

N° d'ordre : 3171

# THESE

PRESENTEE A

## L'UNIVERSITE BORDEAUX 1

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DU VIVANT,  
GEOSCIENCES ET SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

Par Monsieur Sébastien GOUDENEGE

Pour obtenir le grade de  
**DOCTEUR**

SPECIALITE : SCIENCES DES ALIMENTS ET NUTRITION

---

---

### RELATION PROTEOLYSE CALCIUM-DEPENDANTE/*CAVEOLAE* AU COURS DE LA DIFFERENCIATION DE LA CELLULE MUSCULAIRE

---

---

Soutenue le 9 juin 2006

*Après avis de :*

**Mr E. OGIER-DENIS**, Directeur de Recherche (I.N.S.E.R.M.)  
**Mr D. BECHET**, Directeur de Recherche (I.N.R.A.)

**Rapporteurs**

*Devant la commission d'examen formée de Mme, Mrs*

**P. HIGUERET**, Professeur à l'Université BORDEAUX 1  
**M. BONNEU**, Professeur à l'Université BORDEAUX 2  
**P. COTTIN**, Professeur à l'Université BORDEAUX 1  
**D. BECHET**, Directeur de Recherche (I.N.R.A.)  
**E. OGIER-DENIS**, Directeur de Recherche (I.N.S.E.R.M.)  
**S. POUSSARD**, Ingénieur de Recherche à l'Université BORDEAUX 1

**Président**  
**Rapporteur de soutenance**  
**Examineurs**

# *Remerciements*

Comment ne pas commencer ce chapitre par celle qui a cru en moi et s'est battue pour me recruter à la fin de mon DEA ?

Je tiens donc tout naturellement à remercier Madame **Sylvie POUSSARD**, Ingénieur de Recherche à l'université Bordeaux 1. Une thèse est faite de haut et de bas et malgré une période difficile, due à des conditions extérieures, j'ai pris un grand plaisir dans notre collaboration tout au long de ces années. Elle a su me guider dans mon travail de recherche tout en me laissant l'autonomie dont j'avais besoin. Ses compétences, sa disponibilité ont été pour moi un allié précieux au cours de ces années.

J'exprime ma plus profonde reconnaissance à Monsieur le Professeur **Patrick COTTIN** pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Ses conseils scientifiques avisés et sa gentillesse ont toujours été présents au cours de ces années. Sur un plan plus personnel, je le remercie pour sa compréhension et la liberté qu'il m'a laissée dans une période difficile.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Monsieur **Eric OGIER-DENIS** (Directeur de Recherche à l'INSERM) ainsi qu'à Monsieur **Daniel BECHET** (Directeur de Recherche à l'INRA) qui, malgré leurs nombreuses occupations, ont accepté de juger ce travail et d'être présents à la commission d'examen.

Monsieur le Professeur **Paul HIGUERET** a accepté de présider la commission d'examen, je lui en suis reconnaissant. Je remercie également Monsieur le Professeur **Marc BONNEU** (Université Bordeaux 2) qui m'a fait l'honneur de faire partie de mon jury de thèse.

J'exprime toute ma reconnaissance à Monsieur le Professeur **Jacques RAYMOND** avec qui j'ai pu discuter aussi bien sur un plan scientifique que des sujets de société. Il m'a par ailleurs encadré lors de ma découverte de l'enseignement, je ne pouvais espérer meilleur guide. Par son énergie et son implication, il a su me donner goût à l'enseignement (étant

initialement plutôt réfractaire). Un seul reproche, je ne suis pas toujours d'accord avec ses analyses "footbalistiques".

J'adresse également mon amitié à **Elise DARGELOS** et **Laetitia DAURY** (Maîtres de Conférence) ; je les remercie pour leurs conseils et l'intérêt qu'elles m'ont porté. Pour les mêmes raisons je remercie monsieur le Professeur **Jean-Jacques BRUSTIS**.

Tout au long de ce doctorat, j'ai particulièrement apprécié monsieur **Abdessatar HADJ-SASSI** (Maître de Conférence) pour nos diverses discussions. Sa gentillesse et sa disponibilité n'ont pas d'égal.

Un grand merci à Monsieur **LOCHET** pour ses nombreux conseils (informatiques et d'ordre privé). Son humour a toujours été présent. Ce fut un grand plaisir pour moi de venir travailler en sa compagnie.

Madame **Cynthia DUBOURG** a été présente dans les moments difficiles, je l'en remercie. Ses conseils ont été précieux.

Je remercie tous les étudiants (**Liliane, Abir, Sandrine, Yann, Pascal, Matenin, Pierre, Sébastien, Dalila**) qui d'une manière ou d'une autre m'ont apporté amitié, soutien et sympathie. Une mention particulière à **Florence** et **Hugo** que j'ai eu le plaisir d'encadrer.

Un grand merci à **Cindy** qui m'a encouragé pour la dernière ligne droite. Hormis avoir relu mon manuscrit, elle m'a apporté une touche de gaieté non négligeable.

Enfin je terminerais en exprimant ma gratitude à "**Monsieur Leloup**" qui m'a conseillé, aidé lors des deux dernières années (le roi de Power-point!!) et qui a pris de son temps pour relire ce manuscrit. Nos discussions (souvent enflammées) sur tous types de sujets ont été un vrai bonheur et ce, même si nous n'étions pas toujours d'accord. Je lui souhaite bon courage dans ses recherches.

## *Liste des figures*

<b>Figure 1</b> : Représentation schématique d'une coupe de lysosome	p 4
<b>Figure 2</b> : Les différentes voies conduisant à la formation des lysosomes	p 5
<b>Figure 3</b> : Assemblage du protéasome 26S	p 7
<b>Figure 4</b> : Séquences d'événements permettant la dégradation de protéines par le protéasome	p 9
<b>Figure 5</b> : Structure et activation des caspases	p 11
<b>Figure 6</b> : Structure des calpaïnes ubiquitaires	p 15
<b>Figure 7</b> : Structure de la p94	p 16
<b>Figure 8</b> : Mécanisme d'activation des calpaïnes	p 19
<b>Figure 9</b> : Représentation des domaines protéiques de la calpastatine	p 21
<b>Figure 10</b> : <i>Caveolae</i> observées dans les ostéoblastes. Microscopie électronique	p 27
<b>Figure 11</b> : A. Représentation schématique des diverses cavéolines	
B. Représentation schématique d'une cavéoline et du CSD	p 30
<b>Figure 12</b> : <i>Caveolae</i> et cholestérol	p 32
<b>Figure 13</b> : <i>Caveolae</i> et signalisation calcique	p 33
<b>Figure 14</b> : structure des PKCs	p 38
<b>Figure 15</b> : voie de la phospholipase C	p 39
<b>Figure 16</b> : Modèle d'activation des PKCs	p 40
<b>Figure 17</b> : A. Représentation schématique de la MARCKS en interaction avec la membrane.	
B. Image structurale du PSD en interaction avec la membrane. C. Modèle de régulation	p 43
<b>Figure 18</b> : Principaux événements et facteurs régulateurs impliqués dans le développement musculaire	p 45
<b>Figure 19</b> : Evolution quantitative de la cavéoline-1 (A) et de la cavéoline-3 (B) au cours de la différenciation musculaire	p 68
<b>Figure 20</b> : Localisation par immunofluorescence de la protéine cavéoline-3	p 69
<b>Figure 21</b> : Isolement des <i>caveolae</i> après ultracentrifugation sur gradient de saccharose	p 71

- Figure 22** : Observation de la fraction 3 (après fractionnement) par cryo-microscopie électronique p 73
- Figure 23** : Co-fractionnement de la m-calpaïne, de la PKC $\alpha$  et de MARCKS au niveau de la fraction cavéolaire après ultracentrifugation sur gradient de saccharose p 75
- Figure 24** : Purification des *caveolae* par culottage p 76
- Figure 25** : Fractionnement sur gradient de saccharose des protéines PKC $\alpha$ , m-calpaïne et cavéoline-3 après traitement par la saponine p 77
- Figure 26** : Immunorévélations des protéines m-calpaïne, cavéolines, PKC $\alpha$  et MARCKS après immunoprécipitation magnétique par les anticorps anti-cavéoline-3 p 78
- Figure 27** : Co-localisation des protéines cavéoline-3 et m-calpaïne au cours de la fusion des myoblastes par microscopie confocale p 80
- Figure 28** : Immunolocalisation de la protéine PKC $\alpha$  au cours de la fusion des myoblastes par microscopie confocale p 81
- Figure 29** : Traitement de la fraction 3 (obtenue après ultracentrifugation sur gradient de saccharose) par le carbonate de sodium p 84
- Figure 30** : Traitement de la fraction 3 (obtenue après ultracentrifugation sur gradient de saccharose) par la protéinase K ou/et le déoxycholate de sodium p 86
- Figure 31** : Modèle hypothétique d'association des protéines cavéoline-3, MARCKS, m-calpaïne et PKC $\alpha$  avec les *caveolae* p 87
- Figure 32** : Effet de l'inhibition de la biosynthèse du cholestérol sur l'intégrité des *caveolae*. p 88
- Figure 33** : Effet de l'inhibition de la biosynthèse du cholestérol sur les activités calpaïnes (zymogramme) p 89
- Figure 34** : Incidence de l'inhibition de la biosynthèse du cholestérol sur la fusion des myoblastes C2C12 p 90
- Figure 35** : Localisation des protéines cavéoline-3 et m-calpaïne au cours de la fusion des myoblastes par microscopie confocale après traitement par un inhibiteur de la biosynthèse du cholestérol (mévinoline) p 92
- Figure 36** : Profils électrophorétiques d'extraits cellulaires immunoprécipités par les anticorps anti-cavéolines-3 après SDS PAGE et coloration au bleu de coomassie p 94
- Figure 37** : Mesure des activités calpaïnes dans les fractions 3 et 10 après ultracentrifugation sur gradient de saccharose p 104

- Figure 38** : Protéolyse neutre calcium-dépendante au niveau des *caveolae* dans la cellule musculaire en cours de différenciation p 106
- Figure 39** : Mise en évidence de la protéolyse calcium-dépendante de la PKC $\alpha$  associée aux *caveolae* p 108
- Figure 40** : Induction de la translocation puis de la "down-regulation" de la PKC $\alpha$  en présence de PMA : incidence sur la protéine MARCKS p 110
- Figure 41** : Immunorévélation de la m-calpaïne après traitements des cellules par des antisens dirigés contre la m-calpaïne p 111
- Figure 42** : Analyse protéomique différentielle p 114
- Figure 43** : Hypothèse d'une voie de régulation modulée par la m-calpaïne au niveau des *caveolae* p 118

### *Liste des tableaux*

- Tableau I** : Nomenclature internationale des calpaïnes p 13
- Tableau II** : Isoformes de la PKC dans les tissus de mammifères p 37
- Tableau III** : Identification des principales protéines retrouvées dans la fraction cavéolaire des myotubes C2C12 p 96
- Tableau IV** : Identification des protéines potentiellement substrat de la m-calpaïne p 115

## *Abréviations*

- ADN** : Acide déoxyribonucléique
- ARNm** : Acide ribonucléique messenger
- ATP** : Adénosine triphosphate
- BCIP** : 5-bromo-4-chloro-3-indoyle phosphate
- DMEM** : Milieu de Eagle modifié par Dubelcco
- DMSO** : Diméthyl sulfoxyde
- DNase** : Déoxyribonucléase
- DO** : Densité optique
- DTT** : Dithiothréitol
- EDTA** : Acide éthylène diamine tétraacétique
- EGTA** : Ethylène glycol-O, O'-bis (2 aminoéthyl)
- HEPES** : Acide 2-N-hydroxy-pipérazine-2-N'-éthano-sulfonique
- HS** : Horse serum
- kDa** : Kilodaltons
- MARCKS** : Myristoylated Alanine-Rich C Kinase Substrate
- 2-ME** : 2-Mercaptoéthanol
- NBT** : Nitro blue tetrazolium
- PBS** : Tampon phosphate salin
- PAF** : Paraformaldéhyde
- PCR** : Amplification enzymatique en chaîne
- PKC** : Protéine Kinase C
- PKM** : Protéine Kinase M
- PMA** : Phorbol 12-myristate 13-acétate
- PMSF** : Phényl méthane sulfonyl fluoride
- SAB** : Sérum albumine bovine
- SDS** : Sodium dodécyl sulfate
- SDS-PAGE** : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS
- SVF** : Sérum de veau fœtal
- TBS** : Tampon Tris salin
- TCA** : Acide trichloroacétique
- Tris** : Tris (hydroxyméthyl) aminoéthane
- UA** : Unités arbitraires
- UF** : Unités arbitraires de fluorescence

