Millipore et le NBT/BCIP (nitrobleu tetrazolium / 5-bromo-4-chloro-3-indoyl-1-phosphate) de Promega. La calpeptine est fournie par Calbiochem, la phalloïdine-FITC par Sigma-Aldrich et le t-BOC-LM-CMAC par Invitrogen.

2.2. Anticorps

Les anticorps dirigés contre la m-calpaïne ont été obtenus chez le mouton comme il a été précédemment décrit (Brustis *et al.*, 1994). Les anticorps anti- β -tubuline et anti-calpastatine sont fournis par Santa Cruz Biotechnology (H-235 et H-300 respectivement). Les anticorps dirigés contre la μ -calpaïne ainsi que la totalité des anticorps secondaires proviennent de chez Sigma-Aldrich.

2.3. Culture cellulaire

Les myoblastes de souris (lignée C2C12) ainsi que les rhabdomyosarcomes humains (ARMS Rh30 et ERMS RD) sont cultivés dans du DMEM supplémenté avec 10% de FBS (v/v) à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO₂. Le milieu de culture des myoblastes humains (LHCNM2) contient du DMEM (60%), du milieu 199 (20%) et du FBS (20%). Les quatre types cellulaires sont conservés à -80°C ou à -196°C dans du milieu de congélation (45% DMEM, 45% FBS, 10% DMSO).

2.4. Traitement inhibiteur des calpaïnes

La calpeptine (Z-Leu-Nle-CHO), inhibiteur chimique spécifique de la μ - et de la m-calpaïne, est reprise dans du DMSO à une concentration de 50 mM. La calpeptine est ajoutée dans le milieu de culture afin d'obtenir une concentration finale de 60 μ M.

2.5. Observation du cytosquelette d'actine

Les cellules (C2C12, ARMS, ERMS et LHCNM2) sont cultivées sur des lamelles en verre recouvertes de gélatine (1 mg/mL) dans du milieu de quiescence (DMEM contenant 0,1% de FBS). Après 24 h de culture, les cellules sont lavées avec du PBS (phosphate buffer saline), fixées au paraformaldéhyde (PAF, 4%) pendant 15 minutes et déshydratées dans de l'éthanol (70%) sur la nuit. Les cellules sont ensuite perméabilisées en utilisant du PBS contenant 1% de Triton X-100 pendant 3 minutes. L'actine polymérisée est colorée avec de la phalloïdine couplée au FITC (0,5 μ M) pendant 40 minutes. Après trois lavages au PBS, les cellules sont observées à l'aide d'un microscope à immunofluorescence (Leica AF6000).

2.6. Test d'adhésion

Les cellules (C2C12, RMS et LHCNM2) sontensemencées dans des plaques de 96 puits contenant du milieu de quiescence à une densité de 5.10^3 cellules par cm². Après

différents temps d'incubation (0, 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 8 h), les cellules sont lavées trois fois au PBS et fixées avec du PAF 4% pendant 15 minutes. Après déshydratation à l'éthanol sur la nuit, les cellules sont colorées à l'hémalum de Hansen et comptées. Le taux d'adhésion, exprimé en pourcentage, est calculé en faisant le rapport du nombre de cellules ayant adhéré sur le nombre de cellulesensemencées.

2.7. Test d'invasion

L'invasion est mesurée en utilisant des chambres de Boyden. La base des inserts de culture utilisés est une membrane en PET percée de pores de 8 μm de diamètre. Les cellules (C2C12, RMS et LHCNM2) sontensemencées sur la membrane dans du milieu de quiescence à une densité de 10^5 cellules par cm^2 . Du milieu de quiescence est également rajouté sous la membrane. Après 48 h d'incubation, les cellules restées au dessus de la membrane sont grattées. Les cellules situées en dessous de la membrane sont fixées au PAF 4%, déshydratées à l'éthanol pendant une nuit, colorées et comptées. La même expérience est réalisée avec des inserts de culture dont la membrane PET est recouverte de Matrigel (matrice constituée de collagène, de laminine et d'entactine). Les cellules ayant traversé la membrane sont colorées et comptées. Ces cellules sont considérées comme invasives puisqu'elles ont dégradé la matrice. Le taux d'invasion, exprimé en pourcentage, est calculé en faisant le rapport du nombre de cellules invasives (ayant traversé la membrane avec Matrigel) sur le nombre de cellules ayant traversé la membrane sans Matrigel (par migration). L'indice d'invasion qui permet de comparer les capacités invasives des différents types cellulaires est calculé en faisant le rapport entre le taux d'invasion des cellules à tester sur le taux d'invasion des cellules dites témoins (ici les LHCNM2). L'indice d'invasion des LHCNM2 est donc de 1.

2.8. Western blot

Les cellules sont lavées au PBS puis détachées de la boîte de culture par grattage dans du PBS contenant 5mM d'EGTA (éthylène glycol-bis(2-aminoéthylether)-N, N, N', N'-tetraacetic acid), 0,5 mM de DTT (DL-dithiothreitol), 1 mM de NaN_3 (azide de sodium), 20 μM de leupeptine, 10 mM de benzamidine et 1 mM de PMSF (phénylméthylsulfonyl fluoride). Les cellules sont ensuite soniquées et centrifugées 10 minutes à 15 000 g. Les protéines extraites sont quantifiées à l'aide du kit de dosage BCA. Du tampon de charge (0,05 mM de Tris-HCl pH 6,8, 4% de SDS, 0,01% de bleu de bromophénol, 30% de glycérol et 1% de DTT) est ajouté dans 45 μg de chaque échantillon. Les protéines sont ensuite dénaturées à 95°C pendant 5 minutes. La séparation des protéines est réalisée par SDS-PAGE (gel

contenant 10% d'acrylamide) selon la technique décrite par Laemmli en 1970. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de PVDF par transfert électrique semi-sec (0,8 mA par cm² de membrane) pendant 45 minutes pour la β -tubuline, la μ -calpaïne et la m-calpaïne et pendant 1h15 pour la calpastatine. Les membranes sont saturées pendant 90 minutes dans du tampon TBS (Tris buffer saline) contenant 5% de lait demi écrémé (p/v). Après lavages, les membranes sont incubées pendant 3 h dans du TBS contenant 1% de lait ainsi que les différents anticorps. Les dilutions suivantes sont utilisées : 1/1000 pour l'anticorps anti-m-calpaïne, 1/2500 pour la μ -calpaïne, 1/500 pour la β -tubuline et 1/250 pour la calpastatine. Les membranes sont ensuite rincées au TBS et incubées pendant 1 h dans du TBS contenant 1% de lait ainsi que les différents anticorps secondaires (dilués au 1/10000). Ces anticorps étant couplés à la phosphatase alcaline, la révélation est réalisée à l'aide de NBT/BCIP. La densité apparente des bandes obtenues est quantifiée à l'aide d'un vidéo densitomètre (Gel-Doc 2000, Quantity One, Biorad) et corrigée selon l'expression de la β -tubuline. Les expressions des calpaïnes et de la calpastatine observées chez les RMS sont exprimées en pourcentage en comparaison de celles obtenues avec les LHCNM2.

2.9. Quantification de l'activité des calpaïnes

L'activité des calpaïnes est observée et quantifiée sur des cellules vivantes à l'aide du t-BOC-LM-CMAC (t-BOC-Leu-Met-chlorométhylaminocoumarine). Cette molécule qui pénètre dans les cellules de manière passive devient fluorescente après clivage par les calpaïnes. Les cellules sontensemencées dans du milieu de quiescence sur des lamelles en verre recouvertes de gélatine (1 mg/mL). Après 24 h, le milieu est remplacé par du DMEM sans sérum contenant 50 μ M de t-BOC-LM-CMAC. Les cellules sont incubées pendant 30 minutes à l'obscurité. L'activité est ensuite observée à l'aide d'un microscope à fluorescence (Leica ; excitation : 329 nm, émission : 409 nm). La fluorescence résultant de l'activité des calpaïnes est quantifiée grâce au logiciel Leica Application Suite.

2.10. Analyses statistiques

Les valeurs présentées sont les moyennes accompagnées de leurs erreurs standard (SEM) et sont représentatives d'au moins trois manipulations différentes. La signification statistique des différences est déterminée en utilisant ANOVA. Quand F est associé à une probabilité $p < 0,05$, les comparaisons sont réalisées en utilisant le test t de Student.

3. Résultats et discussion

3.1. Observation de la morphologie et du cytosquelette d'actine des rhabdomyosarcomes

Le cytosquelette d'actine étant impliqué dans l'adhésion cellulaire et dans les phénomènes migratoires, il était intéressant d'observer son organisation chez les RMS et de la comparer avec celle des cellules musculaires saines. Comme le montre les Fig. 1A et 1B, la morphologie et l'organisation du cytosquelette d'actine des C2C12 et des LHCNM2 sont similaires. Ces cellules musculaires saines présentent une forme allongée avec de nombreuses protusions membranaires. L'actine est organisée en fibres de stress parallèles à l'axe principal de la cellule. Ces fibres, nombreuses, soutiennent également les extensions membranaires. Les RMS présentent une morphologie très différente de celle des cellules musculaires saines. Leur forme est plutôt arrondie et les extensions membranaires sont absentes ou peu nombreuses (Fig. 1C et 1D). Contrairement aux C2C12 et aux LHCNM2, les cellules tumorales humaines présentent une importante désorganisation du cytosquelette d'actine. L'actine n'est pas agencée sous forme de fibres de stress, elle est principalement concentrée au niveau de la membrane plasmique. Aucune différence significative n'est observée entre les deux types de RMS. La morphologie de ces cellules tumorales et l'organisation de leur cytosquelette d'actine rappellent celles décrites chez des cellules saines (C2C12) surexprimant les calpaïnes ou la calpastatine (Dedieu *et al.*, 2004 ; Leloup *et al.*, 2006). Cette similitude et le fait que les calpaïnes interviennent dans l'organisation du cytosquelette d'actine nous laisse penser que le système protéolytique neutre calcium-dépendant des rhabdomyosarcomes pourrait être dérégulé. L'absence d'extensions membranaires et de fibres de stress chez les RMS pourrait perturber les phénomènes de migration et/ou d'adhésion cellulaire.

3.2. Les rhabdomyosarcomes présentent un important défaut d'adhésion

L'absence de fibres de stress pourrait être due à une réduction importante des contacts focaux, ce qui perturberait fortement l'adhésion des rhabdomyosarcomes. En conséquence, des tests d'adhésion ont été réalisés en utilisant les cellules musculaires saines et tumorales. Les résultats présentés Fig. 2 montrent que les myoblastes C2C12 adhèrent rapidement. Après 4 heures de culture, 50% des cellules ont adhéré et le taux d'adhésion atteint 100% après 8 h. Les tests réalisés avec les myoblastes humains montrent qu'ils se comportent comme les C2C12. En effet, aucune différence significative n'est observée lorsque l'on compare les taux d'adhésion des deux types cellulaires. Les résultats obtenus avec les ARMS et les ERMS sont

significativement différents de ceux obtenus avec les myoblastes sains. Le taux d'adhésion des ARMS est de 31% après 4 h de culture et de seulement 34% après 8 h. Les ERMS présentent un défaut d'adhésion encore plus significatif que les ARMS puisque seulement 17% de ces cellules ont adhéré après 4 h de culture. Après 8 h d'incubation ce taux d'adhésion est de 25%. Les importants défauts d'adhésion caractérisant les deux types de RMS sont probablement la conséquence de la désorganisation du cytosquelette d'actine observée dans ces cellules. Une étude récente montre une surexpression du gène *LAMC2* chez les RMS conduisant à la destruction des plaques d'adhésion (Goldstein *et al.*, 2006). Les défauts d'adhésion observés pourraient également être la conséquence d'une dérégulation du système protéolytique calcium-dépendant puisque nous avons montré une implication de ces protéases dans l'adhésion des cellules musculaires saines (Mazères *et al.*, 2006). Comme ces enzymes pourraient réguler à la fois la formation et la dissociation des plaques d'adhésion (Glading *et al.*, 2002), la réduction de l'activité des calpaïnes pourrait inhiber la formation de ces complexes protéiques et limiter ainsi l'adhésion. De même, une activité anormalement élevée des calpaïnes serait également susceptible d'altérer le phénomène d'adhésion en dégradant les plaques d'adhésion. Pour confirmer cette dernière hypothèse, nous avons mesuré l'expression et l'activité des différents acteurs du système protéolytique calcium-dépendant.

3.3. L'expression des calpaïnes et de la calpastatine est fortement perturbée chez les RMS

L'expression des trois principaux acteurs du système protéolytique calcium-dépendant (μ -calpaïne, m-calpaïne et calpastatine) a été quantifiée par Western blot chez les cellules LHCNM2, ARMS et ERMS au moment de l'ensemencement et après 24 h de culture. Les résultats étant identiques pour les deux stades considérés, seuls ceux obtenus lors de l'ensemencement sont présentés Fig. 3. Comme le montre la Fig. 3A, chez les ARMS et les ERMS, l'expression de la μ -calpaïne est fortement réduite par rapport au témoin (LHCNM2). L'expression de cette protéase est 3 fois moins importante chez les RMS que chez les LHCNM2. L'expression de la m-calpaïne est également significativement plus faible chez les RMS en comparaison avec les LHCNM2. En effet, l'expression de cette enzyme, fixée à 100% pour les cellules saines, n'est que de 56% chez les ARMS et de 51% chez les ERMS (Fig. 3B). Selon ces résultats, il est clair que les cellules tumorales présentent une déplétion des calpaïnes ubiquitaires. En conséquence, une forte réduction de l'activité de ces protéases est attendue. L'étude du niveau d'expression de l'inhibiteur endogène des calpaïnes, la calpastatine, montre que cette protéine est très faiblement exprimée dans les RMS. Ainsi

l'expression de la calpastatine est réduite de 75% chez les ERMS et de 85% chez les ARMS en comparaison avec les LHCNM2 (Fig. 3C). Selon ces résultats, la faible expression de la calpastatine pourrait favoriser l'augmentation de l'activité des calpaïnes. La quantification de l'activité des calpaïnes devient donc indispensable.

3.4. L'activité des calpaïnes est fortement augmentée chez les RMS

L'activité des calpaïnes a été observée et quantifiée au moyen d'un substrat fluorogénique des calpaïnes, le t-BOC-LM-CMAC. Ce produit pénètre dans les cellules de manière passive, sans affecter leur viabilité. Le test est donc réalisé sur des cellules vivantes, en présence de concentrations calciques physiologiques. Contrairement au zymogramme, ce test prend également en compte l'activité de la calpastatine. L'observation des cellules traitées (Fig. 4A) montre que la fluorescence des RMS est significativement plus forte que celle des LHCNM2. La fluorescence issue de l'activité des calpaïnes a été quantifiée, les résultats sont présentés Fig. 4B. Comme l'indiquent les histogrammes, les RMS présentent une fluorescence plus importante et donc une activité protéolytique plus forte que celle des cellules témoins (saines). Ainsi, en comparaison avec les cellules saines, l'activité des calpaïnes des ARMS serait augmentée d'un facteur 3 fois et celle des ERMS d'un facteur 2. Cette forte activité des calpaïnes pourrait être à l'origine d'une protéolyse anarchique expliquant, du moins en partie, la désorganisation du cytosquelette d'actine et l'important défaut d'adhésion de ces cellules. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans d'autres laboratoires. En effet, Carragher et ses collaborateurs (2004) ont montré que l'activité des calpaïnes est le plus souvent plus élevée dans les cellules transformées et tumorales. En outre, Lakshmikuttyamma et ses collaborateurs (2004) ont signalé l'augmentation de l'activité de la m-calpaïne dans des adénocarcinomes colorectaux humains, toutefois, selon ces auteurs, cette hausse serait strictement corrélée à l'augmentation de l'expression de cette protéase.

3.5. L'inhibition des calpaïnes réduit fortement l'activité invasive des RMS

Un petit nombre d'études ayant montré qu'une augmentation de l'activité des calpaïnes stimule l'invasion tumorale des cellules cancéreuses (Xu & Deng, 2004 et 2006a), nous avons étudié les capacités invasives des RMS. Dans ce but, des tests d'invasion ont été réalisés en utilisant les LHCNM2 (cellules témoins), les C2C12 et les deux types de RMS. Les taux d'invasion sont présentés Fig. 5A et les indices d'invasion Fig. 5B. Les résultats obtenus indiquent que les cellules musculaires saines présentent des taux d'invasion très faibles (7% pour les LHCNM2 et 13% pour les C2C12). A l'inverse, les rhabdomyosarcomes possèdent

d'importantes capacités invasives ; les taux d'invasion sont de 83% pour les ARMS et de 91% pour les ERMS. Corrélativement, les indices d'invasion des RMS sont très élevés (11,2 pour les ARMS et 12,3 pour les ERMS). Celui des C2C12 est beaucoup plus faible et proche de 1 (1,8). En présence d'un inhibiteur spécifique des calpaïnes (la calpeptine), les capacités invasives des RMS sont significativement réduites. En effet, les taux d'invasion des ARMS et des ERMS sont voisins de 6% après ajout de 60 μ M de calpeptine. Les indices d'invasion sont alors de 0,9 pour les ARMS et de 0,8 pour les ERMS. Les capacités invasives des RMS sont désormais très faibles et proches de celles des cellules musculaires saines. Selon ces résultats, l'activité des calpaïnes est requise lors de l'invasion tumorale des RMS. Ils sont en accord avec ceux obtenus sur d'autres types de cellules cancéreuses telles que les cellules tumorales de la prostate (Mamoune *et al.*, 2003) et les cellules tumorales pulmonaires (Xu & Deng, 2006a et 2006b). Dans ce contexte, l'activité importante des calpaïnes provoquerait la désorganisation du cytosquelette d'actine. En conséquence, le phénomène d'adhésion fortement réduit faciliterait la mobilité des rhabdomyosarcomes, facteur limitant de l'invasion tumorale (Kassis *et al.*, 2002). Les calpaïnes pourraient également contrôler l'invasion tumorale en régulant la formation des invadopodes, mais également en agissant sur l'expression des MMP-2 et -9 (Popp *et al.*, 2003).

En conclusion, nos résultats soulignent l'implication des calpaïnes ubiquitaires dans l'invasion tumorale des RMS. Bien que l'expression de ces enzymes soit réduite dans ces cellules, la très faible expression de leur inhibiteur endogène entraîne une forte augmentation de l'activité. Cette activité anormalement élevée pourrait être à l'origine de la désorganisation du cytosquelette d'actine et de l'important défaut d'adhésion observé chez les deux types de RMS. Les capacités invasives de ces cellules feraient également intervenir l'activité exacerbée de ces protéases, leur conférant ainsi le statut de cible thérapeutique importante comme le souligne Carragher (2006). Ainsi, l'utilisation d'inhibiteurs chimiques spécifiques des calpaïnes permettrait par exemple de limiter la formation de métastases. Concernant les RMS, la surexpression de la calpastatine devrait permettre de compenser sa faible expression et de réduire ainsi leurs capacités invasives. Bien que nos résultats montrent clairement que les calpaïnes sont impliquées dans l'invasion tumorale des RMS, de nombreux points restent à élucider tels que le mode d'action et le rôle exact de chacune des deux isoformes à l'échelle moléculaire.

Références

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.

Averna, M., De Tullio, R., Capini, P., Salamino, F., Pontremoli, S., & Melloni, E. (2003). Changes in calpastatin localisation and expression during calpain activation: a new mechanism for the regulation of intracellular Ca²⁺-dependent proteolysis. *Cell. Mol. Life Sci.*, *60*, 2669-2678.

Baldassarre, M., Pompeo, A., Beznoussenko, G., Castaldi, C., Cortellino, S., McNiven, M. A., Luini, A., & Buccione, R. (2003). Dynamins participate in focal extracellular matrix degradation by invasive cells. *Mol. Biol. Cell*, *14*, 1074-1084.

Biswas, S., Harris, F., Singh, J., & Phoenix, D. A. (2004). The in vitro retardation of porcine cataractogenesis by the calpain inhibitor, SJA 6017. *Mol. Cell Biochem.*, *261*, 169-173.

Brustis, J.-J., Elamrani, N., Balcerzak, D., Safwate, A., Soriano, M., Poussard, S., Cottin, P., & Ducastaing, A. (1994). Rat myoblast fusion requires exteriorised m-calpain activity. *Eur. J. Cell Biol.*, *64*, 320-327.

Buccione, R., Orth, J. D., & McNiven, M. A. (2004). Foot and mouth: podosomes, invadopodia and circular dorsal ruffles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, *5*, 647-657.

Burgstaller, G., & Gimona, M. (2005). Podosome-mediated matrix resorption and cell motility in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, *288*, H3001-3005.

Carragher, N. O., & Frame, M. C. (2002). Calpain: a role in cell transformation and migration. *Int. J. Bioch. Cell Biol.*, *34*, 1539-1543.

Carragher, N. O., Fonseca, B. D., & Frame, M. C. (2004). Calpain activity is generally elevated during transformation but has oncogene-specific biological functions. *Neoplasia*, *6*, 53-73.

Carragher, N. O. (2006). Calpain inhibition: a therapeutic strategy targeting multiple disease states. *Curr. Pharm. Des.*, *12*, 615-638.

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*, S19-25.

Crocker, S. J., Smith, P. D., Jackson-Lewis, V., Lamba, W. R., Hayley, S. P., Grimm, E., Callaghan, S. M., Slack, R. S., Melloni, E., Przedborski, S., Robertson, G. S., Anisman, H., Merali, Z., & Park, D. S. (2003). Inhibition of calpains prevents neuronal and behavioural deficits in an MPTP mouse model of Parkinson's disease. *J. Neurosci.*, *23*, 4081-4091.

Dagher, R., & Helman, L. (1999). Rhabdomyosarcoma: an overview. *Oncologist*, *4*, 34-44.

Dedieu, S., Poussard, S., Mazères, 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.

Dias, P., Parham, D. M., Shapiro, D. N., Webber, B. L., & Houghton, P. J. (1990). Myogenic regulatory protein (MyoD1) expression in childhood solid tumors: diagnostic utility in rhabdomyosarcoma. *Am. J. Pathol.*, *137*, 1283-1291.

El-Badry, O. M., Minniti, C., Kohn, E. C., Houghton, P. J., Daughaday, W. H., & Helman, L. J. (1990). Insulin-like growth factor II acts as an autocrine growth and motility factor in human rhabdomyosarcoma tumors. *Cell Growth Differ.*, *1*, 325-331.

Gafni, J., & Ellerby, L. M. (2002). Calpain activation in Huntington's disease. *J. Neurosci.*, *22*, 4842-4849.

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.

Goldstein, M., Meller, I., Issakov, J., & Orr-Urtreger, A. (2006). Novel genes implicated in embryonal, alveolar, and pleomorphic rhabdomyosarcoma: a cytogenetic and molecular analysis of primary tumors. *Neoplasia*, *8*, 332-343.

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

Higuchi, M., Iwata, N., & Saido, T. C. (2005). Understanding molecular mechanisms proteolysis in Alzheimer's disease: progress toward therapeutic interventions. *Biochim. Biophys. Acta*, *1751*, 60-67.

Kassis, J., Radinsky, R., & Wells, A. (2002). Motility is rate-limiting for invasion of bladder carcinoma cell lines. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, *34*, 762-775.

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

Lakshmikuttyamma, A., Selvakumar, P., Kanthan, R., Kanthan, S. C., & Sharma, R. K. (2004). Overexpression of m-calpain in human colorectal adenocarcinomas. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, *13*, 1604-1609.

Leloup, L., Mazères, 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.

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.

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.

Mazères, 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.

Ohguchi, K., Akao, Y., & Nozawa, Y. (2005). Involvement of calpain in melanogenesis of mouse B16 melanoma cells. *Mol. Cell Biochem.*, *275*, 103-107.

Parham, D. M., Webber, B., Holt, H., Williams, W. K., & Maurer, H. (1991). Immunohistochemical study of childhood rhabdomyosarcomas and related neoplasms. Results of an intergroup rhabdomyosarcoma study project. *Cancer*, *67*, 3072-3080.

Popp, O., Heidinger, M., Ruiz-Heinrich, L., Ries, C., Jochum, M., & Gil-Parrado, S. (2003). The calpastatin-derived calpain inhibitor CP1B reduces mRNA expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 and invasion by leukemic THP-1 cells. *Biol. Chem.*, *384*, 951-958.

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.

Saido, T. C., Shibata, M., Takenawa, T., Murofushi, H., & Suzuki, K. (1992). Positive regulation of mu-calpain action by polyphosphoinositides. *J. Biol. Chem.*, *267*, 24585-24590.

Schád, E., Farkas, A., Jékely, G., Tompa, P., & Friedrich, P. (2002). A novel human small subunit of calpains. *Biochem. J.*, *362*, 383-388.

Scrabble, H., Witte, D., Shimada, H., Seemayer, T., Sheng, W. W., Soukup, S., Koufos, A., Houghton, P., Lampkin, B., & Cavenee, W. (1989). Molecular differential pathology of rhabdomyosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 1, 23-35.

Steeg, P. S. (2003). Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells. *Nat. Rev. Cancer*, 3, 55-63.

Turc-Carel, C., Lizard-Nacol, S., Justrabo, E., Favrot, M., Philip, T., & Tabone, E. (1986). Consistent chromosomal translocation in alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 19, 361-362.

Xu, L., & Deng, X. (2004). Tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone induces phosphorylation of mu- and m-calpain in association with increased secretion, cell migration, and invasion. *J. Biol. Chem.*, 279, 53683-53690.

Xu, L., & Deng, X. (2006a). Protein kinase Ciota promotes nicotine-induced migration and invasion of cancer cells via phosphorylation of micro- and m-calpains. *J. Biol. Chem.*, 281, 4457-4466.

Xu, L., & Deng, X. (2006b). Suppression of cancer cell migration and invasion by protein phosphatase 2A through dephosphorylation of mu- and m-calpains. *J. Biol. Chem.*, 281, 35567-35575.

Légende des figures

Fig. 1. Observation de la morphologie et du cytosquelette d'actine des myoblastes et des rhabdomyosarcomes. Les cellules ont été ensemencées sur des lamelles en verre recouvertes de gélatine. Après 24 h, les cellules ont été fixées au PAF 4%, déshydratées à l'éthanol et perméabilisées avec du Triton X-100. L'actine a été colorée à l'aide de phalloïdine-FITC (0,5 μ M). Les cellules ont ensuite été observées à l'aide d'un microscope à fluorescence (Leica AF6000). Les cellules C2C12 (A) et LHCNM2 (B) ont une morphologie allongée avec des extensions membranaires (EM). L'actine est organisée en fibres de stress parallèles (FS). Au contraire les cellules ARMS (C) et ERMS (D) ont une forme arrondie et présentent une importante désorganisation du cytosquelette d'actine.

Fig. 2. Quantification de l'adhésion cellulaire des cellules C2C12, LHCNM2 et RMS. Les cellules ont été ensemencées dans des plaques de 96 puits contenant du milieu de quiescence à une densité de $5 \cdot 10^3$ cellules par cm^2 . Après différents temps d'incubation (0, 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 8 h), les cellules sont lavées trois fois au PBS puis fixées et déshydratées. Après coloration à l'hémalum de Hansen, les cellules sont comptées. Le taux d'adhésion, exprimé sous forme de pourcentage, est calculé en faisant le rapport du nombre de cellules adhérentes sur le nombre de cellules ensemencées au départ. Les barres sur le graphique représentent l'écart-type à la moyenne. * : Significativement différent du contrôle (C2C12) ($\alpha < 0,05$).

Fig. 3. Expression de la μ -calpaïne (A), de la m-calpaïne (B) et de la calpastatine (C) dans les LHCNM2, les ARMS et les ERMS. Les protéines sont extraites par sonication et séparées par SDS-PAGE. Après transfert, les protéines sont révélées avec des anticorps anti- β -tubuline, anti- μ -calpaïne, anti-m-calpaïne, et anti-calpastatine. La β -tubuline sert de contrôle. L'expression des différentes protéines est quantifiée et exprimée en pourcentage par rapport à celle obtenue avec les LHCNM2. Les barres sur le graphique représentent l'écart-type à la moyenne. * : Significativement différent du contrôle (LHCNM2) ($\alpha < 0,05$).

Fig. 4. Observation (A) et quantification (B) de l'activité des calpaïnes dans les LHCNM2, les ARMS et les ERMS. Les cellules sont ensemencées dans du milieu de quiescence. Après 24 h d'incubation, le milieu est remplacé par du DMEM sans sérum contenant 50 μ M de t-BOC-LM-CMAC. Les cellules sont incubées à l'obscurité pendant 30 minutes. Puis, la fluorescence est observée et quantifiée à l'aide d'un microscope à

fluorescence (Leica AF6000). La fluorescence est exprimée en Unité Arbitraire. Les barres sur le graphique (B) représentent l'écart-type à la moyenne. * : Significativement différent du contrôle ($\alpha < 0,05$).

Fig. 5. Quantification du taux d'invasion (A) et de l'indice d'invasion (B) des LHCNM2, des C2C12 et des RMS. Les cellules sontensemencées dans des chambres de Boyden avec ou sans Matrigel sur la membrane PET. Après 48 h d'incubation dans du milieu de quiescence, les cellules restées au dessus de la membrane sont grattées. Celles ayant traversées la membrane en présence ou en absence de Matrigel sont fixées, déshydratées, colorées à l'hémalum de Hansen et comptées. Le taux d'invasion de chaque type cellulaire (A), exprimé en pourcentage, est calculé en faisant le rapport du nombre de cellules ayant traversé la membrane avec Matrigel sur le nombre de cellules ayant la membrane sans Matrigel. L'indice d'invasion (B) des C2C12 et des RMS est calculé en faisant le rapport du taux d'invasion de ces cellules sur le taux d'invasion des cellules témoins (LHCNM2). Cette même expérience est réalisée en ajoutant de la calpeptine (60 μ M) dans le milieu de quiescence. Les barres sur le graphique (B) représentent l'écart-type à la moyenne.

* : Significativement différent des LHCNM2 ($\alpha < 0,05$)