## *SOMMAIRE*

<b>Avant propos &amp; objectifs</b>	p 1
<b>Introduction bibliographique</b>	p 3
<b><u>1<sup>ERE</sup> PARTIE : LES SYSTEMES PROTEOLYTIQUES</u></b>	p 3
<b>I – LA VOIE LYSOSOMALE</b>	p 4
<b>II – LA VOIE ATP-DEPENDANTE</b>	p 7
<b>III – LA VOIE DES CASPASES</b>	p 10
<b>IV – LES CALPAÏNES</b>	p 12
<b>IV - 1) Généralités, structure</b>	p 12
a) Les calpaïnes ubiquitaires	p 12
b) Les calpaïnes tissus-spécifiques	p 15
<b>IV - 2) Localisation dans la cellule</b>	p 17
<b>IV - 3) Régulation de l'activité des calpaïnes</b>	p 18
a) Le calcium	p 18
b) Les phospholipides et les autres activateurs	p 19
c) La calpastatine : l'inhibiteur endogène	p 20
<b>IV - 4) Les substrats des calpaïnes ubiquitaires</b>	p 22
<b>IV - 5) Fonctions physiologiques des calpaïnes et calpaïnopathies</b>	p 23
<b>IV - 6) Relations avec les caspases</b>	p 24
<b><u>2<sup>ème</sup> partie : LES CAVEOLAE</u></b>	p 26
<b>I – STRUCTURE ET FORMATION</b>	p 27
<b>II – LES CAVEOLINES</b>	p 28
<b>II - 1) La cavéoline-1</b>	p 28
<b>II - 2) La cavéoline-2</b>	p 29
<b>II - 3) La cavéoline-3</b>	p 29
<b>III – LES FONCTIONS DES CAVEOLAE</b>	p 31
<b>III - 1) Les fonctions d'endocytose</b>	p 31
<b>III - 2) La régulation de l'homéostasie du cholestérol</b>	p 31
<b>III - 3) La régulation des signaux de transduction</b>	p 32
<b>III - 4) La régulation de l'homéostasie calcique</b>	p 33
<b>IV – LOCALISATION</b>	p 34
<b>V – PATHOLOGIES</b>	p 34
<b>En aparté : les dystrophies musculaires</b>	p 34

<b><u>3<sup>ème</sup> partie : LES PROTEINES KINASES C</u></b>	p 36
<b>I – CLASSIFICATION</b>	p 36
<b>II – STRUCTURE</b>	p 37
<b>III - MECANISMES D'ACTIVATION ET DE REGULATION DES PKC<sub>s</sub> CONVENTIONNELLES</b>	p 38
<b>En aparté : un exemple d'activation, la voie de la phospholipase C</b>	p 39
<b>IV - LES PROTEINES D'ANCRAGE</b>	p 41
<b>V - LES SUBSTRATS DES PKCs</b>	p 41
<b>En aparté : la protéine MARCKS, un substrat privilégié des PKCs</b>	p 42
<b><u>4<sup>ème</sup> partie : LA MYOGENESE</u></b>	p 44
<b>I – LES FACTEURS REGULATEURS DE LA TRANSCRIPTION DES GENES</b>	p 44
<b>II – LES FACTEURS PROTEIQUES</b>	p 45
<b>III - LES ACTEURS DE LA PROTEOLYSE CALCIUM-DEPENDANTE ET DE LA DIFFERENCIATION MUSCULAIRE : ETUDES MENEES AU LABORATOIRE</b>	p 47
<b>Matériel &amp; Méthodes</b>	p 49
<b>I - CULTURES CELLULAIRES</b>	p 49
<b>I - 1) Milieux de culture</b>	p 49
<b>I - 2) Prolifération</b>	p 49
<b>I - 3) Différenciation</b>	p 50
<b>I - 4) Conservation des cellules</b>	p 50
<b>I - 5) Extraction des protéines</b>	p 50
<b>I - 6) Traitement des cultures</b>	p 51
<b>a) Calpastatine peptide (CS-peptide)</b>	p 51
<b>b) Gö 697</b>	p 51
<b>c) Ionophore à calcium A231876</b>	p 51
<b>d) Ester de phorbol (PMA)</b>	p 51
<b>e) Mévinoline</b>	p 52
<b>f) Les transfections antisens</b>	p 52
<b>I - 7) Révélation immunochimique</b>	p 53
<b>I - 8) Quantification de la fusion des myoblastes</b>	p 54
<b>II - ACTIVITE PROTEOLYTIQUE DES CALPAÏNES</b>	p 55
<b>II - 1) Quantification de la fluorescence des peptides libérés</b>	p 55
<b>II - 2) Aspect qualitatif par zymogramme</b>	p 55

<b>III – EXTRACTION ET PURIFICATION DES CAVEOLAE</b>	p 56
<b>III - 1) Préparation du lysat</b>	p 57
<b>III - 2) Préparation du gradient de saccharose</b>	p 57
<b>III - 3) Ultracentrifugation</b>	p 57
<b>IV – PURIFICATION PAR CULOTTAGE</b>	p 58
<b>V – IMMUNOPRECIPITATION MAGNETIQUE</b>	p 58
<b>VI – TRAITEMENTS</b>	p 59
<b>VI - 1) Par la m-calpaïne exogène</b>	p 59
<b>VI - 2) Par le carbonate de sodium</b>	p 59
<b>VI - 3) Par la protéinase K, le déoxycholate de sodium</b>	p 59
<b>VII - SEPARATION ELECTROPHORETIQUE DES PROTEINES SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE</b>	p 60
<b>VIII - TRANSFERT DES PROTEINES</b>	p 60
<b>IX - IMMUNOREVELATION DE PROTEINES</b>	p 61
<b>X - DOSAGE DES PROTEINES</b>	p 61
<b>X – 1) Dosage au bleu de Coomassie</b>	p 61
<b>X – 2) Dosage par la méthode de Pierce-BCA</b>	p 61
<b>XI – QUANTIFICATION DES SIGNAUX</b>	p 62
<b>XII –ANALYSE PROTEOMIQUE : GELS BI-DIMENTIONNELS</b>	p 62
<b>XII – 1) Première dimension</b>	p 62
<b>XII – 2) Seconde dimension</b>	p 63
<b>XII – 3) Fixation et coloration des gels</b>	p 63
<b>XII – 4) Analyse et quantification des spots obtenus</b>	p 63
<b>XIII –ANALYSE PROTEOMIQUE : IDENTIFICATION DES SPOTS</b>	p 63
<b>XIV - ANALYSE STATISTIQUE</b>	p 64

<b>Résultats &amp; Discussions</b>	p 65
<b>Introduction</b>	p 65
<b><u>1<sup>ère</sup> partie : Association de la m-calpaïne ainsi que deux de ses substrats (PKC<math>\alpha</math> et MARCKS) avec les caveolae</u></b>	p 67
<b>I – CARACTERISATION DES CAVEOLAE DANS LA LIGNEE C2C12</b>	p 67
I - 1) Mise en place des cavéolines au cours de la myogenèse	p 67
I - 2) Isolement des <i>caveolae</i> par ultracentrifugation	p 69
I - 3) Observation par microscopie électronique de la fraction cavéolaire	p 72
<b>II – MISE EN EVIDENCE D'UNE ASSOCIATION DE LA M-CALPAINE, DE LA PKC<math>\alpha</math> ET DE MARCKS AU NIVEAU DES CAVEOLAE</b>	p 74
II - 1) Mise en évidence du co-fractionnement par Western-blot	p 74
II - 2) Elimination des protéines cytosolubles	p 75
II - 3) Traitement <i>in vitro</i> par la saponine	p 77
II - 4) Immunoprécipitations magnétiques en présence d'un anticorps anti-cavéoline-3	p 78
II - 5) Colocalisation de la m-calpaïne et de la cavéoline-3 dans les cellules C2C12 au cours de la fusion des myoblastes	p 79
<b>III - ETUDE DE L'AGENCEMENT DES PROTEINES D'INTERET AU NIVEAU MEMBRANAIRE</b>	p 82
III - 1) Extraction des protéines extrinsèques par le carbonate de sodium	p 82
III - 2) Traitement <i>in vitro</i> par la protéinase K et le déoxycholate de sodium : détermination de l'orientation (cytosolique ou interne) des protéines par rapport à la membrane des <i>caveolae</i>	p 85
<b>IV - EFFET DE L'INHIBITION DE LA BIOSYNTHESE DU CHOLESTEROL SUR LES INTERACTIONS ENTRE CALPAÏNES ET CAVEOLAE</b>	p 88
IV - 1) Incidence sur l'intégrité des <i>caveolae</i>	p 88
IV - 2) Incidence sur les activités calpaïnes	p 89
IV - 3) Incidence sur la fusion	p 89
IV - 4) Incidence sur la localisation de la m-calpaïne au cours de la fusion des myoblastes	p 91
<b>V – IDENTIFICATION DE L'ENSEMBLE DES PROTEINES ASSOCIEES AUX CAVEOLAE : ANALYSE PROTEOMIQUE ET SPECTROMETRIE DE MASSE</b>	p 93
<b>VI – DISCUSSION</b>	p 99

**2<sup>ème</sup> partie : Protéolyse neutre calcium-dépendante au niveau des caveolae** p103

**I – LA M-CALPAINE DE LA FRACTION CAVEOLAIRE EST ACTIVABLE PAR LE CALCIUM** p 103

**II – LES PROTEINES PKC $\alpha$  ET MARCKS SONT-ELLES DES SUBSTRATS POTENTIELS DE LA m-CALPAÏNE AU NIVEAU DES CAVEOLAE ?** p 105

II - 1) La PKC $\alpha$ , contrairement à MARCKS, est un substrat de la m-calpaïne au niveau des *caveolae* p 105

a) Protéolyse calcium-dépendante au niveau des *caveolae* p 105

b) Protéolyse "in vitro" de la PKC $\alpha$  et de MARCKS au niveau des *caveolae* p 107

II - 2) La PKC $\alpha$  activée par la m-calpaïne est impliquée dans la translocation de MARCKS des *caveolae* vers le cytosol p 109

**III – MISE EN EVIDENCE D'AUTRES SUBSTRATS DE LA M-CALPAÏNE AU NIVEAU DES CAVEOLAE PAR ANALYSE PROTEOMIQUE DIFFERENTIELLE** p 111

III - 1) Inhibition de l'expression de la m-calpaïne par traitement antisens p 111

III - 2) Identification des substrats de la m-calpaïne au niveau des *caveolae* et/ou implication de la protéase dans certaines voies de régulation p 112

**IV – DISCUSSION** p 116

**Conclusion & Perspectives** p 119

**Références bibliographiques** p 126

**Publications, communications** p 145

## *Avant propos & objectifs*

L'objet de cette étude s'inscrit dans la thématique générale du laboratoire, à savoir « Protéolyse, Croissance et Développement musculaire ». La protéolyse est un processus indispensable au bon fonctionnement et à la survie de la cellule puisqu'elle joue un rôle régulateur important au niveau de nombreuses fonctions biologiques. Parmi les différentes voies protéolytiques, notre laboratoire s'intéresse plus particulièrement à l'une d'entre elles : « la protéolyse calcium-dépendante », plus communément appelée « système calpaïnes/calpastatine ».

Dans ce cadre et depuis une dizaine d'années, notre équipe s'intéresse aux relations calpaïnes/Protéine Kinase C $\alpha$  (PKC $\alpha$ ) au cours de la croissance et du développement de la cellule musculaire. Les travaux antérieurs ont en effet montré l'intervention des calpaïnes, au cours des phases précoces de la croissance musculaire, dans la transduction du signal de par leurs interactions et leurs actions sur la PKC $\alpha$  (Aragon et *al.*, 2002 ; Savart et *al.*, 1995 ) et un de ses substrats privilégiés, la protéine MARCKS (Myristoylated Alanine Rich C Kinase Substrate) (Dulong et *al.*, 2004).