** : Significativement différent des cellules non traitées avec la calpeptine ($\alpha < 0,05$)

Figure 1

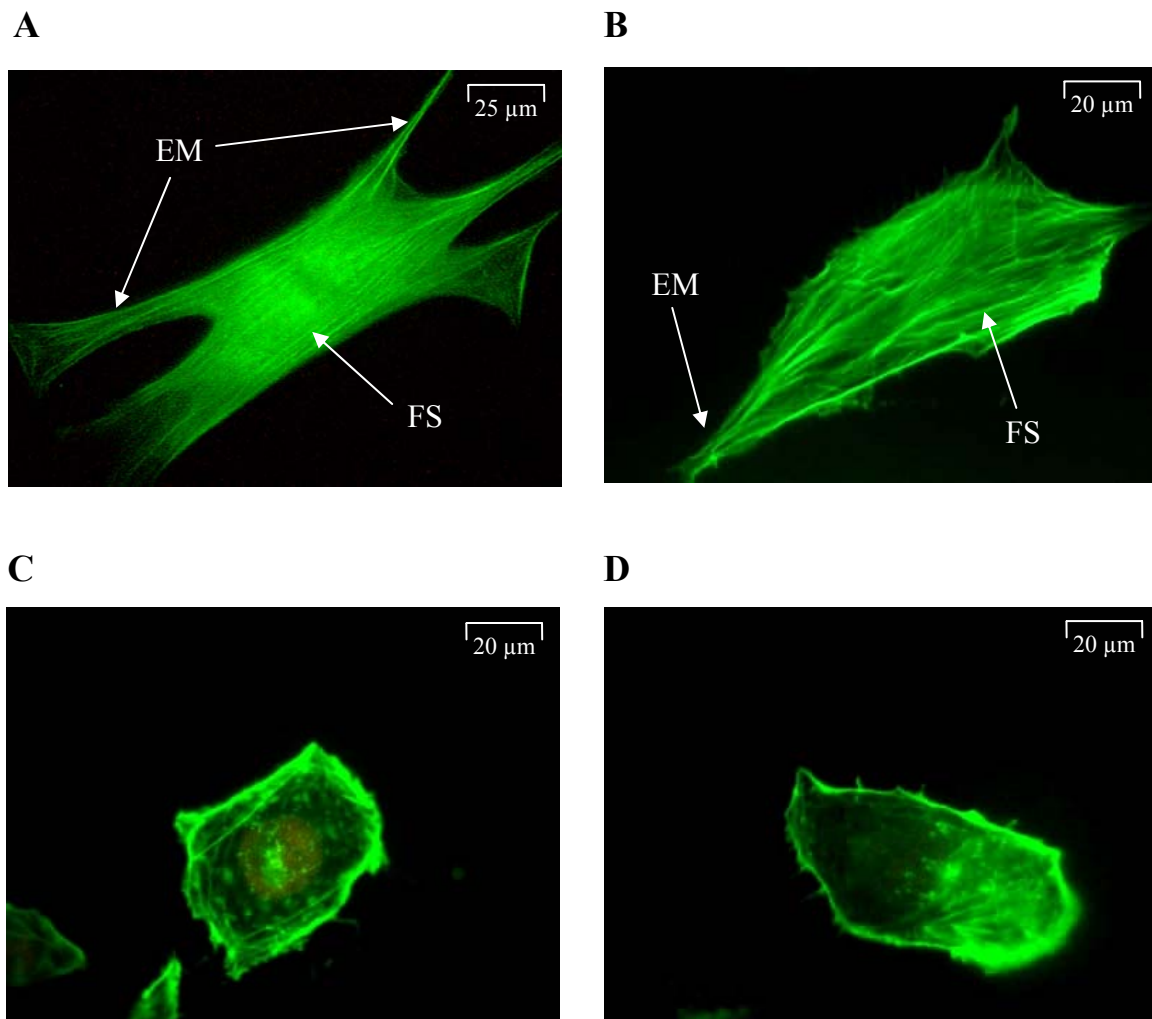


Figure 2

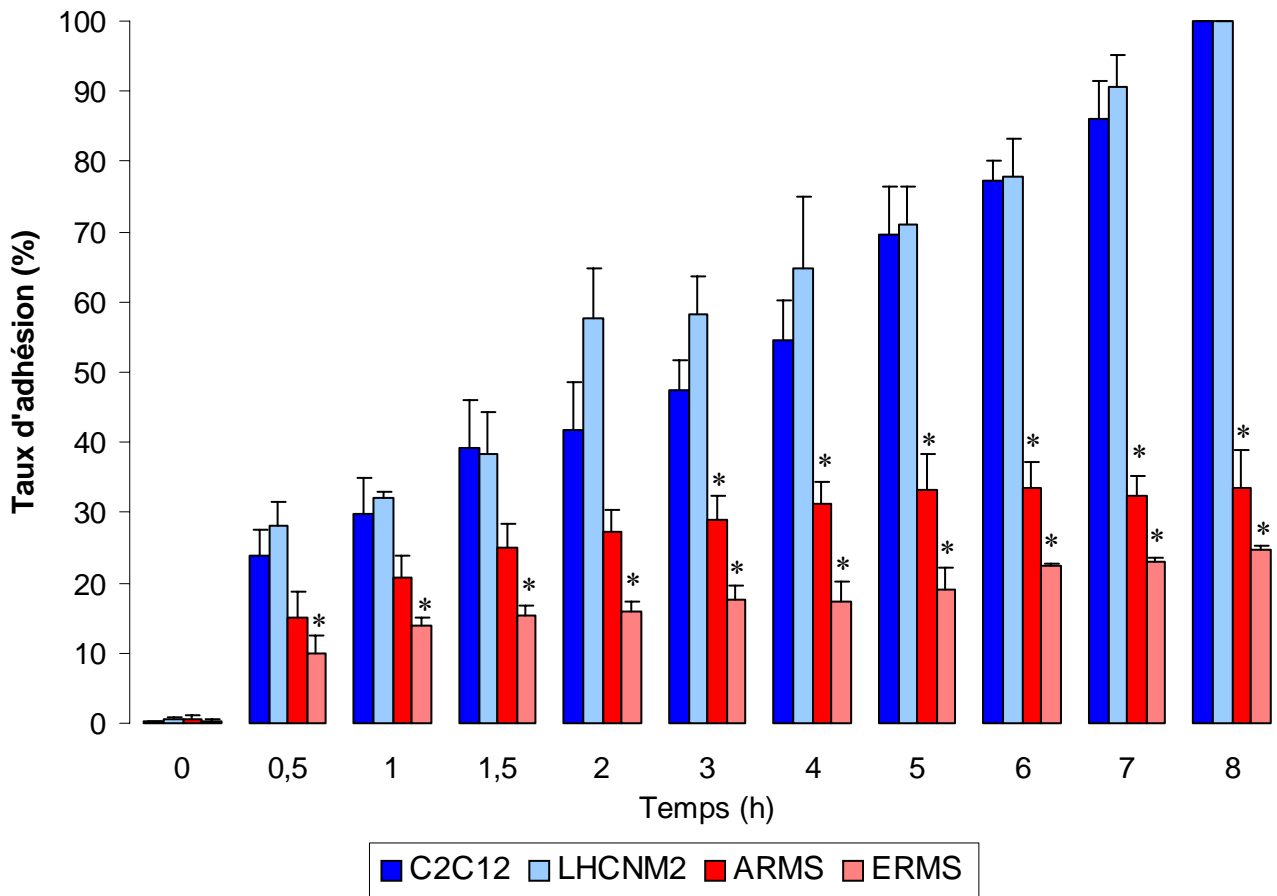


Figure 3

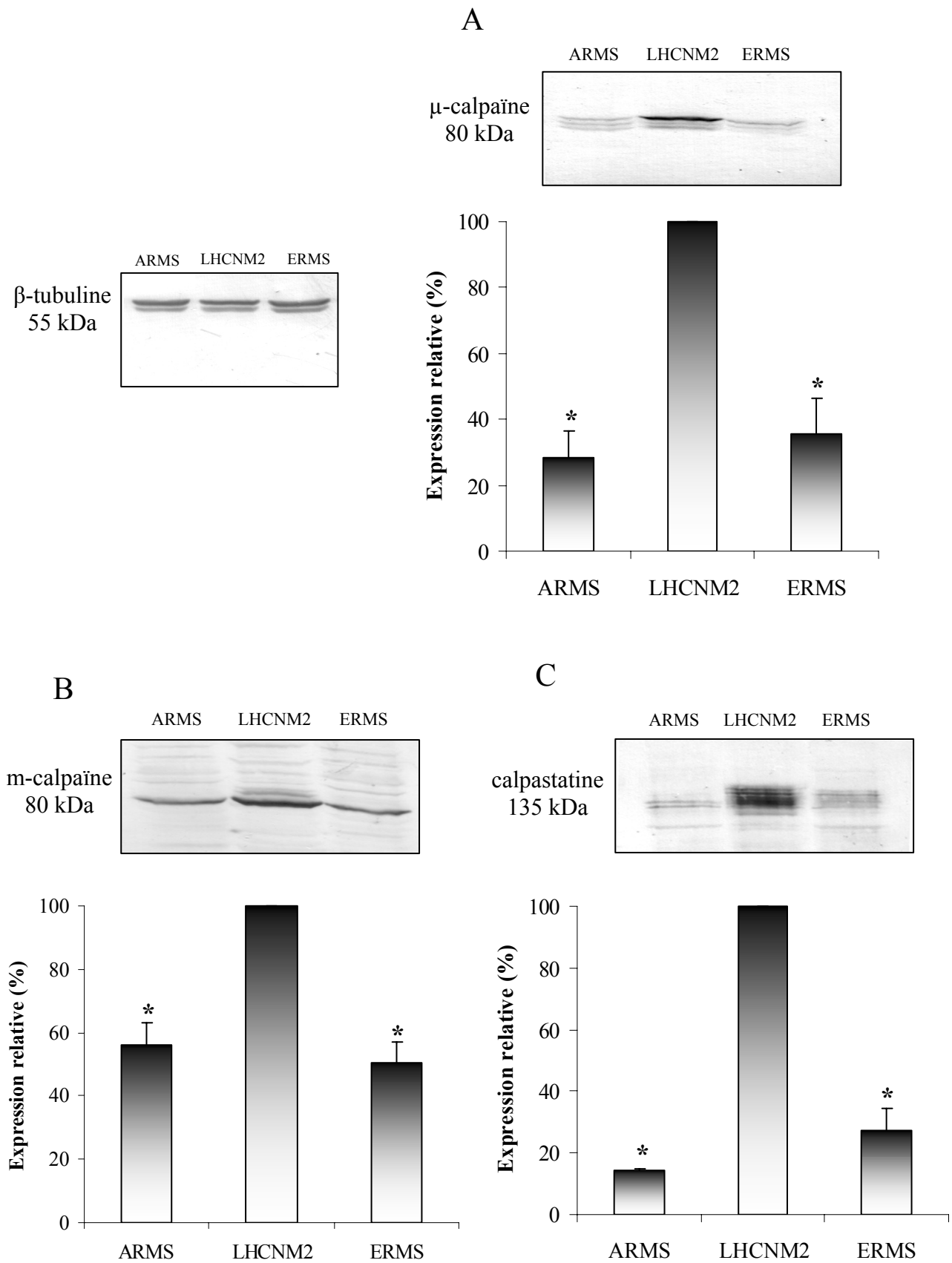


Figure 4

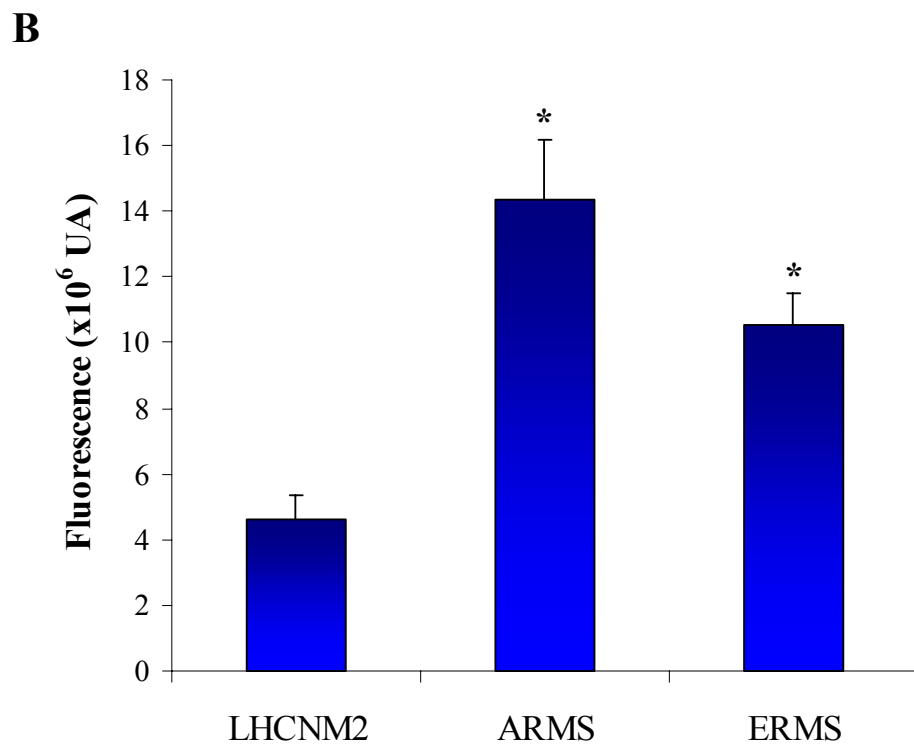
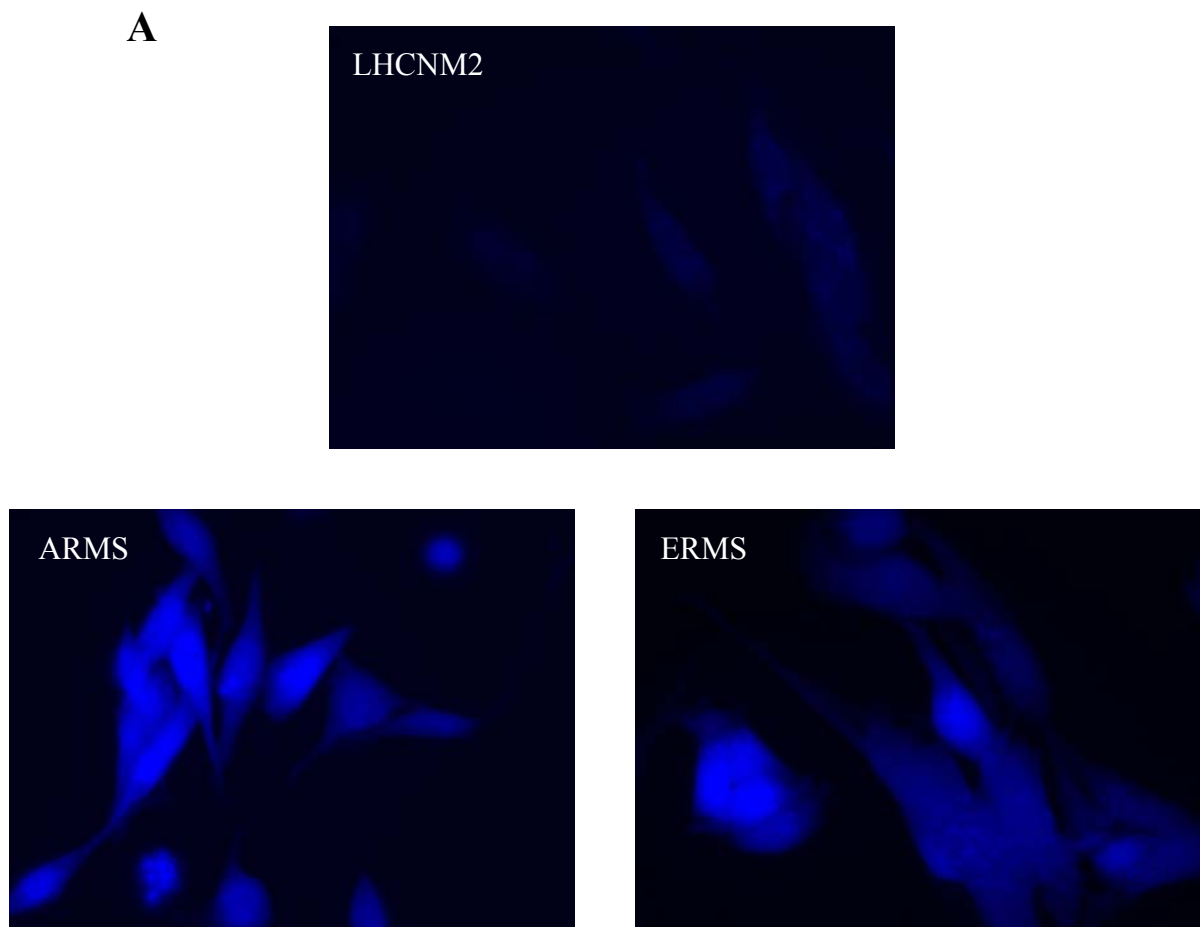
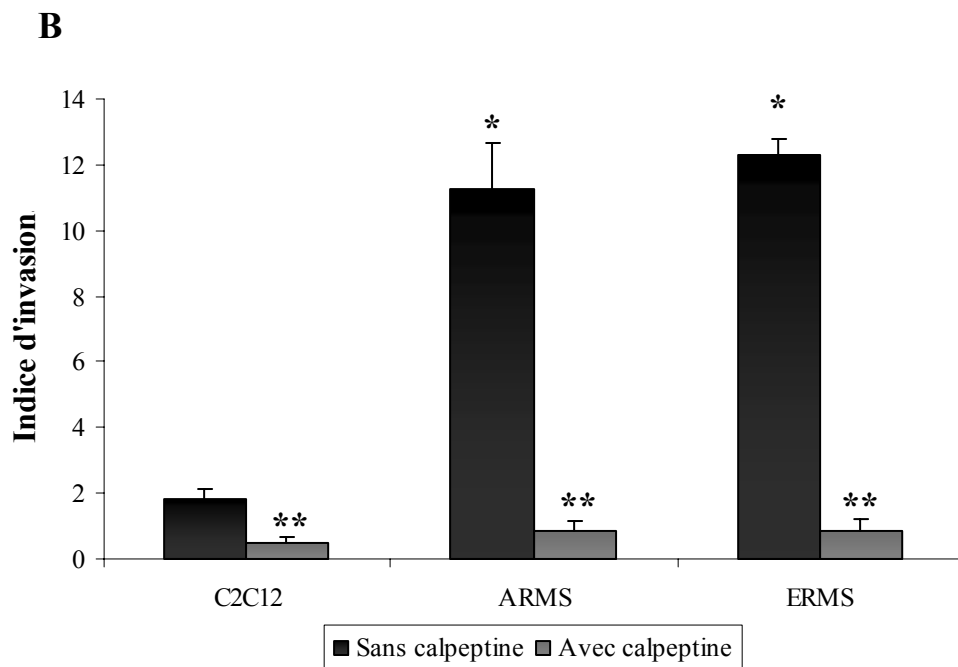
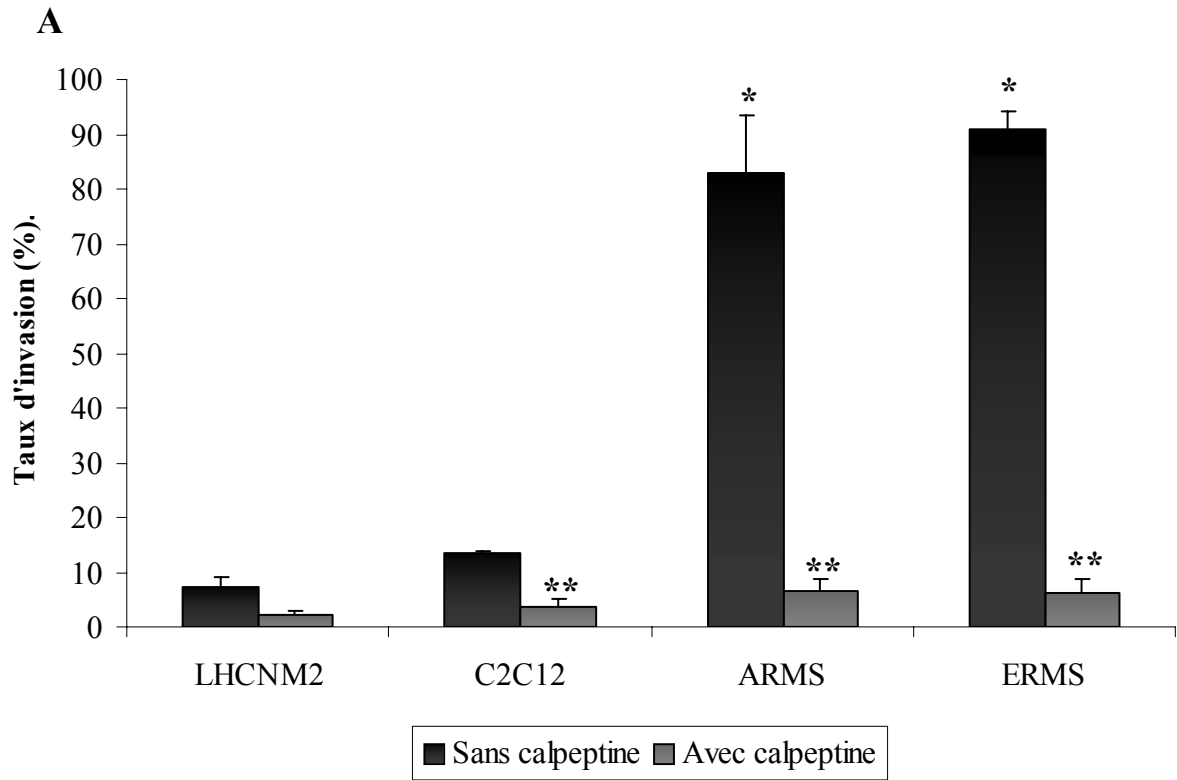


Figure 5



Conclusion et Perspectives

Les études réalisées précédemment au laboratoire ont mis en évidence une forte implication des calpaïnes ubiquitaires dans les étapes précoces de la myogenèse et plus particulièrement au cours de la migration des cellules myogéniques (Dedieu *et al.*, 2003 et 2004). Les travaux présentés dans ce manuscrit avaient pour objectif de confirmer et de compléter les données obtenues antérieurement concernant l'adhésion et la migration des myoblastes. En outre, nous avons initié une étude s'intéressant au système protéolytique calcium-dépendant dans deux types de cellules tumorales musculaires, les rhabdomyosarcomes embryonnaires et alvéolaires.

➤ **Rôle des calpaïnes au cours de l'adhésion et de l'étalement des myoblastes**

Cette étude nous a permis de montrer clairement que les calpaïnes ubiquitaires sont impliquées dans l'adhésion et l'étalement des myoblastes. Au cours du processus d'adhésion, nos résultats suggèrent des rôles distincts pour chacune des deux isoformes puisqu'au delà d'une heure de culture, la réduction de l'activité de l'une des calpaïnes n'est plus compensée par l'activité de l'autre. Lors de l'étalement des myoblastes, la μ - et la m-calpaïne semblent agir conjointement. L'étude protéomique réalisée sur des myoblastes surexprimant la calpastatine nous a permis d'identifier de nouveaux substrats potentiels des calpaïnes. Parmi eux, six protéines dont la tropomyosine semblent directement liées aux phénomènes d'adhésion et de migration cellulaire.

Il est bien connu que l'environnement cellulaire (MEC) influence le devenir des cellules, il serait donc intéressant de compléter nos travaux en étudiant l'incidence de différents constituants de la matrice extracellulaire tels que le collagène ou la fibronectine, sur l'activité des calpaïnes et corrélativement sur les processus d'adhésion et d'étalement des myoblastes. La localisation des substrats potentiels identifiés par protéomique et celle de chacune des enzymes (colocalisation) devraient nous permettre d'appréhender, au niveau moléculaire, le rôle probablement distinct de chaque isoforme au moment du processus d'adhésion voire au moment de la migration des cellules myogéniques.

➤ **Rôle des calpaïnes dans la migration induite par les facteurs de croissance**

Un des objectifs principaux de l'étude concernant la migration des myoblastes était de stimuler ce phénomène *via* l'activation des calpaïnes. Pour cela deux approches différentes

ont été utilisées, l'une en surexprimant la μ - et la m-calpaïne et l'autre en activant ces enzymes par différents facteurs de croissance. Les résultats obtenus indiquent clairement que la surexpression de ces protéases induit une forte réduction de la migration, due probablement à une protéolyse dérégulée et anarchique. Au contraire, les traitements impliquant les facteurs de croissance permettent de stimuler très significativement la migration en activant l'expression et l'activité de la m-calpaïne. De plus nous avons établi que seule la voie ERK/MAP Kinase est responsable des effets des facteurs de croissance sur la migration *via* l'augmentation de l'expression et de l'activité de la m-calpaïne. *A contrario*, la voie PI3K/Akt et les MRF tels que MyoD et la myogénine ne semblent pas impliqués au cours de ce phénomène.

Pour compléter les travaux réalisés sur la migration des myoblastes, il serait intéressant d'étudier de façon détaillée les différentes étapes des phénomènes migratoires chez des cellules humaines en s'adressant à des techniques plus sophistiquées comme la vidéo microscopie et en utilisant des substrats fluorescents permettant de distinguer l'activité de chacune des calpaïnes. En outre, une approche knock-down *via* des petits ARNs interférants (siRNA) et des morpholinos (utilisation d'embryon de Xénope) devrait nous permettre d'appréhender, au niveau moléculaire, le rôle de chacune des protéases. Concernant la migration induite par les facteurs de croissance, on pourrait envisager d'identifier les facteurs de transcription activés par la voie ERK/MAPK responsables de l'augmentation de l'expression de la m-calpaïne. A ce stade de notre étude, une des priorités serait de confirmer avec des myoblastes humains les résultats obtenus en utilisant la lignée cellulaire C2C12 afin de pouvoir utiliser, à plus long terme, ces traitements pour optimiser les transplantations de myoblastes. En effet, les premiers essais cliniques de thérapie cellulaire ont montré que la faible migration des myoblastes greffés dans des tissus musculaires malades était un facteur limitant l'efficacité de cette thérapie. Des traitements préalables effectués en présence de facteurs de croissance et/ou d'autres adjuvants capables d'activer les calpaïnes, pourraient stimuler la migration des cellules greffées et corrélativement leur fusion, optimisant ainsi cette technique.

➤ **Implication des calpaïnes ubiquitaires dans l'invasion tumorale**

Les résultats issus de l'étude des rhabdomyosarcomes nous ont permis de montrer que le système protéolytique neutre calcium-dépendant est altéré dans ces cellules tumorales

« musculaires ». Bien que l'expression de la μ - et de la m-calpaïne soit très significativement réduite chez les RMS, leur activité est 2 à 3 fois plus importante. Cette forte activité, due à une déplétion importante de la calpastatine, entraînerait une protéolyse anarchique responsable de la désorganisation du cytosquelette d'actine. En conséquence, l'adhésion des cellules tumorales serait fortement altérée. Cette étude révèle également l'intervention des calpaïnes dans l'invasion tumorale des RMS. En effet, les capacités invasives de ces cellules sont significativement réduites par l'addition de calpeptine. L'indice d'invasion des RMS traités est alors proche de celui des cellules musculaires saines.

Les perspectives de recherche concernant l'implication des calpaïnes ubiquitaires au cours de la dissémination métastatique sont nombreuses :

- Afin de contrecarrer l'activité dérégulée du système protéolytique calcium-dépendant et corrélativement de réduire l'invasion des cellules tumorales, nous envisageons de sur-exprimer l'inhibiteur endogène des calpaïnes. L'objectif de cette expérimentation est de rétablir une activité quasiment normale de ces protéases et d'en mesurer les conséquences sur les capacités invasives des RMS.

- De façon à mieux appréhender le rôle des calpaïnes dans l'organisation du cytosquelette d'actine, il serait intéressant de restaurer, du moins en partie, le cytosquelette des RMS en sur-exprimant certaines isoformes de tropomyosine, substrat potentiel du système protéolytique calcium-dépendant. Ces isoformes pourraient influencer l'organisation des fibres de stress, quasiment absentes dans les cellules tumorales.

- De très récents travaux (Xu & Deng, 2004) démontrent l'aptitude des calpaïnes à être sécrétées, confirmant ainsi les résultats obtenus au laboratoire il y a une décennie. En conséquence, une étude détaillée de l'action des calpaïnes à l'extérieur de la cellule devrait être menée pour déterminer les cibles de ces enzymes (MMP, constituants de la MEC) au moment où elles sont susceptibles de promouvoir l'invasion tumorale.

- Pour comprendre, à l'échelle moléculaire, le rôle des calpaïnes lors de l'invasion, il est important de déterminer les substrats impliqués dans ce processus. Une étude protéomique associée à l'utilisation de puces à anticorps relatives aux différentes voies de signalisation devrait nous permettre d'approcher les mécanismes moléculaires responsables de la perturbation de l'expression et de l'activité des calpaïnes et de la calpastatine.

Corrélés aux informations obtenues sur d'autres types cellulaires (Glading *et al.*, 2000 ; Kulkarni *et al.*, 1999 ; Mamoune *et al.*, 2003), nos résultats mettent en évidence le rôle crucial que jouent les calpaïnes ubiquitaires et leur inhibiteur dans les phénomènes d'adhésion et de migration des cellules musculaires mais également lors de l'invasion tumorale des rhabdomyosarcomes. Au vu de ces résultats, les calpaïnes pourraient devenir des cibles thérapeutiques importantes pour lutter contre le cancer ou pour optimiser des techniques déjà existantes telles que la transplantation de myoblastes.

Références bibliographiques

- A -

- Abercrombie, M., Heaysman, J. E., & Pegrum, S. M. (1971).**
The locomotion of fibroblasts in culture. IV. Electron microscopy of the leading lamella. *Exp. Cell Res.*, 67, 359-367.
- Abrahamson, M., Alvarez-Fernandez, M., & Nathanson, C. M. (2003).**
Cystatins. *Biochem. Soc. Symp.*, 70, 179-199.
- Al-Mehdi, A. B., Tozawa, K., Fisher, A. B., Shientag, L., Lee, A., Muschel, R. J. (2000).**
Intravascular origin of metastasis from the proliferation of endothelium-attached tumor cells: a new model for metastasis. *Nat. Med.*, 6, 100-102.
- Albelda, S. M., & Buck, C. A. (1990).**
Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J.*, 4, 2868-2880.
- 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.
- Allen, D. L., Teitelbaum, D. H., & Kurachi, K. (2003).**
Growth factors stimulation of matrix metalloproteinase expression and myoblast migration and invasion in vitro. *Am. J. Cell Physiol.*, 284, 805-815.
- Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W., & Yuan, J. (1996).**
Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, 87, 171.
- Anderson, L. V., Davison, K., Moss, J. A., Richard, I., Fardeau, M., Tome, F. M., Hubner, C., Lasa, A., Colomer, J., & Beckmann, J. S. (1998).**
Characterization of monoclonal antibodies to calpain 3 and protein expression in muscle from patients with limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Am. J. Pathol.*, 153, 1169-1179.
- 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.
- Aoki, K., Imajoh, S., Ohno, S., Emori, Y., Koike, M., Kosaki, G., & Suzuki, K. (1986).** Complete amino acid sequence of the large subunit of the low-Ca²⁺-requiring form of human Ca²⁺-activated neutral protease (muCANP) deduced from its cDNA sequence. *FEBS Lett.*, 205, 313-317.
- Arber, S., Halder, G., & Caroni, P. (1994).**
Muscle LIM protein, a novel essential regulator of myogenesis, promotes myogenic differentiation. *Cell*, 79, 221-231.
- Arthur, J. S., Elce, J. S., Hegadom, C., Williams, K., & Greer, P. A. (2000).**
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, 4474-4481.
- Arthur, J. S., & Mykles, D. L. (2000).**
Calpain zymography with casein or fluorescein isothiocyanate casein. *Methods Mol. Biol.*, 144, 109-116.

Asada, K., Ishino, Y., Shimada, M., Shimojo, T., Endo, M., Kimizuka, F., Kato, I., Maki, M., Hatanaka, M., & Murachi, T. (1989).

cDNA cloning of human calpastatin: sequence homology among human, pig, and rabbit calpastatins. *J. Enzyme Inhib.*, 3, 49-56.

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., 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., Salamino, F., Melloni, E., & Pontremoli, S. (1999). Phosphorylation of rat brain calpastatins by protein kinase C. *FEBS Lett.*, 450, 13-16.

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., Capini, P., Salamino, F., Pontremoli, S., & Melloni, E. (2003). Changes in calpastatin localisation and expression during calpain activation: a new mechanism for the regulation of intracellular Ca²⁺-dependent proteolysis. *Cell. Mol. Life Sci.*, 60, 2669-2678.

Ayala, I., Baldassarre, M., Caldieri, G., & Buccione, R. (2006).

Invadopodia : a guided tour. *Eur. J. Cell Biol.*, 85, 159-164.

Azam, M., Andrabi, S. S., Sahr, K. E., Kamath, L., Kuliopulos, A., & Chishti, A. H. (2001).

Disruption of the mouse mu-calpain gene reveals an essential role in platelet function. *Mol. Cell Biol.*, 21, 2213-2220.

Azuma, T., Witke, W., Stossel, T. P., Hartwig, J. H., & Kwiatkowski, D. J. (1998).

Gelsolin is a downstream effector of rac for fibroblast motility. *EMBO J.*, 17, 1362-1370.

- B -

Baghdiguian, S., Martin, M., Richard, I., Pons, F., Astier, C., Bourg, N., Hay, R. T., Chemaly, R., Halaby, G., Loiselet, J., Anderson, L. V., Lopez de Munain, A., Fardeau, M., Mangeat, P., Beckmann, J. S., & Lefranc, G. (1999).

Calpain 3 deficiency is associated with myonuclear apoptosis and profound perturbation of the I κ B α /NF- κ B pathway in limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Nat. Med.*, 5, 503-511.

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, 2077-2082.

Baldassarre, M., Pompeo, A., Beznoussenko, G., Castaldi, C., Cortellino, S., McNiven, M. A., Luini, A., & Buccione, R. (2003).

Dynamin participates in focal extracellular matrix degradation by invasive cells. *Mol. Biol. Cell*, 14, 1074-1084.

Barnes, T. M., & Hodgkin, J. (1996).

The tra-3 sex determination gene of *Caenorhabditis elegans* encodes a member of the calpain regulatory protease family. *EMBO J.*, 15, 4477-4484.

Barnoy, S., Glaser, T., Nechama, S., & Kosower, N. S. (1996).

The role of calpastatin (the specific inhibitor) in myoblast differentiation and fusion. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 220, 933-938.

Barnoy, S., Glaser, T., & Kosower, N. S. (1998).

The calpain-calpastatin system and protein degradation in fusing myoblasts. *Biochim. Biophys. Acta*, 1402, 52-60.

Barnoy, S., Zipser, Y., Glaser, T., Grimberg, Y., & Kosower, N. S. (1999).

Association of calpain (Ca²⁺-dependent thiol protease) with its endogenous inhibitor calpastatin in myoblasts. *J. Cell Biochem.*, 74, 522-531.

Barnoy, S., Supino-Rosin, L., & Kosower, N. S. (2000).

Regulation of calpain and calpastatin in differentiating myoblasts: mRNA levels, protein synthesis and stability. *Biochem. J.*, 351, 413-420.

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. Comm.*, 332, 697-701.

Barrett, A. J. (1986).

The cystatins: a diverse superfamily of cysteine peptidase inhibitors. *Biomed. Biochim. Acta*, 45, 1363-1374.

Beauvais-Jouneau, A., & Thiery, J. P. (1997).

Multiple roles for integrins during development. *Biol. Cell*, 89, 5-11.

Béchet, D. M., Ferrara, M. J., Mordier, S. B., Roux, M. P., Deval, C. D., & Obled, A. (1991).

Expression of lysosomal cathepsin B during calf myoblast-myotube differentiation. Characterization of a cDNA encoding bovine cathepsin B. *J. Biol. Chem.*, 266, 14104-14112.

Benezra, R., Davis, R. L., Lassar, A., Tapscott, S., Thayer, M., Lockshon, D., & Weintraub, H. (1990).

Id: a negative regulator of the helix-loop-helix DNA binding proteins. Control of terminal myogenic differentiation. *Ann. NY Acad. Sci.*, 599, 1-11.

Berditchevski, F., & Odintsova, E. (1999).

Characterization of intégrine-tetraspanin adhesion complexes: role of tetraspanins in intégrine signaling. *J. Cell Biol.*, 146, 477-492.

Berkes, C. A., & Tapscott, S. J. (2005).

MyoD and the transcriptional control of myogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 16, 585-595.

Berridge, M. J. (1994).

The biology and medicine of calcium signalling. *Mol. Cell Endocrinol.*, 98, 119-124.

Bershadsky, A. D., Vaisberg, E. A., & Vasiliev, J. M. (1991).

Pseudopodial activity at the active edge of migrating fibroblast is decreased after drug-induced microtubule depolymerization. *Cell. Motil. Cytoskeleton*, *19*, 152-158.

Bershadsky, A., Chausovsky, A., Becker, E., Lyubimova, A., & Greiger, B. (1996).

Involvement of microtubules in the control of adhesion-dependent signal transduction. *Curr. Biol.*, *6*, 1279-1289.

Bhatt, A., Kaverina, I., Otey, C., & Huttenlocher, A. (2002).

Regulation of focal complex composition and disassembly by the calcium-dependent protease calpain. *J. Cell Sci.*, *115*, 3415-3425.

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 alpha-actin promoter. *Mol. Cell Biol.*, *19*, 2577-2584.

Billger, M., Wallin, M., & Karlsson, J. O. (1988).

Proteolysis of tubulin and microtubule-associated proteins 1 and 2 by calpain I and II. Difference in sensitivity of assembled and disassembled microtubules. *Cell Calcium*, *9*, 33-44

Biswas, S., Harris, F., Singh, J., & Phoenix, D. A. (2004).

The in vitro retardation of porcine cataractogenesis by the calpain inhibitor, SJA 6017. *Mol. Cell Biochem.*, *261*, 169-173.

Black, B. L., & Olson, E. N. (1998).

Transcriptional control of muscle development by myocytes enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, *14*, 167-196.

Blanchard, H., Grochulski, P., Li, Y., Arthur, J. S., Davies, P. L., Elce, J. S., & Cygler, M. (1997).

Structure of a calpain Ca(2+)-binding domain reveals a novel EF-hand and Ca(2+)-induced conformational changes. *Nat. Struct. Biol.*, *4*, 532-538.

Bootman, M. D., & Berridge, M. J. (1995).

The elemental principles of calcium signaling. *Cell*, *83*, 675-678.

Bouley, J., Chambon, C., & Picard, B. (2004).

Mapping of bovine skeletal muscle proteins using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*, *4*, 1811-1824.

Braun, B. C., Glickman, M., Kraft, R., Dahlmann, B., Kloetzel, P. M., Finley, D., & Schmidt, M. (1999).

The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nat. Cell Biol.*, *1*, 221-226.

Brennan, T. J., Edmonson, D. G., Li, L., & Olson, E. N. (1991).

Transforming growth factor beta represses the actions of myogenin through a mechanism independent of DNA binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *88*, 3822-3826.

Brown, N., & Crawford, C. (1993).

Structural modifications associated with the change in Ca²⁺ sensitivity on activation of m-calpain. *FEBS Lett.*, *322*, 65-68.

Brustis, J.-J., Elamrani, N., Balcerzak, D., Safwate, A., Soriano, M., Poussard, S., Cottin, P., & Ducastaing, A. (1994).

Rat myoblast fusion requires exteriorised m-calpain activity. *Eur. J. Cell Biol.*, 64, 320-327.

Buccione, R., Orth, J. D., & McNiven, M. A. (2004).

Foot and mouth: podosomes, invadopodia and circular dorsal ruffles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 5, 647-657.

Buddle, M., Eberhardt, E., Ciminello, L. H., Levin, T., Wing, R., DiPasquale, K., & Raley-Susman, K. M. (2003).

Microtubule-associated protein 2 (MAP2) associates with NMDA receptor and is spatially redistributed within rat hippocampal neurons after oxygen-glucose deprivation. *Brain Res.*, 978, 38-50.

Burgess, H. A., & Reiner, O. (2001).

Cleavage of doublecortin-like kinase by calpain releases an active kinase fragment from a microtubule anchorage domain. *J. Biol. Chem.*, 276, 36397-36403.

Burgstaller, G., & Gimona, M. (2005).

Podosome-mediated matrix resorption and cell motility in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 288, H3001-3005.

- C -

Carafoli, E. (2002).

Calcium signaling: a tale for all seasons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 1115-1122.

Carelli, S., Zadra, G., Vaira, V., Falleni, M., Bottiglieri, L., Nosotti, M., Di Giulio, A. M., Gorio, A., & Bosari, S. (2006).

Up-regulation of focal adhesion kinase in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 53, 263-271.

Carillo, S., Pariat, M., Steff, A., Jariel-Encontre, I., Poulat, F., Berta, P., & Piechaczyk, M. (1996).

PEST motifs are not required for rapid calpain-mediated proteolysis of c-fos protein. *Biochem. J.*, 313, 245-251.

Carragher, N. O., & Frame, M. C. (2002).

Calpain: a role in cell transformation and migration. *Int. J. Bioch. Cell Biol.*, 34, 1539-1543.

Carragher, N. O., Westhoff, M. A., Fincham, V. J., Schaller, M. D., & Frame, M. C. (2003).