Récemment, il a été évoqué une localisation de la PKC $\alpha$  au niveau d'organites encore peu connus : les « *caveolae* » (structures membranaires se trouvant au point d'ancrage avec la matrice extracellulaire, à proximité des intégrines (Petit et *al.*, 2000), mais aussi du complexe dystrophine-protéines associées) (Rybin et *al.*, 1999). Les *caveolae* sont des structures majeures intervenant dans de nombreuses régulations comme par exemple la « down-regulation » des PKC $\alpha$  (Prevostel et *al.*, 2000) et sont indispensables à la fusion des myoblastes (Galbiati et *al.*, 1999). Il faut par ailleurs souligner que ces structures vésiculaires sont impliquées dans de nombreuses pathologies où interviennent notamment les calpaïnes : diabète, maladie d'Alzheimer et dystrophies musculaires (Galbiati et *al.*, 2001).

En outre, une question majeure se pose : comment les calpaïnes peuvent-elles être actives dans la cellule alors que leurs concentrations d'activation *in vitro* (5 à 50  $\mu$ M pour la  $\mu$ -calpaïne et 0,25 à 1 mM pour la m-calpaïne) sont très supérieures à la concentration physiologique en calcium (environ 0,1  $\mu$ M) ?

Pourtant il est prouvé que les calpaïnes sont actives *in vivo* et donc certain que des régulations extérieures interviennent. Les *caveolae*, de par leurs concentrations élevées en calcium (5  $\mu$ M) par rapport au milieu intracellulaire et leurs fortes concentrations en phospholipides particuliers (connus pour diminuer la concentration en calcium nécessaire à l'activation des calpaïnes) (Coolican et *al.*, 1984 ; Morford et *al.*, 2002 ; Pontremoli et *al.*, 1985 ; Saïdo et *al.*, 1992) pourraient être un lieu d'activation privilégié de ces protéases.

**Les objectifs des travaux présentés dans ce manuscrit ont donc été de mieux comprendre l'implication des calpaïnes au cours de la myogenèse *via* leurs actions sur la PKC $\alpha$  et MARCKS et ceci plus précisément au niveau des *caveolae*.**

Le travail que j'ai entrepris avait donc pour but dans un premier temps de mettre au point une technique permettant d'isoler ces organites afin d'identifier certaines des protéines associées et notamment les acteurs de la protéolyse calcium-dépendante. L'objectif principal étant la mise en évidence de la présence des calpaïnes.

Dans un deuxième temps, afin de mieux comprendre les interactions calpaïnes/PKC $\alpha$  et MARCKS, une dérégulation au niveau de l'expression de ces protéases a été conduite. Les conséquences sur l'activité de la PKC $\alpha$  et sur son substrat MARCKS ont alors pu être étudiées. Dans le but d'élargir cette étude à d'autres substrats et ainsi identifier d'autres voies impliquant les calpaïnes au niveau des *caveolae*, une analyse protéomique de la fraction cavéolaire a été développée.

Comme nous l'avons signalé précédemment, ce travail s'intègre bien entendu dans une étude plus globale devant permettre de mieux comprendre le rôle des calpaïnes dans les phénomènes de croissance et de dégénérescence musculaires.

En introduction à ce travail, seront développées successivement quatre parties intitulées :

- les systèmes protéolytiques
- les *caveolae*
- les protéines kinases C
- la myogenèse

# *Introduction bibliographique*

## *1<sup>ère</sup> partie*

### **LES SYSTEMES PROTEOLYTIQUES**

A l'opposé de l'ADN, les ARNs et les protéines nécessitent un renouvellement permanent au sein de la cellule. Ainsi la **protéolyse** ou **dégradation des protéines cellulaires** est un processus indispensable au fonctionnement et à la survie de la cellule puisqu'elle joue un rôle régulateur important dans de nombreuses fonctions biologiques telles que :

- le renouvellement basal des protéines et l'élimination rapide de protéines anormales ou excédentaires (ceci permettant le maintien de l'homéostasie cellulaire) ;
- la production d'énergie lors des situations de carence ;
- la régulation de l'abondance tissulaire et de l'expression des protéines au cours du temps ou lors de certains processus ;
- la genèse de peptides antigéniques dans la réponse immunitaire.

On peut distinguer deux types de protéolyse permettant de remplir les fonctions précitées : la **protéolyse limitée**, ayant pour but la maturation ou l'activation de précurseurs (enzymatiques, hormonaux ou viraux) et le **catabolisme protéique**, permettant d'éliminer les protéines et de renouveler le "pool" d'acides aminés.

En fonction de leurs rôles, de leurs localisations cellulaires, de leurs états de modification post-traductionnelle ainsi que des conditions environnementales, chaque type de protéine sera plus ou moins sensible à l'un ou l'autre des systèmes protéolytiques de la cellule. Mais aucune protéine intracellulaire n'y échappe.

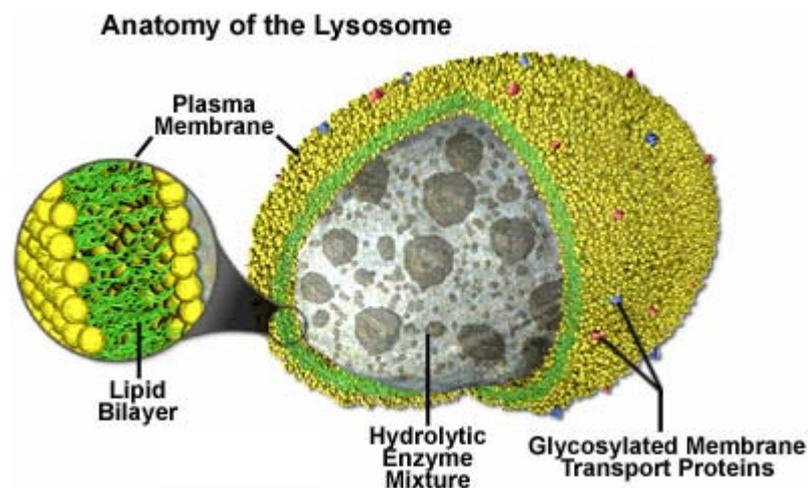
A ce jour, quatre systèmes protéolytiques intracellulaires majeurs ont été identifiés :

- la voie lysosomale ;
- la voie ATP/ubiquitine-dépendante (le protéasome) ;
- les caspases ;
- la voie calcium-dépendante (les calpaïnes).

## I – LA VOIE LYSOSOMALE

Les **lysosomes** (figure 1) sont des vésicules d'environ 0,5 µm invisibles en microscopie optique. Leur nom dérive du grec *lithos*, pierre, et *soma*, corps, en raison de l'aspect granulaire que présentent certains de leurs composants. En microscopie électronique, ils se présentent comme des organites délimités par une membrane classique, leur contenu est opaque aux électrons.

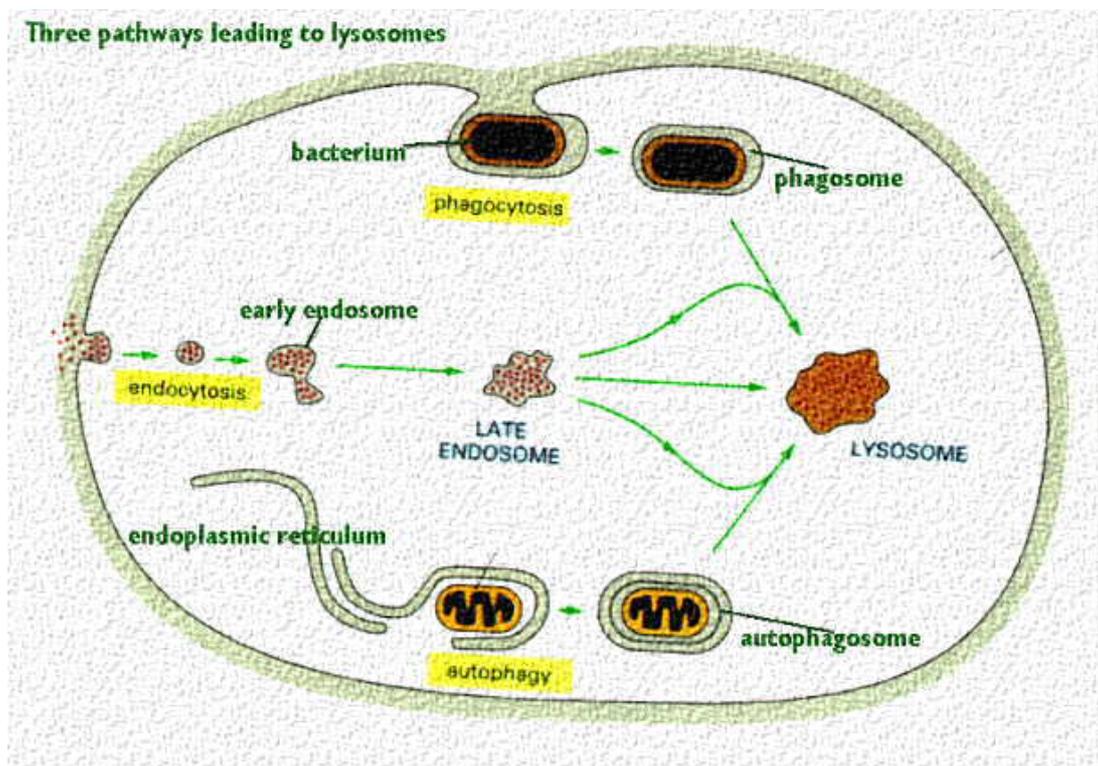
Ces vésicules cytoplasmiques monomembranaires ont un pH interne acide (4,5 à 5,5) (Holtzman, 1989) et assurent la majorité des dégradations protéiques intracellulaires. Cette acidité favorise l'action de nombreuses hydrolases (RNAses, DNAses, lipases, glycosidases et protéases). La dégradation protéique est assurée principalement par des endoprotéases appelées **cathepsines**.



*Figure 1 : Représentation schématique d'une coupe de lysosome (W. Davidson and the Florida State University, 2006)*

Les lysosomes se forment, se détachent de l'appareil de Golgi et se déplacent vers la périphérie de la cellule pour aller se fondre avec la membrane plasmique. Pendant ce parcours, ils peuvent s'unir à des vacuoles et y verser leurs contenus, de façon à former un lysosome secondaire (appelé aussi **phagosome** ou **pinosome** selon que la vacuole soit formée par **endocytose** ou par **exocytose**), ou bien se fondre directement avec la membrane plasmique, sécrétant à l'extérieur de la cellule les enzymes lysosomales. A l'intérieur des lysosomes, on trouve environ 40 enzymes hydrolytiques différentes : protéases, nucléases,

glycosidases, lipases et d'autres encore, toutes actives dans un milieu très acide. Étant donné que ces enzymes sont capables de digérer tous les types de macromolécules, y compris celles qui constituent les membranes biologiques, il est très important qu'elles restent bien séparées du cytoplasme et des autres organites de la cellule. À cette fin, la membrane des lysosomes possède des caractéristiques particulières : elle ne peut pas être attaquée par les hydrolases, elle empêche la diffusion de macromolécules et sélectionne les produits de la digestion qui doivent être libérés dans le cytoplasme pour y être réutilisés. De plus, la membrane reconnaît de façon spécifique les autres membranes auxquelles elle doit se fondre, mécanisme qui est responsable de la fonction lysosomale.



*Figure 2 : Les différentes voies conduisant à la formation des lysosomes (University of Texas)*

Les lysosomes remplissent trois fonctions fondamentales :

- **l'hétérophagie** est la digestion de matériaux provenant de l'extérieur, qu'il s'agisse de substances alimentaires ou d'organismes pathogènes. Cette fonction correspond à la dégradation des protéines extracellulaires ayant pénétrées par phagocytose, pinocytose ou endocytose (figure 2).