A novel role for FAK as a protease-targeting adaptor protein: regulation by p42 ERK and Src. *Curr. Biol.*, 13, 1442-1450.

Carragher, N. O., Fonseca, B. D., & Frame, M. C. (2004).

Calpain activity is generally elevated during transformation but has oncogene-specific biological functions. *Neoplasia*, 6, 53-73.

Carragher, N. O., & Frame, M. C. (2004).

Focal adhesion and actin dynamics: a place where kinase and proteases meet to promote invasion. *Trends Cell Biol.*, 14, 241-249.

Carragher, N. O. (2006).

Calpain inhibition: a therapeutic strategy targeting multiple disease states. *Curr. Pharm. Des.*, 12, 615-638.

Cary, L. A., Chang, J. F., & Guan, J. L. (1996).

Stimulation of cell migration by overexpression of focal adhesion kinase and its association with Src and Fyn. *J. Cell Sci.*, 109, 1787-1794.

Chambers, A. F., Groom, A. C., & MacDonald, I. C. (2002).

Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat. Rev. Cancer*, 2, 563-572.

Chiang, H. L., & Dice, J. F. (1988).

Peptide sequences that target proteins for enhanced degradation during serum withdrawal. *J. Biol. Chem.*, 263, 6797-6805.

Ciechanover, A. (1994).

The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell*, 79, 13-21.

Coll, J. L., Ben-Ze'ev, A., Ezzell, R. M., Rodriguez-Fernandez, J. L., Baribault, H., Oshima, R. G., & Adamson, E. D. (1995).

Targeted disruption of vinculin genes in F9 and embryonic stem cells changes cell morphology, adhesion, and locomotion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 9161-9165.

Cong, J., Goll, D. E., Peterson, A. M., & Kapprell, H. P. (1989).

The role of autolysis in activity of the Ca²⁺-dependent proteinases (mu-calpain and m-calpain). *J. Biol. Chem.*, 264, 10096-10103.

Cong, J., Thompson, V. F., & Goll, D. E. (1993).

Effect of monoclonal antibodies specific for the 28-kDa subunit on catalytic properties of the calpains. *J. Biol. Chem.*, 268, 25740-25747.

Cong, M., Thompson, V. F., Goll, D. E., & Antin, P. B. (1998).

The bovine calpastatin gene promoter and a new N-terminal region of the protein are targets for cAMP-dependent protein kinase activity. *J. Biol. Chem.*, 273, 660-666.

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.

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.

Couchman, J. R., & Rees, D. A. (1979).

Actomyosin organisation for adhesion, spreading, growth and movement in chick fibroblasts. *Cell Biol. Int. Rep.*, 3, 431-439.

Coux, O., Tanaka, K., & Goldberg, A. L. (1996).

Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu. Rev. Biochem.*, 65, 801-847.

Covault, J., Liu, Q. Y., El-Deeb, S. (1991).

Calcium-activated proteolysis of intracellular domains in the cell adhesion molecules NCAM and N-cadherin. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 11, 11-16.

Cox, E. A., & Huttenlocher, A. (1998).

Regulation of integrin-mediated adhesion during cell migration. *Microsc. Res. Tech.*, 43, 412-419.

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, S19-25.

Crawford, C., Brown, N. R., & Willis, A. C. (1993).

Studies of the active site of m-calpain and the interaction with calpastatin. *Biochem. J.*, 296, 135-142.

Croall, D. E., & De Martino, G. N. (1991).

Calcium-activated neutral protease (calpain) system: structure, function, and regulation. *Physiol. Rev.*, 71, 813-847.

Croall, D. E., & McGrody, K. S. (1994).

Domain structure of calpain: mapping the binding site for calpastatin. *Biochemistry*, 33, 13223-132230.

Croall, D. E., Chacko, S., & Wang, Z. (1996).

Cleavage of caldesmon and calponin by calpain: substrate recognition is not dependent on calmodulin binding domains. *Biochim. Biophys. Acta*, 1298, 276-284.

Croce, K., Flaumenhaft, R., Rivers, M., Furie, B., Furie, B. C., Herman, I. M., & Potter, D. A. (1999).

Inhibition of calpain blocks platelet secretion, aggregation, and spreading. *J. Biol. Chem.*, 274, 36321-36327.

Crocker, S. J., Smith, P. D., Jackson-Lewis, V., Lamba, W. R., Hayley, S. P., Grimm, E., Callaghan, S. M., Slack, R. S., Melloni, E., Przedborski, S., Robertson, G. S., Anisman, H., Merali, Z., & Park, D. S. (2003).

Inhibition of calpains prevents neuronal and behavioural deficits in an MPTP mouse model of Parkinson's disease. *J. Neurosci.*, 23, 4081-4091.

Cryns, V., & Yuan, J. (1998).

Proteases to die for. *Genes Dev.*, 12, 1551-1570.

Cuevas, B. D., Abell, A. N., Witowsky, J. A., Yujiri, T., Johnson, N. L., Kesavan, K., Ware, M., Jones, P. L., Weed, S. A., DeBiasi, R. L., Oka, Y., Tyler, K. L., & Johnson, G. L. (2003).

MEKK1 regulates calpain-dependent proteolysis of focal adhesion proteins for rear-end detachment of migrating fibroblasts. *EMBO J.*, 22, 3346-3355.

- D -

- Dadsetan, M., Jones, J. A., Hiltner, A., & Anderson, J. M. (2004).**
Surface chemistry mediates adhesive structure, cytoskeletal organization, and fusion of macrophages. *J. Biomed. Mater. Res. A.*, 71, 439-448.
- Dagher, R., & Helman, L. (1999).**
Rhabdomyosarcoma : an overview. *Oncologist*, 4, 34-44
- 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.
- Davies, P. J., Wallach, D., Willingham, M. C., Pastan, I., Yamaguchi, M., & Robson, R. M. (1978).**
Filamin-actin interaction. Dissociation of binding from gelation by Ca²⁺-activated proteolysis. *J. Biol. Chem.*, 253, 4036-4042.
- 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.
- Dayton, W. R. (1982).**
Comparison of low- and high-calcium-requiring forms of the calcium-activated protease with their autocatalytic breakdown products. *Biochim. Biophys. Acta*, 709, 166-172.
- Dear, T. 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., Moller, A., & Boehm, T. (1999).**
CAPN11: a calpain with high mRNA levels in testis and located on chromosome 6. *Genomics*, 59, 243-247.
- Dear, T. N., Meier, N. T., Hunn, M., Boehm, T. (2000).**
Gene structure, chromosomal localization, and expression pattern of Capn12, a new member of the calpain large subunit gene family. *Genomics*, 68, 152-160.
- Dear, T. N., & Boehm, T. (2001).**
Identification and characterization of two novel calpain large subunit genes. *Gene*, 274, 245-252.
- Dedieu, S., Dourdin, N., Dargelos, E., Poussard, S., Veschambre, P., Cottin, P., & Brustis, J. J. (2002).**
Calpain and myogenesis : development of a convenient cell culture model. *Biol. Cell*, 94, 65-76.
- Dedieu, S., Mazères, G., Dourdin, N., Cottin, P., & Brustis, J.-J. (2003).**
Transactivation of capn2 by myogenic regulatory factors during myogenesis. *J. Mol. Biol.*, 326, 453-465.

- Dedieu, S., Mazères, 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.
- Dedieu, S., Poussard, S., Mazères, 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 Cerro, S., Arai, A., Kessler, M., Bahr, B. A., Vanderklish, P., Rivera, S., & Lynch, G. (1994).**
Stimulation of NMDA receptors activates calpain in cultured hippocampal slices. *Neurosci. Lett.*, *167*, 149-152.
- Dias, P., Parham, D. M., Shapiro, D. N., Webber, B. L., & Houghton, P. J. (1990).**
Myogenic regulatory protein (MyoD1) expression in childhood solid tumors: diagnostic utility in rhabdomyosarcoma. *Am. J. Pathol.*, *137*, 1283-1291.
- Diaz, B. G., Moldoveanu, T., Kuiper, M. J., Campbell, R. L., & Davies, P. L. (2004).**
Insertion sequence 1 of muscle-specific calpain, p94, acts as an internal propeptide. *J. Biol. Chem.*, *279*, 27656-27666.
- Disatnik, M. H., Boutet, S. C., Pacio, W., Chan, A. Y., Ross, L. B., Lee, C. H., & Rando, T. A. (2004).**
The bi-directional translocation of MARCKS between membrane and cytosol regulates integrin-mediated muscle cell spreading. *J. Cell Sci.*, *117*, 4469-4479.
- 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 préfusion complex. *J. Cell Biol.*, *136*, 1249-1261.
- 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.
- 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., Bhatt, A. K., Dutt, P., Greer, P. A., Arthur, J. S., Elce, J. S., & Huttenlocher, A. (2001).**
Reduced cell migration and disruption of the actin cytoskeleton in calpain-deficient embryonic fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, *276*, 48382-48388.
- Dreiza, C. M., Brophy, C. M., Komalavilas, P., Furnish, E. J., Joshi, L., Pallero, M. A., Murphy-Ullrich, J. E., von Rechenberg, M., Ho, Y. S., Richardson, B., Xu, N., Zhen, Y., Peltier, J. M., & Panitch, A. (2005).**
Transducible heat shock protein 20 (HSP20) phosphopeptide alters cytoskeletal dynamics. *FASEB J.*, *19*, 261-263.
- 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.

- E / F -

Ebisui, C., Tsujinaka, T., Morimoto, T., Kan, K., Iijima, S., Yano, M., Kominami, E., Tanaka, K., & Monden, M. (1995).

Interleukin-6 induces proteolysis by activating intracellular proteases (cathepsins B and L, proteasome) in C2C12 myotubes. *Clin. Sci. (Lond.)*, 89, 431-439.

Eble, J. A., & Haier, J. (2006).

Integrins in cancer treatment. *Curr. Cancer Drug Targets*, 6, 89-105.

El-Badry, O. M., Minniti, C., Kohn, E. C., Houghton, P. J., Daughaday, W. H., & Helman, L. J. (1990).

Insulin-like growth factor II acts as an autocrine growth and motility factor in human rhabdomyosarcoma tumors. *Cell Growth Differ.*, 1, 325-331.

Elce, J. S., Hegadom, C., & Arthur, J. S. (1997).

Autolysis, Ca²⁺ requirement, and hétérodimère stability in m-calpain. *J. Biol. Chem.*, 272, 11268-11275.

Ellis, H. M., & Horvitz, H. R. (1986).

Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell*, 44, 817-829.

Elvira, M., Diez, J. A., Wang, K. K., & Villalobo, A. (1993).

Phosphorylation of connexin-32 by protein kinase C prevents its proteolysis by mu-calpain and m-calpain. *J. Biol. Chem.*, 268, 14294-14300.

Enomoto, T. (1996).

Microtubule disruption induces the formation of actin stress fibers and focal adhesions in cultured cells: possible involvement of the rho signal cascade. *Cell Struct. Funct.*, 21, 317-326

Emori, Y., Kawasaki, H., Sugihara, H., Imajoh, S., Kawashima, S., & Suzuki, K. (1987).

Isolation and sequence analyses of cDNA clones for the large subunits of two isozymes of rabbit calcium-dependent protease. *J. Biol. Chem.*, 261, 9465-9471.

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.

Etienne-Manneville, S. (2004).

Actin and microtubules in cell motility: which one is in control? *Traffic*, 5, 470-477.

Fan, T. J., Han, L. H., Cong, R. S., & Liang, J. (2005).

Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, 37, 719-727.

Farkas, A., Tompa, P., & Friedrich, P. (2003).

Revisiting ubiquity and tissue specificity of human calpains. *Biol. Chem.*, 384, 945-949.

Fernandez-Montalvan, A., Assfalg-Machleidt, I., Pfeiler, D., Fritz, H., Jochum, M., & Machleidt, W. (2006).

Mu-calpain binds to lipid bilayers via the exposed hydrophobic surface of its Ca²⁺-activated conformation. *Biol. Chem.*, 387, 617-627.

Ferracini, R., Olivero, M., Di Renzo, M. F., Martano, M., De Giovanni, C., Nanni, P., Basso, G., Scotlandi, K., Lollini, P. L., & Comoglio, P. M. (1996).

Retrogenic expression of the MET proto-oncogene correlates with the invasive phenotype of human rhabdomyosarcomas. *Oncogene*, *12*, 1697-1705.

Fincham, V. J., & Frame, M. C. (1998).

The catalytic activity of Src is dispensable for translocation to focal adhesions but controls the turnover of these structures during cell motility. *EMBO J.*, *17*, 81-92.

Florini, J. R., Ewton, D. Z., & Roof, S. L. (1991).

Insulin-like growth factor-I stimulates terminal myogenic differentiation by induction of myogenin gene expression. *Mol. Endocrinol.*, *5*, 718-724.

Fox, J. E., Taylor, R. G., Taffarel, M., Boyles, J. K., & Goll, D. E. (1993).

Evidence that activation of platelet calpain is induced as a consequence of binding of adhesive ligand to the integrin, glycoprotein IIb-IIIa. *J. Cell Biol.*, *120*, 1501-1507.

Franco, S., Perrin, B., & Huttenlocher, A. (2004).

Isoform specific function of calpain 2 in regulating membrane protrusion. *Exp. Cell Res.*, *299*, 179-187.

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

Franz, T., Vingron, M., Boehm, T., & Dear, T. N. (1999).

Capn7 : a highly divergent vertebrate calpain with a novel C-terminal domain. *Mamm. Genome*, *10*, 318-321.

Franz, T., Winckler, L., Boehm, T., & Dear, T. N. (2004).

Capn5 is expressed in a subset of T cells and is dispensable for development. *Mol. Cell Biol.*, *24*, 1649-1654.

Fukiage, C., Nakajima, E., Ma, H., Azuma, M., & Shearer, T. R. (2002).

Characterization and regulation of lens-specific calpain Lp82. *J. Biol. Chem.*, *277*, 20678-20685.

- G -

Gafni, J., & Ellerby, L. M. (2002).

Calpain activation in Huntington's disease. *J. Neurosci.*, *22*, 4842-4849.

Gao, W. D., Atar, D., Liu, Y., Perez, N. G., Murphy, A. M., & Marban, E. (1997).

Role of troponin I proteolysis in the pathogenesis of stunned myocardium. *Circ. Res.*, *80*, 393-399.

Gastpar, R., Gross, C., Rossbacher, L., Ellwart, J., Riegger, J., & Multhoff, G. (2004).

The cell surface-localized heat shock protein 70 epitope TKD induces migration and cytolytic activity selectively in human NK cells. *J. Immunol.*, *172*, 972-980.

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.

Gil-Parrado, S., Popp, O., Knoch, T. A., Zahler, T. A., Bestvater, F., Felgenträger, M., Holloschi, A., Fernandez-Montalvan, A., Auerswald, E., Fritz, H., Fluentes-Prior, P., Machleidt, W., & Spiess, E. (2003).

Subcellular localization and in vivo subunit interactions of ubiquitous μ -calpain. *J. Biol. Chem.*, 278, 16336-16346.

Gimona, M., & Buccione, R. (2006).

Adhesions that mediate invasion. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 38, 1875-1892.

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., Kleese, W. C., Kumamoto, T., Cong, J. Y., & Szpacenko, A. (1989).

In search of the regulation and function of the Ca^{2+} -dependent proteinases (calpains). In: *Intracellular Proteolysis, Mechanisms and Regulation*, p. 82-91.

Goll, D. E., Dayton, W. R., Singh, I., & Robson, R. M. (1991).

Studies of the alpha-actinin/actin interaction in the Z-disk by using calpain. *J. Biol. Chem.*, 266, 8501-8510.

Goll, D. E., Thompson, V. F., Taylor, R. G., & Zalewska, T. (1992).

Is calpain activity regulated by membranes and autolysis or by calcium and calpastatin. *Bioessays*, 14, 549-556.

Goll, D. E., Thompson, V. F., Taylor, R. G., Ouali, A., & Chou, R. G. (1999).

The calpain system in muscle tissue. In: *Calpain: Pharmacology and Toxicology of Calcium-Dependent Protease*, p. 127-160.

Goll, D. E., Thompson, V. F., Li, H., Wei, W., & Cong, J. (2003).

The calpain system. *Physiol. Rev.*, 83, 731-801.

Gougeneg, 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 alanin-rich C-kinase substrate (MARCKS). *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 37, 1900-1910.

Gredinger, E., Gerber, A. N., Tamir, Y., Tapscott, S. J., & Bengal, E. (1998).

Mitogen-activated protein kinase pathway is involved in the differentiation of muscle cells. *J. Biol. Chem.*, 273, 10436-10444.

Greenwood, J. A., & Murphy-Ullrich, J. E. (1998).

Signaling of de-adhesion in cellular regulation and motility. *Microsc. Res. Tech.*, 43, 420-432.

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.

Gupton, S. L., Anderson, K. L., Kole, T. P., Fischer, R. S., Ponti, A., Hitchcock-DeGregori, S. E., Danuser, G., Fowler, V. M., Wirtz, D., Hanein, D., & Waterman-Storer, C. M. (2005).

Cell migration without a lamellipodium: translation of actin dynamics into cell movement mediated by tropomyosine. *J. Cell Biol.*, 168, 619-631.

Guroff, G. (1964).

A neutral, calcium-activated proteinase from the soluble fraction of rat brain. *J. Biol. Chem.*, 239, 149-155.

- H -

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.

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.

Harris, A. S., Croall, D. E., & Morrow, J. S. (1989).

Calmodulin regulates fodrin susceptibility to cleavage by calcium-dependent protease I. *J. Biol. Chem.*, 264, 17401-17408.

Hartwig, J. H., Thelen, M., Rosen, A., Janmey, P. A., Naim, A. C., & Aderem, A. (1992).

MARCKS is an actin filament crosslinking protein regulated by protein kinase C and calcium-calmodulin. *Nature*, 356, 618-622.

Hata, S., Sorimachi, H., Nakagawa, K., Maeda, T., Abe, K., & Suzuki, K. (2001).

Domain II of m-calpain is a Ca(2+)-dependent cysteine protease. *FEBS Lett.*, 501, 111-114.

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 coatomer complex, beta-COP. *J. Biol. Chem.*, 281, 11214-11224.

Hayashi, M., Inomata, M., & Kawashima, S. (1996).

Function of calpains: possible involvement in myoblast fusion. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 389, 149-154.

Heldin, C. H., Miyazono, K., & Ten Dijke, P. (1997).

TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*, 390 (6659), 465-471.

Hemmings, L., Rees, D. J. G., Ohanian, V., Bolton, S. J., Gilmore, A. P., Patel, B., Priddle, H., Trevithick, J. E., Hynes, R. O., & Critchley, D. R. (1996).

Talin contains three actin-binding sites each of which is adjacent to a vinculin-binding site. *J. Cell Sci.*, 109, 2715-2726.

Higuchi, M., Iwata, N., & Saido, T. C. (2005).

Understanding molecular mechanisms proteolysis in Alzheimer's disease: progress toward therapeutic interventions. *Biochim. Biophys. Acta*, 1751, 60-67.

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.

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.

Holzman, E. (1989).

Lysosomes. *New York Plenum Press*.

Hong, M., & Lee, V. M. (1997).

Insulin and insulin-like growth factor-1 regulates tau phosphorylation in cultured human neurons. *J. Biol. Chem.*, 272, 19547-19553.

Hopf, F. W., Turner, P. R., Denetclaw, W. F. Jr, Reddy, P., & Steinhardt, R. A. (1996).

A critical evaluation of resting intracellular free calcium regulation in dystrophic mdx muscle. *Am. J. Physiol.*, 271, 1325-1339.

Horikawa, Y., Oda, N., Cox, N. J., Li, X., Orho-Melander, M., Hara, M., Hinokio, Y., Lindner, T. H., Mashima, H., Schwartz, 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. Erratum in *Nat. Genet.*, 26, 502.

Horwitz, A., Duggan, K., Buck, C., Beckerle, M. C., & Burridge, K. (1986).

Interaction of plasma membrane fibronectin receptor with talin a transmembrane linkage. *Nature*, 320, 531-533.

Hosfield, C. M., Elce, J. S., Davies, P. L., & Jia, Z. (1999).

Crystal structure of calpain reveals the structural basis for Ca²⁺-dependent protease activity and a novel mode of enzyme activation. *EMBO J.*, 18, 6880-6889.

Hosfield, C. M., Moldoveanu, T., Davies, P. L., Elce, J. S., & Jia, Z. (2001).

Calpain mutants with increased Ca²⁺ sensitivity and implications for the role of the C(2)-like domain. *J. Biol. Chem.*, 276, 7404-7407.

Hosoi, H., Sugimoto, T., Hayashi, Y., Inaba, T., Horii, Y., Morioka, H., Fushiki, S., Hamazaki, M., & Sawada, T. (1992).

Differential expression of myogenic regulatory genes, MyoD1 and myogenin, in human rhabdomyosarcoma sublines. *Int. J. Cancer*, 50, 977-983.

Hotchin, N. A., & Hall, A. (1995).

The assembly of integrin adhesion complexes requires both extracellular matrix and intracellular rho/rac GTPases. *J. Cell Biol.*, 131, 1857-1865.

Hsia, D. A., Mitra, S. K., Hauck, C. R., Streblow, D. N., Nelson, J. A., Ilic, D., Huang, S., Li, E., Nemerow, G. R., Leng, J., Spencer, K. S., Cheresch, D. A., & Schlaepfer, D. D. (2003).
Differential regulation of cell motility and invasion by FAK. *J. Cell Biol.*, 160, 753-767.

Hsu, H. H., Zdanowicz, M. M., Agarwal, V. R., & Speiser, P. W. (1997).
Expression of myogenic regulatory factors in normal and dystrophic mice: effects of IGF-1 treatment. *Biochem. Mol. Med.*, 60, 142-148.

Huttenlocher, A., Palecek, S. P., Lu, Q., Zhang, W., Mellgren, R. L., Lauffenburger, D. A., Ginsberg, M. H., & Horwitz, A. F. (1997).
Regulation of cell migration by the calcium-dependent protease calpain. *J. Biol. Chem.*, 272, 32719-32722.

Hynes, R. O. (1992).
Specificity of cell adhesion in development: the cadherin superfamily. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2, 621-624.

- I / J / K -

Ikura, M. (1996).
Calcium binding and conformational response in EF-hand proteins. *Trends Biochem. Sci.*, 21, 14-17.

Ilic, D., Furuta, Y., Kanazawa, S., Takeda, N., Sobue, K., Nakatsuji, N., Nomura, S., Fujimoto, J., Okada, M., & Yamamoto, T. (1995).
Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature*, 377, 539-544.

Imajoh, S., Aoki, K., Ohno, S., Emori, Y., Kawasaki, H., Sugihara, H., & Suzuki, K. (1988).
Molecular cloning of the cDNA for the large subunit of the high-Ca²⁺-requiring form of human Ca²⁺-activated neutral protease. *Biochemistry*, 27, 8122-8128.

Imamichi, Y., Waidmann, O., Hein, R., Eleftheriou, P., Giel, K., & Menke, A. (2005).
TGF beta-induced focal complex formation in epithelial cells is mediated by activated ERK and JNK MAP kinases and is independent of Smad4. *Biol. Chem.*, 386, 225-236.

Inomata, M., Kasai, Y., Nakamura, M., & Kawashima, S. (1988).
Activation mechanism of calcium-activated neutral proteases. Evidence for the existence of intramolecular and intermolecular autolyses. *J. Biol. Chem.*, 263, 19783-19787.

Iwabu, A., Smith, K., Allen, F. D., Lauffenburger, D. A., & Wells, A. (2004).
Epidermal growth factor induces fibroblast contractility and motility via a protein kinase C delta-dependent pathway. *J. Biol. Chem.*, 279, 14551-14560.

Janssen, G. M., & Moller, W. (1988).
Elongation factor 1 beta gamma from *Artemia*. Purification and properties of its subunits. *Eur. J. Biochem.*, 171, 119-129.

Jiang, Q., Zhou, C., Bi, Z., & Wan, Y. (2006).
EGF-induced cell migration is mediated by ERK and PI3K/Akt pathways in cultured human lens epithelial cells. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, 22, 93-102.

Kamei, M., Webb, G. C., Young, I. G., & Campbell, H. D. (1998).

SOLH, a human homologue of the *Drosophila melanogaster* small optic lobes gene is a member of the calpain and zinc-finger gene families and maps to human chromosome 16p13.3 near CATM. *Genomics*, 51, 197-206.

Kapprell, H. P., & Goll, D. E. (1989).

Effect of Ca²⁺ on binding of the calpains to calpastatin. *J. Biol. Chem.*, 264, 17888-17896.

Kassis, J., Radinsky, R., & Wells, A. (2002).

Motility is rate-limiting for invasion of bladder carcinoma cell lines. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 34, 762-775.

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.

Kawashima, S., Hayashi, M., Saito, Y., Kasai, Y., & Imahori, K. (1988).

Tissue distribution of calcium-activated neutral proteinases in rat. *Biochim. Biophys. Acta*, 965, 130-135.

Kelly, T., Mueller, S. C., Yeh, Y., & Chen, W. T. (1994).

Invadopodia promote proteolysis of a wide variety of extracellular matrix proteins. *J. Cell Physiol.*, 158, 299-308.

Kinbara, K., Ishiura, S., Tomioka, S., Sorimachi, H., Jeong, S. Y., Amano, S., Kawasaki, H., Kolmerer, B., Kimura, S., Labeit, S., & Suzuki, K. (1998).

Purification of native p94, a muscle-specific calpain, and characterization of its autolysis. *Biochem. J.*, 335, 589-596.

Kishi, Y., Sugo, T., Mahadeo, D., Cotter, D., & Sameshima, M. (2001).

S-Adenosyl-L-homocysteine hydrolase is sequestered into actin rods in *Dictyostelium discoideum* spores. *FEBS Lett.*, 508, 433-437.

Konig, N., Raynaud, F., Feane, H., Durand, M., Mestre-Frances, N., Rossel, M., Ouali, A., & Benyamin, Y. (2003).

Calpain 3 is expressed in astrocytes of rat and *Microcebus* brain. *J. Chem. Neuroanat.*, 25, 129-136.

Kooijman, R., Coppens, A., & Hooghe-Peters, E. (2003).

IGF-I stimulates IL-8 production in the promyelocytic cell line HL-60 through activation of extracellular signal-regulated protein kinase. *Cell Signal.*, 15, 1091-1098.

Kretsinger, R. H. (1972).

Gene triplication deduced from the tertiary structure of a muscle calcium binding protein. *Nat. New Biol.*, 240, 85-88.

Kulkarni, S., Saido, T. C., Suzuki, K., & Fox, J. E. (1999).

Calpain mediates integrin-induced signaling at a point upstream of Rho family members. *J. Biol. Chem.*, 274, 21265-21275.

Kulkarni, S., Goll, D. E., & Fox, J. E. (2002).

Calpain cleaves RhoA generating a dominant-negative form that inhibits integrin-induced actin filament assembly and cell spreading. *J. Biol. Chem.*, 277, 24435-24441.

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.

Kwak, K. B., Chung, S. S., Kim, O. M., Kang, M. S., Ha, D. B., & Chung, C. H. (1993).
Increase in the level of m-calpain correlates with the elevated cleavage of filamin during myogenic differentiation of embryonic muscle cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1175, 243-249.



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

Lafrenière, J. F., Mills, P., Tremblay, J. P., & Fahime, E. E. (2004).
Growth factors improve the in vivo migration of human skeletal myoblasts by modulating their endogenous proteolytic activity. *Transplantation*, 77, 1741-1747.

Lakshmikuttyamma, A., Selvakumar, P., Kanthan, R., Kanthan, S. C., & Sharma, R. K. (2004).
Overexpression of m-calpain in human colorectal adenocarcinomas. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 13, 1604-1609.

Lambrechts, A., Van Troys, M., & Ampe, C. (2004).
The actin cytoskeleton in normal and pathological cell motility. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 36, 1890-1909.

Lane, R. D., Allan, D. M., & Mellgren, R. L. (1992).
A comparison of the intracellular distribution of mu-calpain, m-calpain, and calpastatin in proliferating human A431 cells. *Exp. Cell Res.*, 203, 5-16.

Lassar, A. B., Skapek, S. X., & Novitch, B. (1994).
Regulatory mechanisms that coordinate skeletal muscle differentiation and cell cycle withdrawal. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 6, 788-794.

Lauffenburger, D. A., & Horwitz, A. F. (1996).
Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell*, 84, 359-369.

Lawrence, W. Jr, Hays, D. M., Heyn, R., Beltangady, M., & Maurer, H. M. (1988).
Surgical lessons from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study (IRS) pertaining to extremity tumors. *World J. Surg.*, 12, 676-684.

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.

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, H. K., Lee, J. H., Kim, M., Kariya, Y., Miyazaki, K., & Kim, E. K. (2006).
Insulin-like growth factor-1 induces migration and expression of laminin-5 in cultured human corneal epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 47, 873-882.

Leissring, M. A., Akbari, Y., Fanger, C. M., Cahalan, M. D., Mattson, M. P., & LaFerla, F. M. (2000).

Capacitative calcium entry deficits and elevated luminal calcium content in mutant presenilin-1 knockin mice. *J. Cell Biol.*, *149*, 793-798.

Lemercier, C., To, R. Q., Carrasco, R. A., & Konieczny, S. F. (1998).

The basic helix-loop-helix transcription factor Mist1 functions as a transcriptional repressor of MyoD. *EMBO J.*, *17*, 1412-1422.

Lewis, J. M., & Schwartz, M. A. (1995).

Mapping in vivo associations of cytoplasmic proteins with integrin beta 1 cytoplasmic domain mutants. *Mol. Biol. Cell*, *6*, 151-160.

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.

Lien, S. C., Usami, S., Chien, S., & Chiu, J. J. (2006).

Phosphatidylinositol 3-kinase/akt pathway is involved in transforming growth factor-beta 1-induced phenotypic modulation of 10T1/2 cells to smooth muscle cells. *Cell Signal.*, *18*, 1270-1278.

Lin, G. D., Chattopadhyay, D., Maki, M., Wang, K. K., Carson, M., Jin, L., Yuen, P. W., Takano, E., Hatanaka, M., DeLucas, L. J., & Narayana, S. V. (1997).

Crystal structure of calcium bound domain VI of calpain at 1.9 Å resolution and its role in enzyme assembly, regulation, and inhibitor binding. *Nat. Struct. Biol.*, *4*, 539-547.

Linkhart, T. A., Clegg, C. H., & Hauschka, 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, 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*, 31093-8.

Liu, D., Black, B. L., & Derynck, R. (2001).

TGF-beta inhibits muscle differentiation through functional repression of myogenic transcription factor by Smad3. *Genes Dev.*, *15*, 2950-2966.

Lo, S. H., Weisberg, E., & Chen, L. B. (1994).

Tensin: a potential link between the cytoskeleton and signal transduction. *Bioessays*, *16*, 817-823.

Lu, J., Webb, R., Richardson, J. A., & Olson, E. N. (1999).

MyoR: a muscle-restricted basic helix-loop-helix transcription factor that antagonizes the actions of MyoD. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *96*, 552-557.

Ludolph, D. C., & Konieczny, S. F. (1995).

Transcription factor families: muscling in on the myogenic program. *FASEB J.*, *9*, 1595-1604.

- M -

Ma, H., Yang, H. Q., Takano, E., Hatanaka, M., & Maki, M. (1994).

Aminoterminal conserved region in proteinase inhibitor domain of calpastatin potentiates its calpain inhibitory activity by interacting with the calmodulin-like domain of the proteinase. *J. Biol. Chem.*, *269*, 24430-24436.

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, 211-229.

Ma, H., Fukiage, C., Kim, Y. H., Duncan, M. K., Reed, N. A., Shih, M., Azuma, M., & Shearer, T. R. (2001).

Characterization and expression of calpain 10, a novel, ubiquitous calpain with nuclear localization. *J. Biol. Chem.*, 276, 28525-28531.

Machesky, L. M., Atkinson, S. J., Ampe, C., Vandekerckhove, J., & Pollard, T. D. (1994).

Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from *Acanthamoeba* by affinity chromatography on profiling-agarose. *J. Cell Biol.*, 127, 107-115.

Machesky, L. M., & Insall, R. H. (1998).

Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr. Biol.*, 8, 1347-1356.

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.

Maki, M., Hatanaka, M., Takano, E., & Murachi, T. (1990).

Structure-function relationship of the calpastatins. In: *Intracellular Calcium-Dependent Proteolysis*, p. 37-51.

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.

Manenti, S., Sorokine, O., Van Dorsselaer, A., & Taniguchi, H. (1994).

Demyristoylation of the major substrate of protein kinase C (MARCKS) by the cytoplasmic fraction of brain synaptosomes. *J. Biol. Chem.*, 269, 8309-8313.

Maravall, M., Mainen, Z. F., Sabatini, B. L., & Svoboda, K. (2000).

Estimating intracellular calcium concentrations and buffering without wavelength ratioing. *Biophys. J.*, 78, 2655-2667.

Martin, M. J., Melnyk, N., Pollard, M., Bowden, M., Leong, H., Podor, T. J., Gleave, M., & Sorensen, P. H. (2006).

The insulin-like growth factor I receptor is required for Akt activation and suppression of anoikis in cell transformed by the ETV6-NTRK3 chimeric tyrosine kinase. *Mol. Cell Biol.*, 26, 1754-1769.

Matsumoto, K., Matsumoto, K., Nakamura, T., & Kramer, R. H. (1994).

Hepatocyte growth factor/scatter factor induces tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase (p125FAK) and promotes migration and invasion by oral squamous cell carcinoma cells. *J. Biol. Chem.*, 269, 31807-31813.

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.

McClelland, P., Lash, J. A., & Hathaway, D. R. (1989).

Identification of major autolytic cleavage sites in the regulatory subunit of vascular Calpain II. A comparison of partial amino-terminal sequences to deduced sequence from complementary DNA. *J. Biol. Chem.*, 264, 17428-17431.

McLemore, E. C., Tessier, D. J., Flynn, C. R., Furnish, E. J., Komalavilas, P., Thresher, J. S., Joshi, L., Stone, W. M., Fowl, R. J., & Brophy, C. M. (2004).

Transducible recombinant small heat shock-related protein, HSP20, inhibits vasospasm and platelet aggregation. *Surgery*, *136*, 573-578.

Mellgren, R. L. (1988).

On the mechanism of binding of calpastatin, the protein inhibitor of calpains, to biologic membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, *150*, 170-176.

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.

Menard, H. A., & El-Amine, M. (1996).

The calpain-calpastatin system in rheumatoid arthritis. *Immunol. Today*, *17*, 545-547.

Meyer, S. L., Bozyczko-Coyne, D., Mallya, S. K., Spais, C. M., Bihovsky, R., Kaywooya, J. K., Lang, D. M., Scott, R. W., & Siman, R. (1996).

Biologically active monomeric and heterodimeric recombinant human calpain I produced using the baculovirus expression system. *Biochem. J.*, *314*, 511-519.

Michaut, M. A., Williams, C. J., & Schultz, R. M. (2005).

Phosphorylated MARCKS: a novel centrosome component that also defines a peripheral subdomain of the cortical actin cap in mouse eggs. *Dev. Biol.*, *280*, 26-37.

Milligan, S. A., Owens, M. W., & Grisham, M. B. (1996).

Inhibition of IkappaB-alpha and IkappaB-beta proteolysis by calpain inhibitor I blocks nitric oxide synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.*, *335*, 388-395.

Miner, J. H., & Wold, B. (1990).

Herculin, a fourth member of the MyoD family of myogenic regulatory genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *87*, 1089-1093.

Mitra, S. K., & Schlaepfer, D. D. (2006).

Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Curr. Opin. Cell Biol.*, *18*, 516-523.