- l'**autophagie** (Kroemer et Jaattela, 2005), concerne la digestion de l'ensemble des protéines présentes dans le cytoplasme. Cette deuxième fonction est essentielle aussi bien dans les processus de développement, pour lesquels il est très important de recycler certains matériaux cellulaires, que pour assurer une vie saine aux cellules. Ce processus permet en effet aux cellules de se débarrasser de substances toxiques qui, en s'accumulant, pourraient l'endommager. Il existe deux types d'autophagie.

La **macro-autophagie** : une membrane du réticulum endoplasmique s'enroule autour d'une partie du cytoplasme pour former une vésicule fermée. Celle-ci fusionne avec un lysosome pour former un autophagolysosome, siège de la dégradation des protéines. (Dunn, 1990).

La **micro-autophagie** : des corps multivésiculaires d'origine endosomique s'invaginent (permettant l'internalisation des protéines ou des agrégats protéiques) puis fusionnent avec les lysosomes.

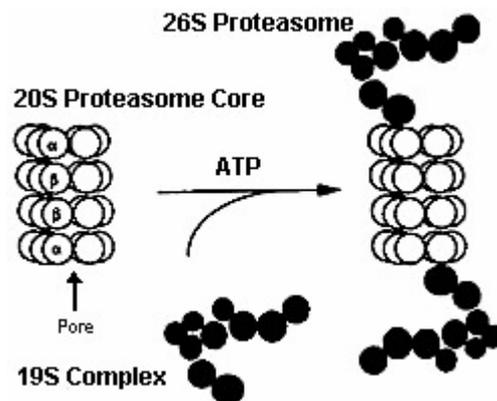
- **Le ciblage lysosomal** permet le passage direct de protéines à travers la membrane du lysosome. Un motif peptidique KFERQ, commun à l'ensemble des protéines empruntant cette voie a été identifié par Chiang et Dice (1988). En période de carences nutritionnelles ou hormonales, ce mécanisme permettrait une pénétration plus rapide des protéines et donc un catabolisme protéique accru.

Les cathepsines B, H, L et D ont été mises en évidence dans les lysosomes du muscle squelettique. La cystatine, un inhibiteur endogène spécifique de ces protéases, a également été localisé à ce niveau et ce afin de réguler l'activité de ces protéases (Abrahamson et *al.*, 2003, Barret et *al.*, 1987). Dutson et Lawrie ont mis en évidence en 1974 le rôle des cathepsines dans la protéolyse *post-mortem*. Une augmentation de l'activité des cathepsines B et L au cours de la différenciation de la cellule musculaire a été observée dans les myoblastes de souris C2C12 (Ebisui et *al.*, 1995) ainsi que dans les myoblastes de veau fœtal (Béchet et *al.*, 1991).

Ces résultats suggèrent une forte implication du système lysosomal dans la différenciation des cellules musculaires.

## II – LA VOIE ATP-DEPENDANTE

En 1942, Rudolph Schoenheimer démontre que les protéines sont continuellement dégradées en acides aminés puis sont recyclées pour la biosynthèse de nouvelles protéines. Il existe donc un équilibre entre la synthèse et la dégradation des protéines. Mais il faudra attendre les années 1970 pour isoler la protéase responsable de la dégradation des protéines cytosoliques et nucléaires des cellules eucaryotes : le **protéasome** ou **protéasome 26S**, également appelé protéase multicatalytique ou prosome. Il s'agit d'un gigantesque assemblage multiprotéique (1500 à 2500 kDa), constitué d'au moins 45 chaînes polypeptidiques, qui dégrade les protéines par un mécanisme nécessitant l'hydrolyse d'ATP (Coux *et al.*, 1996). Cet assemblage est formé de deux complexes distincts, les **protéasomes 20S** et **19S**. Il est impliqué dans la reconnaissance et la protéolyse de substrats protéiques ubiquitinylés.



*Figure 3 : Assemblage du protéasome 26S*

Le **protéasome 20S** (environ 700 kDa) est constitué de 28 sous-unités qui s'assemblent en quatre anneaux heptamériques superposés conférant au protéasome 20S une architecture en tonneau. Deux types de protéines,  $\alpha$  et  $\beta$  (masse moléculaire comprise entre 21 et 32 kDa) (Rivett *et al.*, 1993), constituent ces anneaux. Les deux anneaux centraux définissent une chambre interne qui contient les sites actifs responsables de l'hydrolyse des liaisons peptidiques (activité peptidasique). L'accès aux deux extrémités de la chambre interne se fait par un conduit formé par deux anneaux périphériques, situés de par et d'autre des anneaux centraux. Les anneaux périphériques agissent aussi comme une barrière bloquant

l'accès à la chambre interne. Les sites actifs peptidasiques sont donc confinés à l'intérieur du protéasome 20S et isolés de l'environnement cellulaire. Grâce à cette architecture, les protéines de la cellule sont protégées d'une dégradation inopportune. Dans la cellule, le protéasome 20S s'associe au **complexe 19S** (la coiffe) (Dahlmann, 2005) (figure 3).

Le **protéasome 19S** est constitué d'au moins 17 sous-unités différentes, dont 6 sous-unités ATPasiques qui forment un anneau hexamérique interagissant avec le protéasome 20S. Il est responsable de la reconnaissance des protéines destinées à être dégradées. Généralement mais pas exclusivement (Andermarcher *et al.*, 2005), les protéines destinées à la dégradation sont préalablement marquées par un signal de destruction, une chaîne de molécules d'**ubiquitine** (une protéine de 76 acides aminés) liées de façon covalente. La polyubiquitination de ces protéines destinées à la dégradation par le protéasome 26S est réalisée par un système de trois enzymes, E1 (enzyme activatrice de l'ubiquitine), E2 (enzyme de conjugaison) et E3 (ligase de l'ubiquitine) en présence d'ATP (Ciechanover *et al.*, 1994) (figure 4).

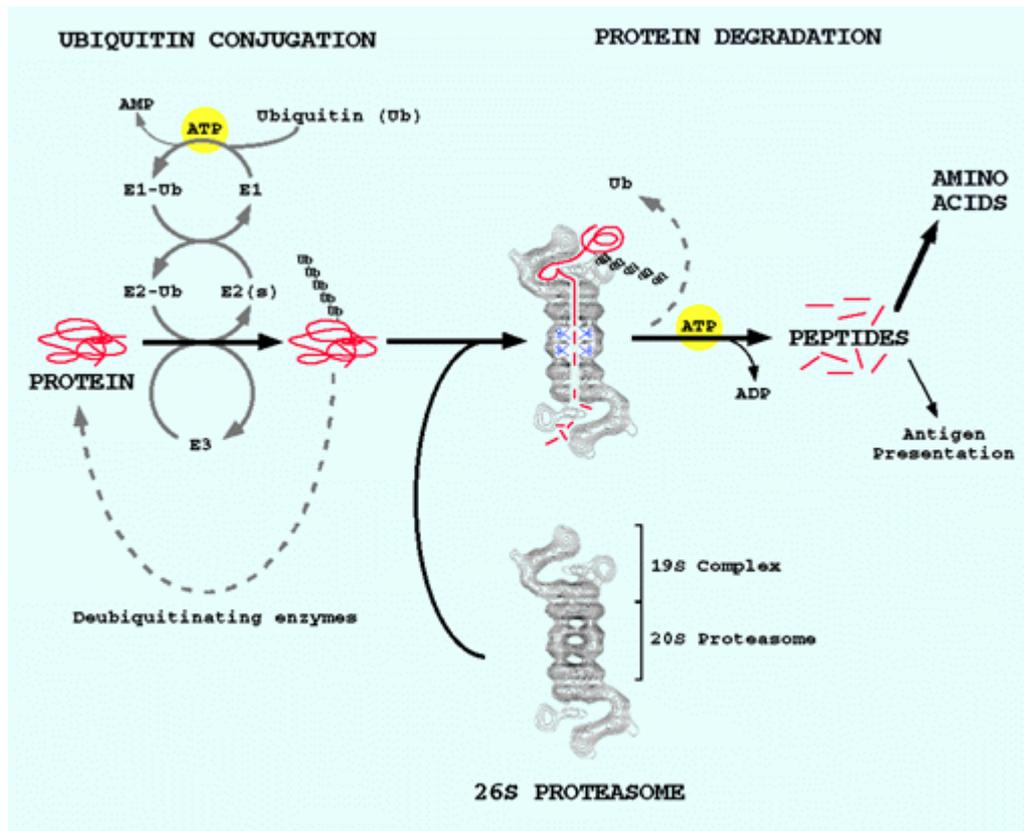
L'ubiquitinylation permet la sélectivité et assure un contrôle temporel de la dégradation des protéines.

Une autre fonction du protéasome 19S est de déplier les protéines destinées à la dégradation. En effet, les diamètres du conduit d'entrée (1 nm) et de la chambre interne (5 nm) ne permettent pas au protéasome 20S d'encapsuler des protéines natives. Les protéines doivent donc être dépliées avant de pénétrer dans la particule 20S : ce dépliement des protéines reconnues par le protéasome 19S est réalisé par les sous-unités ATPasiques grâce à l'énergie produite par l'hydrolyse de l'ATP. Ces ATPases sont également responsables de l'ouverture de la barrière qui ferme l'entrée du protéasome 20S et de l'injection des protéines dépliées dans la chambre protéolytique.

Ce système complexe intervient dans un grand nombre de processus biologiques tels que la régulation du cycle cellulaire, la régulation transcriptionnelle de certains gènes *via* l'hydrolyse de facteurs de transcription, la régulation du métabolisme d'enzymes clés, le contrôle et la qualité des protéines néosynthétisées en éliminant celles qui se révèlent anormales ou mal assemblées (Werner *et al.*, 1996),...

Par ailleurs, le protéasome est connu pour dégrader les principales protéines contractiles du muscle squelettique et joue un rôle important dans la perte musculaire (Attaix *et al.*, 2005).

On estime qu'une cellule contient en moyenne un million de protéasomes et qu'une protéine y est dégradée presque toutes les 20 secondes.



*Figure 4 : Séquences d'événements permettant la dégradation de protéines par le protéasome (Goldberg and the Harvard University, 2005)*

### III – LA VOIE DES CASPASES

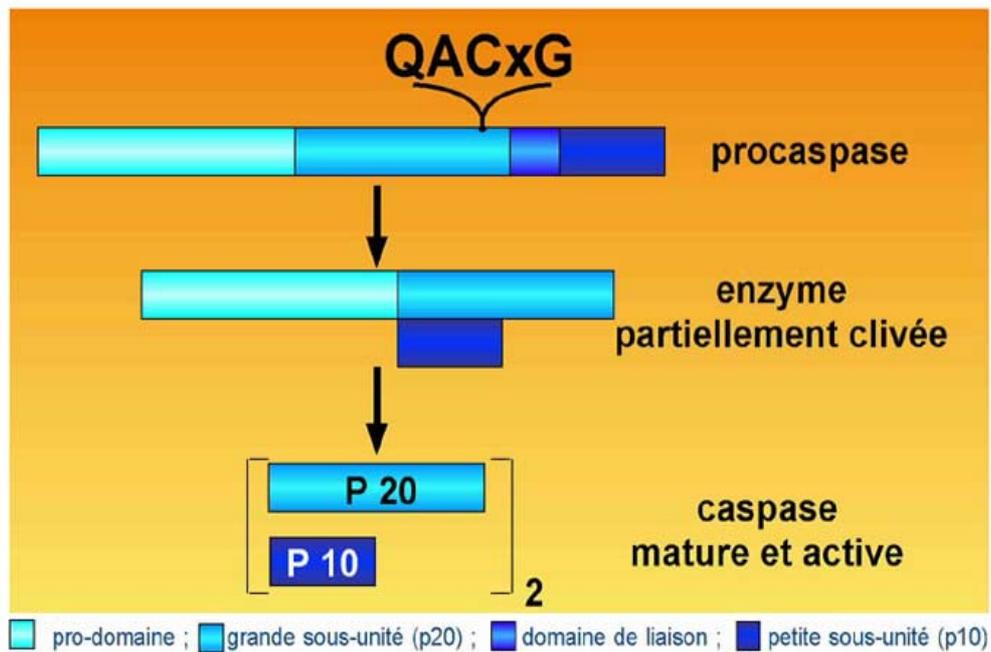
Ces protéases sont responsables de la destruction progressive de la cellule lors du processus apoptotique. Elles constituent une large famille de protéases dont l'expression et les régulations sont différentes. Le rôle des caspases est principalement exécutif, c'est-à-dire qu'elles vont s'attacher à éteindre les voies protectrices et à activer des molécules qui vont participer à la destruction cellulaire. Ces enzymes apoptogènes sont des protéases à cystéine qui possèdent une spécificité stricte de clivage de leurs substrats après un résidu d'acide aspartique.