Miyamoto, S., Akiyama, S. K., & Yamada, K. M. (1995a).

Synergistic roles for receptor occupancy and aggregation in integrin transmembrane function. *Science*, *267*, 883-885.

Miyamoto, S., Teramoto, H., Coso, O. A., Gutkind, J. S., Burbelo, P. D., Akiyama, S. K., & Yamada, K. M. (1995b).

Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. *J. Cell. Biol.*, *131*, 791-805.

Moldoveanu, T., Hosfield, C. M., Jia, Z., Elce, J. S., & Davies, P. L. (2001).

Ca(2+)-induced structural changes in rat m-calpain revealed by partial proteolysis. *Biochem. Biophys. Acta*, *1545*, 245-254.

Moldoveanu, T., Hosfield, C. M., Lim, D., Elce, J. S., Jia, Z., & Davies, P. L. (2002).

A Ca(2+) switch aligns the active site of calpain. *Cell*, *108*, 649-660.

Moldoveanu, T., Hosfield, C. M., Lim, D., Jia, Z., & Davies, P. L. (2003).

Calpain silencing by a reversible intrinsic mechanism. *Nat. Struct. Biol.*, *10*, 371-378.

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.

Molkentin, J. D., Black, B. L., Martin, J. F., & Olson, E. N. (1995).

Cooperative activation of muscle gene expression by MEF2 and myogenic bHLH proteins. *Cell*, 83, 1125-1136.

Molinari, M., Anagli, J., & Carafoli, E. (1994).

Ca(2+)-activated neutral protease is active in the erythrocyte membrane in itnonautolyzed 80-kDa form. *J. Biol. Chem.*, 269, 27992-27995.

Molinari, M., Anagli, J., & Carafoli, E. (1995).

PEST sequences do not influence substrate susceptibility to calpain proteolysis. *J. Bio. Chem.*, 270, 2032-2035.

Mouatt-Prigent, A., Karlsson, J. O., Agid, Y., & Hirsch, E. C. (1996).

Increased M-calpain expression in the mesencephalon of patients with Parkinson's disease but not in other neurodegenerative disorders involving the mesencephalon: a role in nerve cell death. *Neuroscience*, 73, 979-987.

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.

Mozdziak, P. E., Dibner, J. J., & McCoy, D. W. (2002).

The effect of early posthatch starvation on calpain mRNA levels. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, 133, 221-226.

Mugita, N., Kimura, Y., Ogawa, M., Saya, H., & Nakao, M. (1997).

Identification of a novel, tissue-specific calpain htra-3; a human homologue of the *Caenorhabditis elegans* sex determination gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 239, 845-850.

- N / O -

Nakamura, Y., Fukiage, C., Shih, M., Ma, H., David, L. L., Azuma, M., & Shearer, T. R. (2000).

Contribution of calpain Lp82-induced proteolysis to experimental cataractogenesis in mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 41, 1460-1466.

Narumiya, S., Sekine, A., & Fujiwara, M. (1988).

Substrate for botulinum ADP-ribosyltransferase, Gb, has an amino acid sequence homologous to a putative rho gene product. *J. Biol. Chem.*, 263, 17255-17257.

Nelson, W. J., & Traub, P. (1983).

Proteolysis of vimentine and desmin by the Ca²⁺-activated proteinase specific for these intermediate filament proteins. *Mol. Cell Biol.*, 3, 1146-1156.

Nicholson, D. W., & Thornberry, N. A. (1997).

Caspases: killer proteases. *Trends Biochem. Sci.*, 22, 299-306.

Nishihara, H., Nakagawa, Y., Ishikawa, H., Ohba, M., Shimizu, K., & Nakamura, T. (2001).

Matrix vesicles and media vesicles as nonclassical pathways for the secretion of m-Calpain from MC3T3-E1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 285, 845-853.

Nishimura, T., & Goll, D. E. (1991).

Binding of calpain fragments to calpastatin. *J. Biol. Chem.*, 266, 11842-11850.

Nixon, R. A. (2003).

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

Nobes, C. D., & Hall, A. (1995).

Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*, 81, 53-62.

Ohguchi, K., Akao, Y., & Nozawa, Y. (2005).

Involvement of calpain in melanogenesis of mouse B16 melanoma cells. *Mol. Cell Biochem.*, 275, 103-107.

Olson, E. N. (1992).

Interplay between proliferation and differentiation within the myogenic lineage. *Dev. Biol.*, 154, 261-272.

Olson, E. N., & Klein, W. H. (1994).

bHLH factors in muscle development: dead lines and commitments, what to leave in and what to leave out. *Genes Dev.*, 8, 1-8.

Ono, Y., Sorimachi, H., & Suzuki, K. (1998).

Structure and physiology of calpain, an enigmatic protease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 245, 289-294.

Osiak, A. E., Zenner, G., & Linder, S. (2005).

Subconfluent endothelial cells form podosomes downstream of cytokine and RhoGTPase signaling. *Exp. Cell Res.*, 307, 342-353.

Otey, C. A., Pavalko, F. M., & Burridge, K. (1990).

An interaction between alpha-actinin and the beta 1 integrin subunit in vitro. *J. Cell Biol.*, 111, 721-729.

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.

- P -

Pal, G. P., Elce, J. S., & Jia, Z., (2001).

Dissociation and aggregation of calpain in the presence of calcium. *J. Biol. Chem.*, 276, 47233-47238.

Palecek, S. P., Schmidt, C. E., Lauffenburger, D. A., & Horwitz, A. F. (1996).

Integrin dynamics on the tail region of migrating fibroblasts. *J. Cell Sci.*, 109, 941-952.

- Parham, D. M., Webber, B., Holt, H., Williams, W. K., & Maurer, H. (1991).**
Immunohistochemical study of childhood rhabdomyosarcomas and related neoplasms. Results of an intergroup rhabdomyosarcoma study project. *Cancer*, *67*, 3072-3080.
- Pariat, M., Carillo, S., Mollinari, M., Salvat, C., Debussche, L., Milner, J., & Piechaczyk, M. (1997).**
Proteolysis by calpains: a possible contribution to degradation of p53. *Mol. Cell Biol.*, *17*, 2806-2815.
- Parr, T., Sensky, P. L., Bardsley, R. G., & Buttery, P. J. (2001).**
Calpastatin expression in porcine cardiac and skeletal muscle and partial gene structure. *Arch. Biochem. Biophys.*, *395*, 1-13.
- Paulhe, F., Bogyo, A., Chap, H., Perret, B., & Racaud-Sultan, C. (2001).**
Vascular smooth muscle cell spreading onto fibrinogen is regulated by calpains and phospholipase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, *288*, 875-881.
- Pemrick, S. M., & Grebenau, R. C. (1984).**
Qualitative analysis of skeletal myosin as substrate of Ca²⁺-activated neutral protease: comparison of filamentous and soluble, native, and L2-deficient myosin. *J. Cell Biol.*, *99*, 2297-2308.
- Penn, B. H., Bergstrom, D. A., Dilworth, F. J., Bengal, E., & Tapscott, S. J. (2004).**
A MyoD-generated feed-forward circuit temporally patterns gene expression during skeletal muscle differentiation. *Genes Dev.*, *18*, 2348-2353.
- Perrin, C., Vergely, C., & Rochette, L. (2004).**
Calpains and cardiac diseases. *Ann. Cardiol. Angeiol. (Paris)*, *53*, 259-266.
- Perrin, B. J., Amann, K. J., & Huttenlocher, A. (2006).**
Proteolysis of cortactin by calpain regulates membrane protrusion during cell migration. *Mol. Biol. Cell*, *17*, 239-250.
- Petit, V., & Thiery, J.-P. (2000).**
Focal adhesions: structure and dynamics. *Biol. Cell*, *92*, 477-494.
- Phornphutkul, C., Wu, K. Y., Yang, X., Chen, Q., & Gruppuso, P. A. (2004).**
Insulin-like growth factor-I signaling is modified during chondrocyte differentiation. *J. Endocrinol.*, *183*, 477-486.
- Piechaczyk, M. (2000).**
Proteolysis of p53 protein by ubiquitous calpains. *Methods Mol. Biol.*, *144*, 297-307.
- Pontremoli, S., Melloni, E., Viotti, P. L., Michetti, M., Di Lisa, F., & Siliprandi, N. (1990).**
Isovalerylcarnitine is a specific activator of the high calcium requiring calpain forms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, *167*, 373-380.
- Pontremoli, S., Viotti, P. L., Michetti, M., Salamino, F., Sparatore, B., & Melloni, E. (1992).**
Modulation of inhibitory efficiency of rat skeletal muscle calpastatin by phosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, *187*, 751-759.
- Popp, O., Heidinger, M., Ruiz-Heinrich, L., Ries, C., Jochum, M., & Gil-Parrado, S. (2003).**
The calpastatin-derived calpain inhibitor CP1B reduces mRNA expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 and invasion by leukemic THP-1 cells. *Biol. Chem.*, *384*, 951-958.

Potter, A. P., Tirnauer, J. S., Janssen, R., Croall, D. E., Hughes, C. N., Fiacco, K. A., Mier, J. W., Maki, M., & Herman, I. M. (1998).

Calpain regulates actin remodeling during cell spreading. *J. Cell Biol.*, 141, 647-662.

Priddle, H., Hemmings, L., Monkley, S., Wood, A., Patel, B., Sutton, D., Dunn, G. A., Zicha, D., & Critchley, D. R. (1998).

Disruption of the talin gene compromises focal adhesion assembly in undifferentiated but not differentiated embryonic stem cells. *J. Cell Biol.*, 142, 1121-1133.

- R -

Ran, Q., Wadhwa, R., Kawai, R., Kaul, S. C., Sifers, R. N., Bick, R. J., Smith, J. R., Pereira-Smith, O. M. (2000).

Extramitochondrial localization of mortalin/mthsp70/PBP74/GRP75. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 275, 174-179.

Rankin, S., & Rozengurt, E. (1994).

Platelet-derived growth factor modulation of focal adhesion kinase (p125FAK) and paxilline tyrosine phosphorylation in Swiss 3T3 cells. Bell-shaped dose response and cross-talk with bombesin. *J. Biol. Chem.*, 269, 704-710.

Rathmell, J. C., & Thompson, C. B. (1999).

The central effectors of cell death in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.*, 17, 781-828.

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, 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.

Reverter, D., Sorimachi, H., & Bode, W. (2001).

The structure of calcium-free human m-calpain: implications for calcium activation and function. *Trends Cardiovasc. Med.*, 11, 222-229.

Richard, I., Broux, O., Allamand, V., Fougousse, F., Chiannikulchai, N., Bourg, N., Brenquier, 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 IkappaBalpha/nuclear factor kappaB pathway perturbation in mice. *J. Cell Biol.*, 151, 1583-1590.

Ridley, A. J., & Hall, A. (1992).

The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*, 70, 389-399.

Ridley, A. J. (2001).

Rho proteins: linking signaling with membrane trafficking. *Traffic*, 2, 303-310.

Rivett, A. J., Skilton, H. E., Rowe, A. J., Eperon, I. C., & Sweeney, S. T. (1991).

Components of the multicatalytic proteinase complex. *Biomed. Biochim. Acta*, 50, 447-450.

Rock, M. T., Dix, A. R., Brooks, W. H., & Roszman, T. L. (2000).

Beta 1 integrin-mediated T cell adhesion and cell spreading are regulated by calpain. *Exp. Cell Res.*, 261, 260-270.

Rodriguez-Barbero, A., Dorado, F., Velasco, S., Pandiella, A., Banas, B., & Lopez-Novoa, J. M. (2006).

TGF-beta1 induces COX-2 expression and PGE2 synthesis through MAPK and PI3K pathways in human mesangial cells. *Kidney Int.*, 70, 901-909.

Rotonda, J., Nicholson, D. W., Fazil, K. M., Gallant, M., Gareau, Y., Labelle, M., Peterson, E. P., Rasper, D. M., Ruel, R., Vaillancourt, J. P., Thronberry, N. A., & Becker, J. W. (1996).

The three-dimensional structure of apopain/ CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nat. Struct. Biol.*, 3, 619-625.

Rudnicki, M. A., & Jaenisch, R. (1995).

The MyoD family of transcription factors and skeletal myogenesis. *Bioessays*, 17, 203-209.

- S -

Sabourin, L. A., & Rudnicki, M. A. (2000).

The molecular regulation of myogenesis. *Clin. Genet.*, 57, 16-25.

Saido, T. C., Mizuno, K., & Suzuki, K. (1991).

Proteolysis of protein kinase C by calpain: effect of acidic phospholipids. *Biomed. Biochim. Acta*, 50, 485-489.

Saido, T. C., Shibata, M., Takenawa, T., Murofushi, H., & Suzuki, K. (1992).

Positive regulation of mu-calpain action by polyphosphoinositides. *J. Biol. Chem.*, 267, 24585-24590.

Saito, K., Elce, J. S., Hamos, J. E., & Nixon, R. A. (1993).

Widespread activation of calcium-activated neutral proteinase (calpain) in the brain in Alzheimer disease: a potential molecular basis for neuronal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 2628-2632.

Sakai, K., Akanuma, H., Imahori, K., & Kawashima, S. (1987)

A unique specificity of a calcium activated neutral protease indicated in histone hydrolysis. *J. Biochem. (Tokyo)*, 101, 911-918.

Sakihama, T., Kakidani, H., Zenita, K., Yumoto, N., Kikuchi, T., Sasaki, T., Kannagi, R., Nakanishi, S., Ohmori, M., Takio, K., et al. (1985).

A putative Ca²⁺-binding protein: structure of the light subunit of porcine calpain elucidated by molecular cloning and protein sequence analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 6075-6079.

Sakon, M., Kambayashi, J., Ohno, H., & Kosaki, G. (1981).

Two forms of Ca⁺⁺-activated neutral protease in platelets. *Thromb. Res.*, 24, 207-214.

Salamino, F., Averna, M., Tedesco, I., De Tullio, R., Melloni, E., & Pontremoli, S. (1997).

Modulation of rat brain calpastatin efficiency by post-translational modifications. *FEBS Lett.*, 412, 433-438.

Sandoval, I. V., & Weber, K. (1978).

Calcium-induced inactivation of microtubule formation in brain extracts. Presence of a calcium-dependent protease acting on polymerization-stimulating microtubule-associated proteins. *Eur. J. Biochem.*, 92, 463-470.

Santella, L., Kyojuka, K., De Riso, L., & Carafoli, E. (1998).

Calcium, protease action, and the regulation of the cell cycle. *Cell Calcium*, 23, 123-130.

Satish, L., Babu, M., Tran, K. T., Hebda, P. A., & Wells, A. (2004).

Keloid fibroblast responsiveness to epidermal growth factor and activation of downstream intracellular signaling pathways. *Wound Repair Regen.*, 12, 183-192.

Satish, L., Blair, H. C., Glading, A., & Wells, A. (2005).

Interferon-inducible protein 9 (CXCL11)-induced cell motility in keratinocytes requires calcium flux-dependent activation of mu-calpain. *Mol. Cell Biol.*, 25, 1922-1941.

Sato, K., & Kawashima, S. (2001).

Calpain function in the modulation of signal transduction molecules. *Biol. Chem.*, 382, 743-751.

Sato, N., Fujio, Y., Yamada-Honda, F., Funai, H., Wada, A., Kawashima, S., Awata, N., & Shibata, N. (1995).

Elevated calcium level induces calcium-dependent proteolysis of A-CAM (N-cadherin) in heart—analysis by detergent-treated model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 217, 649-653.

Scaramuzzino, D. A., & Morrows, J. S. (1993).

Calmodulin-binding domain of recombinant erythrocyte beta-adducin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 3398-3402.

Schád, E., Farkas, A., Jékely, G., Tompa, P., & Friedrich, P. (2002).

A novel human small subunit of calpains. *Biochem. J.*, 362, 383-388.

Schmidt, C. E., Horwitz, A. F., Lauffenburger, D. A., & Sheetz, M. P. (1993).

Integrin-cytoskeletal interactions in migrating fibroblasts are dynamic, asymmetric, and regulated. *J. Cell Biol.*, 123, 977-991.

Schollmeyer, J. E. (1986).

Possible role of calpain I and calpain II in differentiating muscle. *Exp. Cell Res.*, 163, 413-422.

Scott, A., Khan, K. M., & Duronio, V. (2005).

IGF-I activates PKB and prevents anoxic apoptosis in Achilles tendon cells. *J. Orthop. Res.*, 23, 1219-1225.

Scrabble, H., Witte, D., Shimada, H., Seemayer, T., Sheng, W. W., Soukup, S., Koufos, A., Houghton, P., Lampkin, B., & Cavenee, W. (1989).

Molecular differential pathology of rhabdomyosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 1, 23-35.

Serrano, K., & Devine, D. V. (2004).

Vinculin is proteolyzed by calpain during platelet aggregation : 95 kDa cleavage fragment associates with the platelet cytoskeleton. *Cell Motil. Cytoskeleton*, 58, 242-252.

Shapiro, D. N., Sublett, J. E., Li, B., Downing, J. R., & Naeve, C. W. (1993).

Fusion of PAX3 to a member of the forkhead family of transcription factors in human alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Res.*, 53, 5108-5112.

Sheetz, M. P., Felsenfeld, D., Galbraith, C. G., & Choquet, D. (1999).

Cell migration as a five-step cycle. *Biochem. Soc. Symp.*, *65*, 223-243.

Shimizu, T., Toumoto, A., Ihara, K., Shimizu, M., Kyogoku, Y., Ogawa, Y., & Hakoshima, T. (1997).

Crystal structure of PHO4 bHLH domain-DNA complex: flanking base recognition. *EMBO J.*, *16*, 4689-4697.

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.

Shirakata, Y., Kimura, R., Nanba, D., Iwamoto, R., Tokumaru, S., Morimoto, C., Yokota, K., Nakamura, M., Sayama, K., Mekada, E., Higashiyama, S., & Hashimoto, K. (2005).

Heparin-binding EGF-like growth factor accelerates keratinocytes migration and skin wound healing. *J. Cell Sci.*, *118*, 2363-2370.