Quinze isoformes ont pu être dénombrées à ce jour chez les mammifères (Nicholson et Thornberry, 1997).

Les caspases sont divisées en trois groupes en fonction de leurs activités et de la taille de leurs pro-domaines (Stennicke et Salvesan, 2000) :

- les caspases-1, -4, -5, -11 et -14 (médiation de la réponse inflammatoire)
- les caspases-2, -8 et -10 (initiation de l'apoptose)
- les caspases-3, -6 et -7 (caspases effectrices de l'apoptose).

Elles sont constitutivement présentes dans la cellule sous forme de précurseurs, zymogènes inactifs (pro-caspases) dont les pro-domaines N-terminaux sont de tailles variables (Cryns et Yuan, 1998). Les formes activées des caspases se composent de deux sous-unités de 20 et 10 kDa (figure 5). La conversion de la caspase de l'état de zymogène à celui d'une enzyme mature nécessite au moins deux clivages au niveau de liaison Asp-X. Ces clivages successifs ont lieu de manière séquentielle avec tout d'abord libération de la petite sous-unité du reste de la molécule suivie par la libération du prodomaine. La caspase va alors pouvoir s'assembler sous sa forme active, composée de deux grandes et de deux petites sous-unités. La structure générale ainsi obtenue est (p10/p20)<sub>2</sub> (Rotonda et *al.*, 1996).



**Figure 5 : Structure et activation des caspases. Les caspases contiennent quatre domaines principaux qui sont clivés en deux étapes afin de donner une caspase active. Adapté de Rathmell et al., 1999.**

Il existe quatre types de protéines substrats des caspases (Cryns et Yuan, 1998) :

- les protéines de structure,
- les protéines régulatrices du génome,
- les protéines impliquées dans la transduction du signal,
- les protéines directement impliquées dans le processus apoptotique.

L'activation et les fonctions des caspases sont régulées par une grande variété de molécules, parmi celles-ci, on trouve la famille des protéines Bcl-2, les calpaïnes et le  $\text{Ca}^{2+}$  (Fan et al., 2005).

## IV – LES CALPAÏNES

Découvertes en 1964 par Guroff, les calpaïnes sont des cystéines endopeptidases neutres de type papaïne. Leur activité est contrôlée par la concentration en calcium (Croall *et al.*, 1991). Elles constituent une famille de quatorze membres dont l'expression est soit ubiquitaire, soit tissu spécifique, nous choisirons ce type de distinction pour plus de clarté. Cependant, elles peuvent aussi être regroupées en deux grandes familles : les calpaïnes typiques (calpaïnes 1, 2, 3, 4, 8, 9, 11 et 12) et les calpaïnes atypiques (calpaïnes 5, 6, 7, 10 et 13) (tableau I).

Les calpaïnes atypiques diffèrent par leurs structures et notamment par la présence ou non de certains domaines importants pour l'activité de l'enzyme (comme le domaine IV ou domaine "calmoduline-like" (Dear *et al.*, 1997)).

L'activité des calpaïnes se caractérise par la protéolyse limitée de leurs substrats cibles. La protéolyse par les calpaïnes est aussi régulée physiologiquement par leur inhibiteur endogène, la calpastatine.

### IV - 1) Généralités, structure

#### A) Les calpaïnes ubiquitaires

La  $\mu$ -calpaïne, dite micro-calpaïne ou calpaïne 1, est ubiquitaire et son activation *in vitro* se fait pour des concentrations calciques de l'ordre du micromolaire (5 à 50  $\mu$ M).

La m-calpaïne, dite milli-calpaïne ou calpaïne 2, est également ubiquitaire et est activée pour des concentrations calciques de l'ordre du millimolaire (0,25 à 1 mM) (Elce *et al.*, 1997 ; Suzuki *et al.*, 1979). Il s'agit de la protéase majoritairement exprimée parmi les différentes isoformes de calpaïnes.

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

**Tableau 1 : Nomenclature internationale des calpaïnes, adoptée lors de la FASEB summer research conferences. 2001 (NI: non identifié).**

Les calpaïnes 1 et 2 sont des protéines hétérodimériques. Elles sont constituées de deux sous-unités codées par deux gènes différents : une sous-unité catalytique de 80 kDa propre à chaque enzyme et une sous-unité régulatrice de 30 kDa (commune ou différente aux m- et  $\mu$ -calpaïnes selon les auteurs (Schad et *al.* 2002)).

La sous-unité catalytique se compose de quatre domaines : **I à IV**. La sous-unité régulatrice contient quant à elle les domaines **V et VI (ou IV')** (figure 6).

Les domaines **I et V** sont impliqués dans l'autolyse de l'enzyme. La région N-terminale ne présente par ailleurs aucune homologie avec des domaines identifiés dans d'autres protéines.

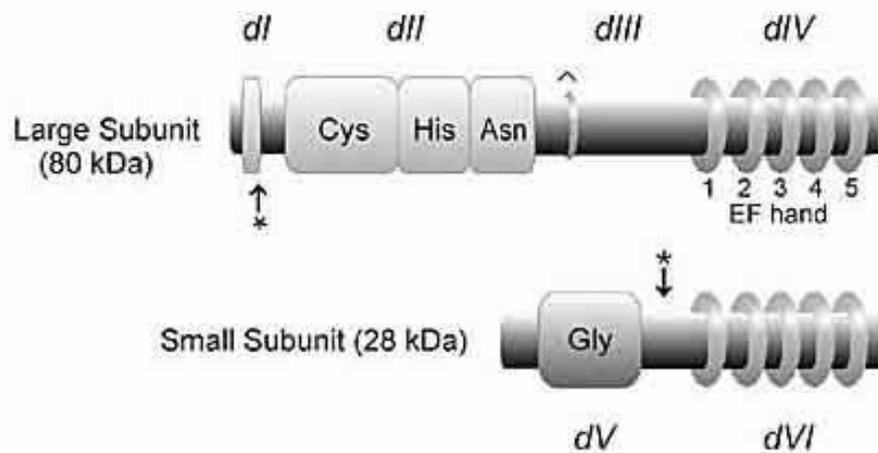
Le domaine **II** comprend le site actif de la protéase, il est structurellement similaire au domaine catalytique d'autres cystéines protéases, essentiellement autour des acides aminés formant la triade catalytique. Il peut être divisé en deux sous-domaines globulaires formant une clef catalytique (Moldoveanu et *al.*, 2004).

Le domaine **III** de la protéase serait quant à lui impliqué d'une part dans les changements conformationnels induits par le calcium. D'autre part, il contient une structure tridimensionnelle semblable à celle des domaines C2, lesquels sont impliqués dans les interactions de type protéine/protéine et le ciblage à la membrane. Par ailleurs, ce domaine contient également le site de fixation de la calpastatine.

Les domaines **IV** (ou domaine "calmoduline-like") et **VI** sont des régions constituées de 5 motifs "EF-Hands", ayant une forte affinité pour le calcium (Bartoli et *al.*, 2005). Une importance particulière doit être accordée au domaine **IV** de la grande sous-unité de la calpaïne. Cette région interagit précisément avec certaines séquences d'acides aminés appelées PEST : proline, glutamate, sérine et thréonine. Ces séquences PEST présentes chez certains substrats de la protéase réguleraient son activité.

Le domaine **V** pourrait interagir avec la membrane par les phospholipides.

Enfin, le domaine **VI** (appelé aussi **IV'** en raison de sa forte homologie avec le domaine IV) est impliqué dans la non-séquestration du calcium et dans l'hétérodimérisation de la protéine.



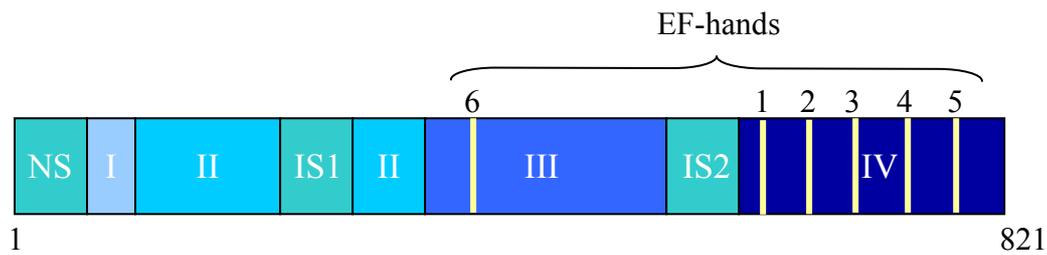
*Figure 6 : Structure des calpaïnes ubiquitaires (Sorimachi et al., 1997).*

### B) Les calpaïnes tissus-spécifiques

Parmi ces calpaïnes, on retrouve la **calpaïne 3 ou p94**, majoritairement présente au niveau du muscle squelettique (Poussard et al., 1996). En 1989, Sorimachi et al. découvrent une nouvelle séquence se distinguant des calpaïnes conventionnelles (à partir des banques d'ADN complémentaires du muscle d'homme et de rat). Le nom de p94 lui est donné en référence à sa masse moléculaire. La p94 se compose de quatre domaines pour une séquence de 821 résidus (figure 7).

Cette protéine présente de fortes homologies avec les sous-unités catalytiques des calpaïnes ubiquitaires, sa taille est cependant supérieure en raison de l'insertion de trois régions spécifiques (NS, IS1, IS2). NS et IS2 joueraient un rôle sur l'activité protéolytique tandis que IS1 serait une séquence permettant l'adressage de la protéine vers le noyau. Il est à noter que, dans le domaine III, des séquences répétitives aux fonctions inconnues ont été identifiées. Elles sont similaires à une séquence située avant la région N-terminale du domaine VI de la petite sous-unité 30 kDa. Les calpaïnes tissu-spécifiques sont toutes des monomères. Des mutations de cette protéine sont responsables d'une forme de la dystrophie des ceintures (LGMD2A).

Enfin il est à signaler, qu'après avoir été considérée comme présente uniquement dans le muscle, de récents articles font état d'une expression dans d'autres tissus comme les astrocytes ou encore le cerveau (Konig et al., 2003).



**Figure 7 : Structure de la p94 (d'après Sorimachi *et al.*, 1997).**

La **Lp82**, spécifique de l'œil a été identifiée dans le cristallin en 1998. Hormis le domaine I, la séquence en acides aminés est identique à celle de la p94. Issue du même gène que la p94, elle a subi un épissage alternatif qui conduit à l'absence des séquences d'insertion NS, IS1 et IS2. Elle fait l'objet de nombreuses études en raison de sa possible implication dans la formation de la cataracte (David *et al.*, 1993).

La **calpaïne 6**, spécifique du placenta et des muscles embryonnaires a été décrite pour la première fois en 1997 par Dear *et al.*. Cette protéine présente quelques particularités qui font d'elle une calpaïne atypique. Son domaine IV est substitué par un autre domaine de structure différente, appelé domaine T. Par ailleurs, elle ne semble pas contenir d'activité cystéine-protéase car le résidu cystéine du site actif est remplacé par un résidu lysine. De même, le résidu histidine tout aussi important dans la formation du site actif est remplacé par un résidu tyrosine.

En 1993, Sorimachi *et al.* isolent la forme **nCL-2 (calpaïne 8)** au niveau de l'estomac avant de découvrir une autre forme résultant de l'épissage alternatif du gène : **nCL-2'**. La structure de la forme nCL-2' est singulière car la totalité du domaine IV ainsi que la grande majorité du domaine III lui font défaut. Cette caractéristique suppose des interactions avec le calcium mais aussi avec la petite sous-unité, différente des calpaïnes conventionnelles.

La **calpaïne 9 (nCL-4)** spécifique du tube digestif a été isolée dans l'intestin (Lee *et al.*, 1998). Elle ne présente pas de domaines délétés ni de séquence d'insertion. Elle serait impliquée dans des cancers de l'estomac où le gène *Capn-9* est affecté au niveau de son expression (Yoshikawa *et al.*, 2000).

Chez l'homme, des techniques de clonage positionnel ont permis de montrer que le gène *Capn-10* codant pour la **calpaïne 10** pourrait être un gène de susceptibilité au diabète de type 2 (Turner et *al.*, 2005).

La **calpaïne 11** est présente dans les testicules (Dear et *al.*, 1999) alors que la **calpaïne 13** découverte par Dear et *al.* en 2001 est exprimée dans les testicules et les poumons.

#### **IV - 2) Localisation dans la cellule**

La localisation des calpaïnes demeure imprécise et controversée. Les études de localisation en immunohistologie ont montré que les calpaïnes ainsi que leur inhibiteur avaient une localisation exclusivement intracellulaire (Kumamoto *et al.*, 1992). Cependant en 1997, Dourdin et *al.* ont montré une extériorisation de la m-calpaïne lors de la fusion des myoblastes.

Bien que la localisation des  $\mu$ - et m-calpaïnes soit principalement cytosolique, celles-ci peuvent transloquer vers différents compartiments subcellulaires. La translocation se fait par la fixation d'ions calcium au niveau des EF-hand. De récentes études montrent que les complexes calpaïnes/calpastatine sont associés avec les compartiments du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi (Hood, 2004).

En 2002 et 2003 deux équipes différentes ont montré pour la première fois une localisation de la m-calpaïne au niveau des rafts membranaires dans les cellules lymphoblastoïdes T humaines (Morford et *al.*, 2002) ou des *caveolae* dans les cellules parathyroïdes (Kifor et *al.*, 2003).

*La distribution subcellulaire des calpaïnes est spécifique du type cellulaire. Leurs localisations peuvent être distinctes aussi bien d'une isoforme à l'autre qu'au cours du processus de différenciation.*

### IV - 3) Régulation de l'activité des calpaïnes ubiquitaires

#### A) Le calcium

Tout comme les caspases, les calpaïnes sont synthétisées sous forme de pro-enzymes. Comme décrit précédemment, leur activation dépend de la concentration en calcium. De manière générale, les conséquences de l'interaction des calpaïnes avec le calcium sont doubles. D'une part le calcium serait capable de se lier aux motifs EF-hand des domaines IV et VI afin de favoriser l'interaction entre les deux sous-unités. D'autre part, celui-ci modifierait la conformation du domaine II et du domaine III permettant l'activation protéolytique. Celle-ci serait soit un phénomène intermoléculaire soit un phénomène intramoléculaire, provoquant la diminution de la concentration en calcium nécessaire à l'activation de la protéine (Cottin *et al.* 2001).

Après avoir fixé le calcium, la protéine va migrer vers les structures membranaires et opérer un changement conformationnel exposant ses régions hydrophobes à la surface de la protéine, lui permettant d'interagir avec les phospholipides membranaires (figure 8). Ces interactions vont d'une part diminuer les exigences en calcium (cf. chapitre phospholipides), mais également provoquer une seconde modification structurale de la sous-unité catalytique à l'origine d'une dissociation des deux sous-unités.

Il y aurait alors :

- soit une dissociation directe des deux sous-unités permettant la libération de la forme active des calpaïnes,

- soit une auto-protéolyse des deux sous-unités puis la dissociation et la libération de la forme active des calpaïnes.

La sous-unité catalytique va ainsi pouvoir hydrolyser des substrats soit au niveau des structures membranaires, soit après libération au niveau du cytosol.

La théorie d'activation des calpaïnes au niveau des membranes a d'autant plus de succès, qu'elle fait intervenir le domaine IV' de la sous-unité 30 kDa. Ce domaine comprend une région hydrophobe (riche en glycine) susceptible de se lier aux membranes (Imajoh *et al.*, 1986). Auparavant, aucune fonction pour la petite sous-unité n'avait encore été proposée, si ce n'est une fonction stabilisatrice de la sous-unité 80 kDa.

Enfin il est à signaler que pour Garret *et al.* (1988), cette liaison aux membranes peut avoir lieu en absence de calcium.

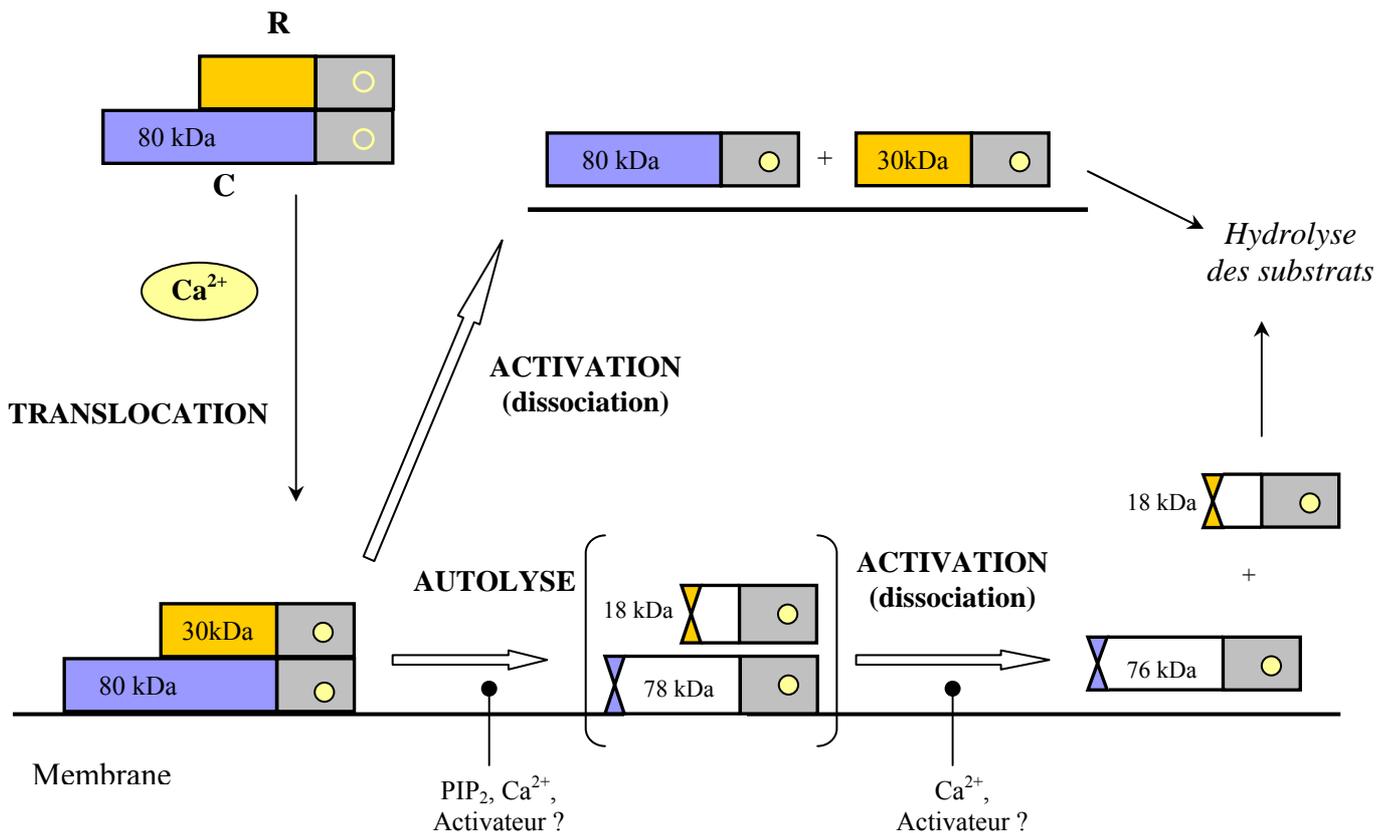


Figure 8 : Mécanisme d'activation des calpaïnes (selon Suzuki et al., 1995)

### b) Les phospholipides et les autres activateurs

Un problème majeur n'a toujours pas été résolu : la concentration intracellulaire en calcium reste insuffisante pour l'activation des calpaïnes. En effet, les concentrations nécessaires *in vitro* sont supérieures aux valeurs physiologiques (bien que celles-ci puissent atteindre une valeur de l'ordre du  $\mu\text{M}$  à proximité des canaux calciques). Augmentant le degré de complexité de la régulation de la protéine, d'autres acteurs moléculaires pourraient intervenir.

Dans la recherche d'activateurs susceptibles d'abaisser ces concentrations en calcium, Coolican et Hathaway trouvent en 1984 que **certaines phospholipides acides** tels que la **phosphatidylsérine (PS)** et le **phosphatidylinositol (PI)** sont capables **d'abaisser au moins 25 fois** la concentration en calcium nécessaire à l'auto-protéolyse des calpaïnes (Cong *et al.*, 1989) ; ces phospholipides spécifiques ne sont cependant pas les seuls phospholipides aux propriétés activatrices. Certains auteurs suggèrent même que les phospholipides

intracellulaires peuvent se lier à des protéines spécifiques et servir ainsi de cible pour les calpaïnes (Fukami *et al.*, 1992). L'intervention des phospholipides dans le mécanisme d'activation des calpaïnes comme décrit dans le chapitre « IV-3) A) Le calcium » a donné lieu à l'hypothèse d'un éventuel site d'activation des calpaïnes au niveau membranaire (Kuboki *et al.*, 1987 ; Mellgren, 1987). Pour certaines concentrations en phospholipides, certains auteurs décrivent même une activation des calpaïnes pour des valeurs en calcium proche du niveau physiologique (Chakrabarti *et al.*, 1996). *Comme nous le verrons en détail dans la deuxième partie de cette introduction, les caveolae contiennent une forte concentration en lipides particuliers et en calcium.*

Certaines données récentes suggèrent que d'autres facteurs seraient responsables de l'activation des calpaïnes. En effet, celles-ci possèdent plusieurs sites de phosphorylation qui participeraient à la régulation de leur activité. Il a été mis en évidence qu'une stimulation de cellules par l'EGF (Epidermal Growth Factor) permettant l'activation de la voie ERK/MAP kinase donnerait lieu à la **phosphorylation** de la m-calpaïne et ainsi à une augmentation de son activité protéolytique (Glading *et al.*, 2000 et 2001).

Par ailleurs, l'équipe de Pontremoli (1990) a montré la présence d'un activateur de la  $\mu$ -calpaïne dans le cerveau de bœuf. Cet activateur semble présenter une certaine homologie avec une "Heat Shock" protéine. Les auteurs ont montré que l'activateur se complexe au calcium avant d'interagir avec la calpaïne.

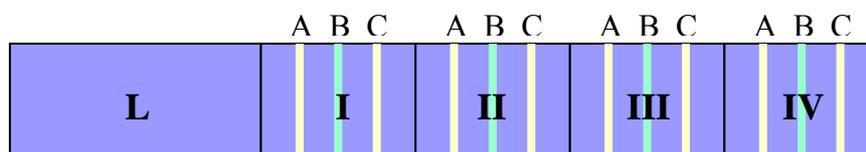
Un autre activateur "l'acyl-CoA binding protéin" (protéine de liaison à l'acyl-CoA) ou ACBP, a été mis en évidence par Melloni *et al.* (2000) dans le muscle squelettique de rat et forme avec la m-calpaïne un complexe membranaire, permettant de diviser par 50 les exigences en calcium de la m-calpaïne. Cet homodimère de 20 kDa agirait sur la liaison entre les calpaïnes et la calpastatine. D'autres protéines membranaires seraient susceptibles de participer à l'activation des calpaïnes (Inomata *et al.*, 1990 ; 1995).