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.

Singh, R. B., Dandekar, S. P., Elimban, V., Gupta, S. K., & Dhalla, N. S. (2004).

Role of proteases in pathophysiology of cardiac disease. *Mol. Cell Biochem.*, *263*, 241-256.

Sondermann, H., Dogic, D., Pesch, M., & Aumailley, M. (1999).

Targeting of cytoskeletal linker proteins to focal adhesion complexes is reduced in fibroblasts adhering to laminine-1 when compared to fibronectin. *Cell Adhes. Commun.*, *7*, 43-56.

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., Toyama-Sorimachi, N., Saido, T. C., Kawasaki, H., Sugita, H., Miyasaka, M., Arahata, K., Ishiura, S., & Suzuki, K. (1993).

Muscle-specific calpain, p94, is degraded by autolysis immediately after translation, resulting in disappearance from muscle. *J. Biol. Chem.*, *268*, 10593-10605.

Sorimachi, H., Kinbara, K., Kimura, S., Takahashi, M., Ishiura, S., Sasagawa, N., Shimada, H., Tagawa, K., Maruyama, K., et al. (1995).

Muscle-specific calpain, p94, responsible for limb girdle muscular dystrophy type2A, associates with connectin through IS2, a p94-specific sequence. *J. Biol. Chem.*, *270*, 31158-31162.

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.

Spicer, D. B., Rhee, J., Cheung, W. L., & Lassar, A. B. (1996).

Inhibition of myogenic bHLH and MEF2 transcription factors by the bHLH protein Twist. *Science*, *272*, 1476-1480.

Spira, M. E., Oren, R., Dormann, A., & Gitler, D. (2003).

Critical calpain-dependent ultrastructural alterations underlie the transformation of an axonal segment into a growth cone after axotomy of cultured *Aplysia* neurons. *J. Comp. Neurol.*, 457, 293-312.

Spizz, G., & Blackshear, P. J. (2001).

Overexpression of the myristoylated alanine-rich C-kinase substrate inhibits cell adhesion to extracellular matrix components. *J. Biol. Chem.*, 276, 32264-32273.

Squier, M. K., & Cohen, J. J. (1997).

Calpain, an upstream regulator of thymocyte apoptosis. *J. Immunol.*, 158, 3690-3697.

Sreenan, S. K., Zhou, Y. P., Otani, K., Hansen, P. A., Currie, K. P., Pan, C. Y., Lee, J. P., Ostrega, D. M., Pugh, W., Horikawa, Y., Cox, N. J., Hanis, C. L., Burant, C. F., Fox, A. P., Bell, G. I., & Polonsky, K. S. (2001).

Calpains play a role in insulin secretion and action. *Diabetes*, 50, 2013-2020.

Steeg, P. S. (2003).

Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells. *Nat. Rev. Cancer*, 3, 55-63.

Stennicke, H. R., & Salvesen, G. S. (2000).

Caspases – controlling intracellular signals by protease zymogen activation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1477, 299-306.

Stewart, M. P., McDowall, A., & Hogg, N. (1998).

LFA-1-mediated adhesion is regulated by cytoskeletal restraint and by a Ca²⁺-dependent protease, calpain. *J. Cell Biol.*, 140, 699-707.

Strasser, G. A., Rahim, N. A., VanderWall, K. E., Gertler, F. B., & Lanier, L. M. (2004).

Arp2/3 is a negative regulator of growth cone translocation. *Neuron.*, 43, 81-94.

Stuart, A., & Radhakrishnan, J. (2004).

Rhabdomyosarcoma. *Indian J. Pediatr.*, 71, 331-337.

Suzuki, K., Ishiura, S., Tsuji, S., Katamoto, T., Sugita, H., & Imahori, K. (1979).

Calcium activated neutral protease from human skeletal muscle. *FEBS Lett.*, 104, 355-358.

Suzuki, K., Tsuji, S., Ishiura, S., Kimura, Y., Kubota, S., & Imahori, K. (1981).

Autolysis of calcium-activated neutral protease of chicken skeletal muscle. *J. Biochem. (Tokyo)*, 90, 1787-1793.

Suzuki, K. (1991).

Nomenclature of calcium dependent proteinase. *Biomed. Biochim. Acta*, 50, 483-484.

Suzuki, K., Saido, T. C., & Hirai, S. (1992).

Modulation of cellular signals by calpain. *Ann. N Y Acad. Sci.*, 674, 218-227.

Suzuki, K., & Sorimachi, H. (1998).

A novel aspect of calpain activation. *FEBS Lett.*, 433, 1-4.

Svitkina, T. M., Bulanova, E. A., Chaga, O. Y., Vignjevic, D. M., Kojima, S., Vasiliev, J. M., & Borisy, G. G. (2003).

Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *J. Cell Biol.*, 160, 409-421.

Syntichaki, P., Xu, K., Driscoll, M., & Tavernarakis, N. (2002).

Specific aspartyl and calpain proteases are required for neurodegeneration in *C. elegans*. *Nature*, 419, 939-944.

Szomor, Z., Shimizu, K., Yamamoto, S., Yasuda, T., Ishikawa, H., & Nakamura, T. (1999).

Externalization of calpain (calcium-dependent neutral cysteine proteinase) in human arthritic cartilage. *Clin. Exp. Rheumatol.*, 17, 569-574.

- T -

Takano, E., & Murachi, T. (1982).

Purification and some properties of human erythrocyte calpastatin. *J. Biochem.*, 92, 2021-2028.

Takano, E., Maki, M., Mori, H., Hatanaka, M., Marti, T., Titani, K., Kannagi, R., Ooi, T., & Murachi, T. (1988).

Pig heart calpastatin: identification of repetitive domain structures and anomalous behaviour in polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochemistry*, 27, 1964-1972.

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.

Tan, Y., Wu, C., De Veyra, T., & Greer, P. A. (2006).

Ubiquitous calpains promote both apoptosis and survival signals in responses to different cell death stimuli. *J. Biol. Chem.*, 281, 17689-17698.

Temm-Grove, C. J., Wert, D., Thompson, V. F., Allen, R. E., & Goll, D. E. (1999).

Microinjection of calpastatin inhibits fusion in myoblasts. *Exp. Cell Res.*, 247, 293-303.

Tidball, J. G., & Spencer, M. J. (2000).

Calpains and muscular dystrophies. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 32, 1-5.

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 I is a Ca²⁺-regulated phospholipids-binding domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 280, 1333-1339.

Tompa, P., Mucsi, Z., Orosz, G., & Friedrich, P. (2002).

Calpastatin subdomains A and C are activators of calpain. *J. Biol. Chem.*, 277, 9022-9026.

Tsuji, T., Ohga, Y., Yoshikawa, Y., Sakata, S., Abe, T., Tabayashi, N., Kobayashi, S., Kohzuki, H., Yoshida, K. I., Suga, H., Kitamura, S., Tanaguchi, S., & Takaki, M. (2001).

Rat cardiac contractile dysfunction induced by Ca²⁺ overload: possible link to the proteolysis of alpha-fodrin. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 281, H1286-1294.

Tsujinaka, T., Sakon, M., Kambayashi, J., & Kosaki, G. (1982).

Cleavage of cytoskeletal proteins by two forms of Ca²⁺ activated neutral proteases in human platelets. *Thromb. Res.*, 28, 149-156.

Tsukita, S., Hieda, Y., & Tsukita, S. (1989).

A new 82-kD barbed end-capping protein (radixin) localized in the cell-to-cell adherens junction: purification and characterization. *J. Cell Biol.*, 108, 2369-2382.

Tucker, G. C. (2006).

Integrins: molecular targets in cancer therapy. *Curr. Oncol. Rep.*, 8, 96-103.

Turc-Carel, C., Lizard-Nacol, S., Justrabo, E., Favrot, M., Philip, T., & Tabone, E. (1986).

Consistent chromosomal translocation in alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 19, 361-362.

- U / V / W -

Uemori, T., Shimojo, T., Asada, K., Asano, T., Kimizuka, F., Kato, I., Maki, M., Hatanaka, M., Murachi, T., Hanzawa, H., et al. (1990).

Characterization of a functional domain of human calpastatin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 166, 1485-1493.

Vilei, E. M., Calderara, S., Anagli, J., Berardi, S., Hitomi, K., Maki, M., & Carafoli, E. (1997).

Functional properties of recombinant calpain I and of mutants lacking domains III and IV of the catalytic subunit. *J. Biol. Chem.*, 272, 25802-25808.

Voges, D., Zwickl, P., & Baumeister, W. (1999).

The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu. Rev. Biochem.*, 68, 1015-1068.

Waghray, A., Wang, D. S., McKinsey, D., Hayes, R. L., & Wang, K. K. (2004).

Molecular cloning and characterization of rat and human calpain-5. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 324, 46-51.

Wakelam, M. J. (1985).

The fusion of myoblasts. *Biochem. J.*, 228, 1-12.

Walker, N. P., Talanian, R. V., Brady, K. D., Dang, L. C., Bump, N. J., Ferenz, C. R., Franklin, S., Hackett, M. C., Hammill, L. D., et al. (1994).

Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer. *Cell*, 78, 343-352.

Walsh, K., & Perlman, H. (1997).

Cell cycle exit upon myogenic differentiation. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 7, 597-602.

Wang, K. K., Villalobo, A., & Roufogalis, B. D. (1989).

Calmodulin-binding proteins as calpain substrates. *Biochem. J.*, 262, 693-706.

Wang, K., Bekar, L. K., Furber, K., & Walz, W. (2004).

Vimentin-expressing proximal reactive astrocytes correlate with migration rather than proliferation following focal brain injury. *Brain Res.*, 1024, 193-202.

Wasserman, W. W., & Fickett, J. W. (1998).

Identification of regulatory regions which confer muscle-specific gene expression. *J. Mol. Biol.*, 278, 167-181.

Watanabe, N., Vande Woude, G. F., Ikawa, Y., & Sagata, N. (1989).

Specific proteolysis of the c-mos proto-oncogene product by calpain on fertilization of *Xenopus* eggs. *Nature*, 342, 505-511.

Watt, F., & Molloy, P. L. (1993).

Specific cleavage of transcription factors by the thiol protease, m-calpain. *Nucleic. Acids Res.*, 21, 5092-5100.

Webb, D. J., Parsons, J. T., & Horwitz, A. F. (2002).

Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells -- over and over and over again. *Nat. Cell Biol.*, 4, E97-100.

Wehrle-Haller, B., & Imhof, B. A. (2003).

Actin, microtubules and focal adhesion dynamics during cell migration. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 35, 39-50.

Weintraub, H., Tapscott, S. J., Davis, R. L., Thayer, M. J., Adam, M. A., Lassar, A. B., & Miller, A. D. (1989).

Activation of muscle-specific genes in pigment, nerve, fat, liver, and fibroblast cell lines by forced expression of MyoD. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 5434-5438.

Wells, A. (2000).

Tumor invasion: role of growth factor-induced cell motility. *Adv. Cancer Res.*, 78, 31-101.

Wendt, A., Thompson, V. F., & Goll, D. E. (2004).

Interaction of calpastatin with calpain: a review. *Biol. Chem.*, 385, 465-472.

Werner, E. D., Brodsky, J. L., & McCracken, A. A. (1996).

Proteasome-dependent endoplasmic reticulum-associated protein degradation: an unconventional route to a familiar fate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 13797-13801.

Willaime-Morawek, S., Arbez, N., Miriani, J., & Brugg, B. (2005).

IGF-I protects cortical neurons against ceramide-induced apoptosis via activation of the PI-3K/Akt and ERK pathways; is this protection independent of CREB and Bcl-2? *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 142, 97-106.

Wilson, K. P., Black, J. A., Thomson, J. A., Kim, E. E., Griffith, J. P., Navia, M. A., Murcko, M. A., Chambers, S. P., Aldape, R. A., Raybuck, S. A., et al. (1994).

Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature*, 370, 270-275.

Wittekind, C., & Neid, M. (2005).

Cancer invasion and metastasis. *Oncology*, 69, 14-16.

Wright, J. K., Dunk, C. E., Perkins, J. E., Winterhager, E., Kingdom, J. M., & Lye, S. J. (2006).

EGF modulates trophoblast migration through regulation of Connexin 40. *Placenta*, 27, S114-121.

- X / Y / Z -

Xie, H., Pallero, M. A., Gupta, K., Chang, P., Ware, M. F., Witke, W., Kwiatkowski, D. J., Lauffenburger, D. A., Murphy-Ullrich, J. E., & Wells, A. (1998).

EGF receptor regulation of cell motility: EGF induces disassembly of focal adhesions independently of the motility-associated PLCgamma signaling pathway. *J. Cell Sci.*, 111, 615-624.

Xu, L., & Deng, X. (2004).

Tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone induces phosphorylation of mu- and m-calpain in association with increased secretion, cell migration, and invasion. *J. Biol. Chem.*, 279, 53683-53690.

Xu, L., & Deng, X. (2006a).

Protein kinase Ciota promotes nicotine-induced migration and invasion of cancer cells via phosphorylation of micro- and m-calpains. *J. Biol. Chem.*, 281, 4457-4466.

Xu, L., & Deng, X. (2006b).

Suppression of cancer cell migration and invasion by protein phosphatase 2A through dephosphorylation of mu- and m-calpains. *J. Biol. Chem.*, 281, 35567-35575.

Xu, Q., & Wu, Z. (2000).

The Insulin-like Growth Factor-phosphatidylinositol 3-kinase-Akt signaling pathway regulates myogenin expression in normal myogenic cells but not in rhabdomyosarcoma-derived RD cells. *J. Biol. Chem.*, 275, 36750-36757.

Xu, W., Coll, J. L., & Adamson, E. D. (1998).

Rescue of the mutant phenotype by reexpression of full-length vinculin in null F9 cells; effects on cell locomotion by domain deleted vinculin. *J. Cell Sci.*, 111, 1535-1544.

Xu, W., Yao, K., Sun, Z. H., Wang, K. J., & Shentu, X. C. (2004).

Expression and proteolytic activity of calpain in lens epithelial cells of oxidative cataract. *J. Zhejiang Univ. Sci.*, 5, 743-748.

Yamada, Y., & Sameshima, M. (2004).

Cell shape regulation and co-translocation of actin and adenosyl homocysteinase in response to intermediate hypertonicity. *FEMS Microbiol. Lett.*, 238, 417-422.

Yamaguchi, R., Maki, M., Hatanaka, M., & Sabe, H. (1994).

Unphosphorylated and tyrosine-phosphorylated forms of a focal adhesion protein, paxilline, are substrates for calpain II in vitro: implications for the possible involvement of calpain II in mitosis-specific degradation of paxilline. *FEBS Lett.*, 356, 114-116.

Yamamoto, N., Akiyama, S., Katagiri, T., Namiki, M., Kurokawa, T., & Suda, T. (1997).

Smad1 and Smad5 act downstream of intracellular signalings of BMP-2 that inhibits myogenic differentiation and induces osteoblast differentiation in C2C12 myoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 238, 574-580.

Yamashima, T. (2000).

Implication of cysteine proteases calpain, cathepsin and caspase in ischemic neuronal death of primates. *Prog. Neurobiol.*, 62, 273-295.

Yang, X., Pratley, R. E., Baier, L. J., Horikawa, Y., Bell, G. I., Bogardus, C., & Permana, P. A. (2001).

Reduced skeletal muscle calpain-10 transcript level is due to a cumulative decrease in major isoforms. *Mol. Genet. Metab.*, 73, 111-113.

Yang, S., & Huang, X. Y. (2005).

Ca²⁺ influx through L-type Ca²⁺ channels controls the trailing tail contraction in growth factor-induced fibroblast cell migration. *J. Biol. Chem.*, 280, 27130-27137.

Yarm, F. R. (2002).

Plk phosphorylation regulates the microtubule-stabilizing protein TCTP. *Mol. Cell Biol.*, 22, 6209-6221.

Yoshida, M., Suzuki, A., Shimizu, T., & Ozawa, E. (1992).

Proteinase-sensitive sites on isolated rabbit dystrophin. *J. Biochem. (Tokyo)*, 112, 433-439.

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.

Yoshizawa, T., Sorimachi, H., Tomioka, S., Ishiura, S., & Suzuki, K. (1995).

Calpain dissociates into subunits in the presence of calcium ions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 208, 376-383.

Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M., & Horvitz, H. R. (1993).

The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell*, 75, 641-652.

Zaka, M., Rafi, M. A., Rao, H. Z., Luzzi, P., & Wenger, D. A. (2005).

Insulin-like growth factor-1 provides protection against psychosine-induced apoptosis in cultured mouse oligodendrocyte progenitor cells using primarily the PI3K/Akt pathway. *Mol. Cell Neurosci.*, 30, 398-407.

Zamir, E., Katz, B. Z., Aota, S., Yamada, K. M., Greiger, B., & Kam, Z. (1999).

Molecular diversity of cell-matrix adhesions. *J. Cell Sci.*, 112, 1655-1669.

Zeineldin, R., & Hudson, L. G. (2006).

Epithelial cell migration in response to epidermal growth factor. *Methods Mol. Biol.*, 327, 147-158.

Zhai, J., Lin, H., Nie, Z., Wu, J., Canete-Soler, R., Schaefer, W. W., & Schaefer, D. D. (2003).

Direct interaction of focal adhesion kinase with p190RhoGEF. *J. Biol. Chem.*, 278, 24865-24873.

Zhang, W., Lane, R. D., & Mellgren, R. L. (1996).

The major calpain isozymes are long-lived proteins. Design of an antisense strategy for calpain depletion in cultured cells. *J. Biol. Chem.*, 271, 18825-18830.

Zhu, S., Goldschmidt-Clermont, P. J., & Dong, C. (2004).

Transforming growth factor-beta-induced inhibition of myogenesis is mediated through Smad pathway and is modulated by microtubule dynamic stability. *Circ. Res.*, 94, 617-625.

Zimmerman, U. J., & Schaefer, W. W. (1991).

Two-stage autolysis of the catalytic subunit initiates activation of calpain I. *Biochim. Biophys. Acta*, 1080, 275.