*Toutes ces constatations dévoilent la complexité du mécanisme d'activation des calpaïnes.*

### c) La calpastatine : l'inhibiteur endogène

Les  $\mu$ - et m-calpaïnes sont inhibées par une protéine spécifique, appelée **calpastatine** laquelle s'intègre dans le «Système calpaïne/calpastatine». Ainsi, une molécule de calpastatine

pourrait inhiber plusieurs molécules de calpaïne, trois à douze selon certaines études (Croall *et al.*, 1991). Huit isoformes sont présentes dans l'organisme, la forme la plus fréquemment exprimée possède une masse moléculaire voisine de 110 kDa en conditions dénaturantes. Cependant le poids moléculaire oscille entre 20 kDa et 240 kDa. Cet éventail de poids moléculaires peut s'expliquer par le fait que la calpastatine semble très sensible à la dégradation protéolytique durant les étapes de purification, et qu'elle migre de façon anormale en électrophorèse (Maki *et al.*, 1990). Elle interagit avec les domaines IV et VI des deux calpaïnes ubiquitaires. La calpastatine est composée de cinq domaines dont un domaine L en position N-terminale (constitué d'environ 120 acides aminés), lié à quatre autres domaines d'environ 140 acides aminés à fort degré d'homologie contenant chacun trois régions homologues répétées (A, B, C), constituant le motif inhibiteur (figure 9). La calpastatine possède également un site de phosphorylation en position N-terminale (Averna *et al.*, 1999). En effet, il a été montré que l'inhibition de l'activité de la m-calpaïne est diminuée lorsque la calpastatine est phosphorylée. Cette phosphorylation permettrait de moduler l'affinité de la calpastatine pour la m-calpaïne et assurerait ainsi une régulation fine de l'activité de la calpaïne par la calpastatine. L'inhibition des calpaïnes par la calpastatine est un phénomène calcium-dépendant (Cottin *et al.*, 2000, 2001 ; Kapprell et Goll, 1989), les concentrations nécessaires à la fixation de la calpastatine étant par ailleurs inférieures à celles de leur activation (Wendt *et al.*, 2004). Le mode d'action de cet inhibiteur reste encore flou. En effet, selon Maki *et al.* (1990), la calpastatine entrerait en compétition avec les substrats alors que d'autres auteurs ont montré une action de type non compétitif (Cottin *et al.*, 1983). L'interaction est par ailleurs réversible après capture des ions calcium par de l'EDTA ou de l'EGTA, ceci suggérant que la calpastatine aurait pour rôle de maintenir les protéases dans un état inactif jusqu'à leurs translocations au niveau membranaire.



**Figure 9 : Représentation des domaines protéiques de la calpastatine (d'après Lee *et al.*, 1992).**

#### IV - 4) Les substrats des calpaïnes

Tout d'abord, il est essentiel de dire que le clivage d'une protéine par les calpaïnes *in vitro* ne signifie pas forcément que cette protéine soit un substrat *in vivo* (Goll et al. 2003). Les calpaïnes ubiquitaires ont une activité de protéolyse limitée conduisant à la formation de peptides de masse moléculaire importante. Elles participent davantage à la régulation de l'activité de leurs substrats (activation d'une enzyme par exemple) qu'à leur catabolisme. Il n'existe pas de différences majeures dans la spécificité de substrat entre les deux isoformes.

*In vitro*, un très large éventail de protéines a été recensé (une centaine environ). Parmi celles-ci, une majorité possède dans leur séquence en acides aminés, le motif PEST (Proline, Glutamine, Serine et Thréonine). D'après Harris et al. (1989), la proximité de ces 4 acides aminés permettrait de séquestrer les ions calcium, favorisant ainsi l'action des calpaïnes en présence de concentrations calciques physiologiques. Cependant toutes les protéines clivées par ces protéases ne possèdent pas cette séquence consensus, et de plus, une mutation de cette structure ne prévient pas leur dégradation (Molinari et al., 1995). Ainsi, il semblerait que la présence des séquences PEST ne soit ni nécessaire ni suffisante à la reconnaissance des substrats par les calpaïnes (Carillo et al., 1996). La comparaison des sites de clivage pour un certain nombre de substrats protéiques *in vitro* (Croall et Demartino, 1991) a permis de mettre en évidence une certaine homologie dans la séquence en acides aminés des protéines hydrolysées : présence d'acides aminés basiques en position P1 du site de coupure, d'acides aminés hydrophobes en position P2 et structure tridimensionnelle particulière des protéines substrats (Sakai et al., 1987).

Ces substrats peuvent être classés en quatre catégories (Goll et al. 2003) :

- **enzymes** : calcium/calmoduline-dépendante protéine kinase, EGF récepteur kinase, myosine chaîne légère kinase (MLCK), phosphatases (calcineurine, Inositol polyphosphate 4-phosphatase,...), phospholipase C, phosphorylase b kinase, pp60<sup>src</sup>, protéine kinase C (Verret et al., 1999),...

- **protéines du cytosquelette et contractiles** : actine (Villa et *al.*, 1998), adducine, calponine, caténine, desmine (Dourdin et *al.*, 1997 ; Nelson et Traub, 1983), dystrophine (Dourdin et *al.*, 1997), filamine, fodrine, gelsoline, myosine, taline, tau, titine, tropomyosine (Mazères et *al.*, 2006), troponine (Di Lisa et *al.*, 1995), tubuline (Santella et *al.*, 2000), vimentine (Robertson et *al.*, 2005), vinculine (Serrano, et Devine, 2004), MARCKS (Dulong et *al.*), 2004...

- **protéines membranaires** : A-CAM (Sato et *al.*), cadhérine, cavéoline 3 (Moyen et *al.*, 2004), protéine G<sub>s</sub>α, EGFR, PDGFR, sous-unité β3 des intégrines,...

- **autres** : cytokines, facteurs de transcription comme myogénine, p53, IκBα, AP1, c-Fos, c-Jun, c-Myc, protéines nucléaires (Mellgren et *al.*, 1991), pro-caspases,...

## V - 5) Fonctions physiologiques des calpaïnes et calpaïnopathies

Les calpaïnes, parce que ce sont des protéases, sont impliquées dans les phénomènes généraux de la protéolyse : elles vont réguler l'activation de diverses activités enzymatiques par maturation, inactivation ou activation de précurseurs.

Elles interviennent dans la **prolifération** et la **différenciation cellulaires** (Cottin et *al.*, 1994), dans le **développement embryonnaire** (Emori et Saigo, 1994), **l'adhésion cellulaire** (Carragher et *al.*, 2001). Elles auraient pour fonction principale le **remodelage du cytosquelette lors de la fusion et la migration des cellules myoblastiques** (Mazeres et *al.*, 2006).

Leurs actions ne se limitent pas seulement aux protéines de structure mais elles sont également impliquées dans la régulation de l'activité de certaines kinases et phosphatases, ou encore des protéines associées à la membrane ayant un rôle dans la **signalisation cellulaire** comme les récepteurs à l'insuline, certains canaux ioniques ou encore les intégrines.

Un autre rôle leur est attribué dans **le cycle cellulaire** : elles sont responsables de la dégradation de plusieurs facteurs participant au fonctionnement du cycle cellulaire (p53, cycline D1). De ce fait et de par leurs relations avec les caspases (confère chapitre 6 « Relations avec les caspases »), les calpaïnes interviendraient dans les phénomènes **d'apoptose**.

Il n'est donc pas étonnant qu'elles soient impliquées dans de nombreuses pathologies associées à diverses dérégulations (concentration calcique anormale, rupture de l'équilibre calpaïne/calpastatine, traumatisme,...). C'est ainsi que leurs rôles ont été mis en évidence dans :

- la **maladie d'Alzheimer** où l'intervention des calpaïnes aurait été mise en évidence au niveau moléculaire (Maruyama et *al.*, 2000), en effet cette maladie se caractérise par l'agrégation des substrats des calpaïnes conduisant à l'apoptose de la cellule ;

- les traumatismes cérébraux où les calpaïnes, en particulier la  $\mu$ -calpaïne, entraîneraient une **dégénérescence neuronale** (Kampfl et *al.*, 1996) ;

- les **dystrophies musculaires** où l'on note une forte augmentation de l'activité protéolytique des calpaïnes (nécrose) (Hussain et *al.*, 1998) ; et plus particulièrement dans la **myopathie des ceintures** où une mutation du gène codant pour la calpaïne 3 entraîne une perte de son activité protéolytique. Ces dysfonctionnement conduisent au développement d'une myopathie affectant les muscles du bassin et des épaules.

- la **cataracte** où la m-calpaïne hydrolyse des protéines de structure du cristallin (Andersson et *al.*, 1994) ;

- les **ischémies** cérébrales (Neumar et *al.*, 1996) et cardiaques : ces pathologies sont associées à une augmentation de calcium intracellulaire induisant une importante activation des calpaïnes. Cette augmentation continue va alors engendrer une protéolyse accélérée de nombreux composants cellulaires (kinases, protéines membranaires et cytosquelettiques) ;

- d'autres pathologies comme les **maladies auto-immunes**, le **diabète de type 2** dont les mutations du gène codant pour la calpaïne 10 sont à l'origine, l'**inflammation**, la **progression tumorale** (Baud et *al.*, 2003) ont été recensées.

#### **IV - 6) Relations avec les caspases**

Les calpaïnes, interviennent dans la régulation de l'expression des caspases (Fan et *al.*, 2005). Des travaux récents ont permis de mettre en évidence la protéolyse des pro-caspases en

caspases par les calpaïnes conduisant soit à leurs activations, soit à leurs inactivations (Blomgren et *al.*, 2001).

Les deux systèmes protéolytiques interagiraient de façon étroite notamment en protéolysant des éléments clefs de l'apoptose (Pike et *al.*, 1998). Ceci aboutirait à l'amplification du processus apoptotique et contribuerait à le rendre irréversible. Ces deux familles d'enzymes possèdent plusieurs substrats communs, chacune exerçant son action protéolytique au niveau de sites de clivage différents.

Un autre lien entre ces deux familles de protéases repose sur la calpastatine. En effet, lors de la fusion de myoblastes de rat de la lignée L8, la caspase 1 induirait la dégradation de la calpastatine. La protéolyse caspase-dépendante de la calpastatine aurait pour effet de libérer la calpaïne sous une forme potentiellement activable par le calcium suggérant ainsi une interaction forte entre les caspases et le système calcium-dépendant lors de la différenciation de la cellule musculaire (Barnoy et Kosower, 2003).

## 2<sup>ème</sup> partie

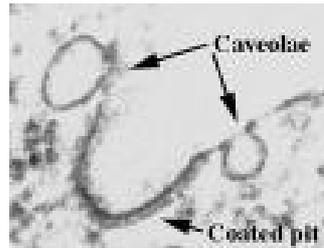
### LES CAVEOLAE

Les *caveolae* (figure 10) sont des invaginations vésiculaires de la membrane plasmique allant de 50 à 150 nm de diamètre (Krajewska et Maslowska, 2004 ; Razani et Lisanti, 2001 ; Smart et al., 1999 ; van Deurs et al., 2002) caractérisées par une faible densité de flottation. Elles ont été décrites pour la première fois il y a environ 50 ans par Palade, et ne présentaient alors un intérêt que pour la biologie structurale. Depuis un peu plus d'une décennie, les recherches effectuées ont permis de montrer que ces vésicules étaient de véritables organelles avec un rôle important dans de nombreuses fonctions cellulaires.

Cependant les *caveolae* restent assez mystérieuses et n'ont pas livré tous leurs secrets. En effet, même si leurs fonctions commencent à être mieux connues, une grande confusion règne dans la communauté scientifique sur leurs appartenances aux radeaux lipidiques, communément appelés "rafts".

Certains auteurs, minoritaires à l'heure actuelle, considèrent les *caveolae* et les "rafts" comme deux entités distinctes, ainsi Chamberlain et al. (2001) parlent des "rafts" comme des micro-domaines non cavéolaires « Lipid rafts are non caveolar microdomains that are enriched in cholesterol and glycosphingolipids... ».

"A *contrario*", une majorité d'auteurs lorsqu'ils mentionnent les *caveolae* parle de rafts spécialisés « *Caveolae* are specialized lipid rafts... ». Nous soutiendrons plutôt cette seconde hypothèse. Ainsi les dernières recherches ont montré que les *caveolae* étaient biochimiquement indistinguables des rafts et étaient similairement enrichis en cholestérol et sphingolipides (Simons and Toomre, 2000). La réelle différence entre ces deux entités est l'invagination, et la présence de vésicules dans le cas des *caveolae*. Cette différence est due à la présence d'une protéine présente dans les *caveolae* et absente dans les rafts : la cavéoline. Enfin, les publications récentes font état de vésicules beaucoup plus petites que les *caveolae* (taille inférieure à 15 nm) (Kusumi et Suzuki, 2006).



**Figure 10 : Caveolae observées dans les ostéoblastes. Microscopie électronique (grossissement : 50 000 X) (d'après Mc Hugh et al., 2000)**

## I – STRUCTURE ET FORMATION

Les cavéolines sont le principal composant protéique des membranes des *caveolae* (Simmons et Ikonen, 1997). Leurs familles sont composées de trois protéines distinctes, les cavéoline -1, -2 et -3. (cav -1,-2,-3) (Glenney et al., 1992 ; Rothberg et al., 1992, Scherer et al., 1996, Tang et al., 1996).

Les cavéolines ont de nombreuses propriétés qui sont indispensables à la formation des vésicules, elles permettent l'invagination de ces structures. En outre, la formation des *caveolae* nécessite un environnement lipidique particulier (cholestérol, glycosphingolipides,...). Ainsi la cavéoline présente une très haute affinité pour le cholestérol et les sphingolipides (Fra et al., 1995 ; Murata et al., 1995). Cette propriété est due à trois modifications C-terminales de la protéine (palmitoylations), celles-ci permettant de stabiliser et d'associer la cavéoline aux *caveolae* (Dietzen et al. 1995, Monier et al., 1996).

La formation se ferait dans le réticulum endoplasmique et dans l'appareil de Golgi : un oligomère de cavéoline interagirait avec un autre et ainsi de suite pour former un « cluster » de cavéolines (14 à 16 oligomères), eux même engendrant de méga-complexes par interactions entre les oligomères (Monier et al., 1995 ; Sargiacomo et al., 1995). Le début de la formation se ferait dans le réticulum endoplasmique où les méga-complexes augmenteraient de taille durant le transport *via* l'appareil de Golgi. L'ensemble de ces données, à savoir la haute affinité pour ces lipides particuliers, l'oligomérisation et les interactions entre ces oligomères forment un environnement particulier générant ces vésicules. Elles migreraient alors vers la surface cellulaire.

Il est à noter que les cavéolines sont reliées par leurs extrémités N-terminales à la filamine, ceci permettant l'ancrage des *caveolae* au cytosquelette d'actine (van Deurs et *al.*, 2002).

Par ailleurs, l'expression de la cavéoline-1 ou bien celle de la cavéoline-3 est suffisante à la formation des *caveolae* ; cette expression est indispensable pour la différenciation des cellules musculaires.

## II – LES CAVEOLINES

### II - 1) La cavéoline-1

La cavéoline-1 est une protéine de 21 kDa ancrée dans la membrane des *caveolae*. Elle est fortement représentée dans les cellules épithéliales, endothéliales, les adipocytes, les fibroblastes et les cellules des muscles lisses. On trouve deux isoformes : la cavéoline-1 $\alpha$  de 24 kDa (178 acides aminés) et la cavéoline-1 $\beta$  de 21 kDa (147 acide aminés).

Dans les vésicules, celle-ci prend une structure en épingle à cheveux avec les domaines N et C terminaux orientés côté cytoplasmique. Structuellement, la cavéoline-1 peut être divisée en trois domaines distincts (figure 11) :

- le domaine cytosolique N-terminal (hydrophile) : acides aminés 1 à 101
- le domaine central hydrophobe (Trans Membrane Domain : TMD) : acides aminés 102 à 134
- le domaine cytosolique C-terminal (hydrophile) : acides aminés 135 à 178

La région N-terminale contient le « Caveolin Scaffolding Domain » ou CSD, cette séquence de 20 acides aminés est essentielle pour la formation des oligomères (14-16 molécules avec une masse moléculaire comprise entre 350 et 450 kDa). Elle intervient également dans la transduction du signal puisqu'elle est responsable de la majorité des interactions avec de nombreuses autres protéines. Le CSD joue aussi un rôle dans l'attachement à la membrane.

Les acides-aminés 66 à 70 sont nécessaires pour le passage du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi. Les acides aminés 71 à 80 contrôlent l'incorporation des oligomères dans le Golgi alors que les acides aminés 91 à 100 permettent leurs sorties.

Par ailleurs, on trouve une tyrosine en position 14, laquelle est un site majeur de phosphorylation par les kinases de la famille Src. Ces modifications sont nécessaires à l'agrégation et à la fusion des *caveolae*.

Le "Trans Membrane Domain" (TMD) n'est pas nécessaire pour l'attachement à la membrane de la cavéoline-1 mais joue un rôle dans les interactions avec la cavéoline-2 et d'autres protéines.

Le domaine C-terminal intervient pour sa part au niveau de l'attachement à la membrane et des interactions protéine/protéine. On trouve ainsi trois palmitoylations sur les cystéines en positions 133, 143 et 156 (Krajewska et Maslowska, 2004) permettant l'ancrage à la membrane. Deux de ces résidus seraient par ailleurs impliqués dans la liaison et le transport du cholestérol.

Les acides-aminés 135 à 154 permettent l'expulsion du Golgi.

Dans les cellules où elles sont co-exprimées, les cavéolines-1 et -2 forment un hétéro-complexe de poids moléculaire compris entre 200 et 600 kDa.

## **II - 2) La cavéoline-2**

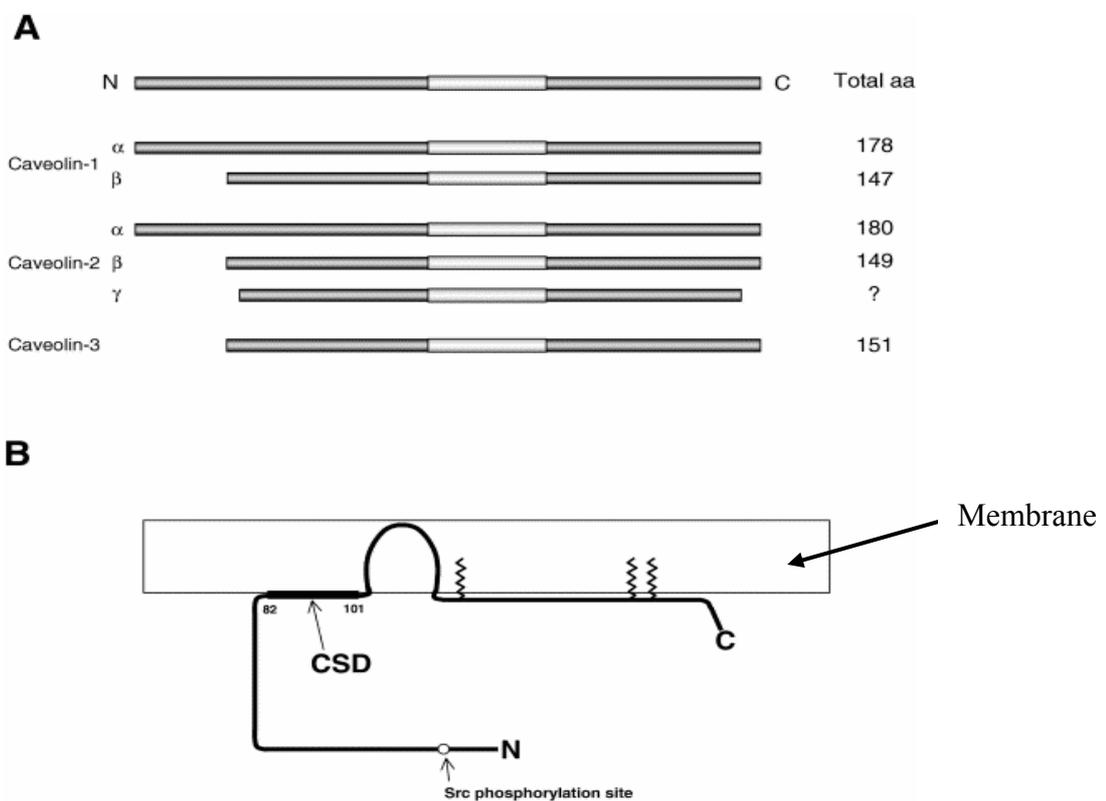
La cavéoline-2 présente la séquence primaire la plus variable. On trouve trois isoformes :  $2\alpha$  (180 résidus),  $2\beta$  (149 résidus) et  $2\gamma$  (la plus courte et la moins abondante). Elle est à 58 % similaire à la cavéoline-1. Elle existe principalement sous la forme de monomère ou d'homodimère. Elle peut s'hétérodimériser avec la cavéoline-1 mais pas avec la cavéoline-3. On connaît peu de chose sur sa fonction, il est probable que cette protéine agisse comme protéine accessoire de la cavéoline-1 (Krajewska et Maslowska, 2004 ; Razani et Lisanti, 2001).

## **II - 3) La cavéoline-3**

La cavéoline-3 comporte 151 acides aminés et est très proche de la cavéoline-1 au niveau de la séquence primaire (85 % de similitude). Le domaine N-terminal est plus court de

27 résidus par rapport à la cavéoline-1 $\alpha$ . Les cavéolines -1 et -3 contiennent un domaine comportant plusieurs résidus tryptophanes hautement conservés entre les espèces : ce domaine serait responsable des interactions protéine/protéine. Celui-ci est curieusement tronqué dans le cas de la cavéoline-2.

La cavéoline-3 s'oligomérise (14-16 oligomères) (Quest et *al.*, 2001 ; Razani et Lisanti, 2001 ; Song et *al.*, 1997) aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Krajewska et Maslowska, 2004).



**Figure 11 : A. Représentation schématique des diverses cavéolines**  
**B. Représentation schématique d'une cavéoline et du CSD (d'après Couet et**  
*al.*, 2001)

### III – LES FONCTIONS DES *CAVEOLAE*

#### III - 1) Les fonctions d'endocytose

Le fait que les *caveolae* puissent exister aussi bien sous la forme d'invaginations de la membrane plasmique, de vésicules fermées que d'agrégats de plusieurs vésicules conduit tout naturellement les *caveolae* vers les fonctions d'endocytose.

Ainsi leurs premières fonctions seraient de permettre le mouvement de molécules d'une face cellulaire à l'autre, c'est la « transcytose » (Anderson et *al.*, 1992 ; Predescu et *al.*, 1997 ; 1998 ; Schnitzer et *al.*, 1994). A titre d'exemple, la phosphatase alcaline ou encore l'albumine transitent par cette voie. Dans certains types cellulaires, les virus (Simian Virus 40) ou les bactéries (*E. coli*) peuvent être transférés dans le compartiment intracellulaire *via* les *caveolae* (Shin et *al.*, 2000).

Mais elles ont également la fonction de « potocytose » (internalisation de petites molécules puis fusion avec l'endosome) (Matveev et *al.*, 2001). La formation vésiculaire résultant de la fusion de *caveolae* avec les endosomes est appelée « cavéosome ».

#### III - 2) La régulation de l'homéostasie du cholestérol

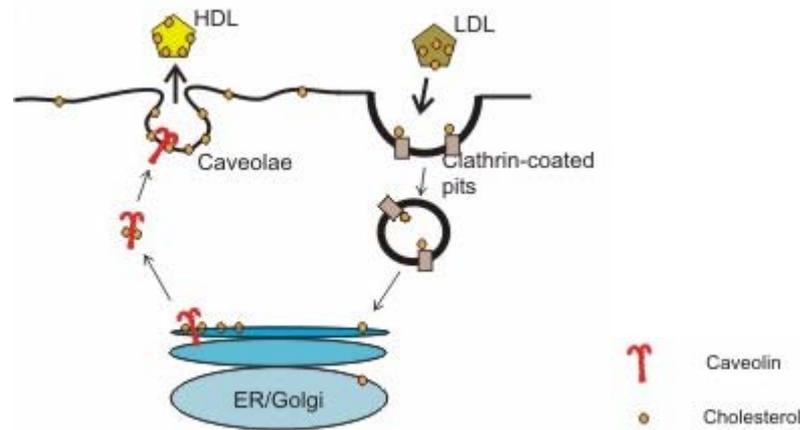
Plusieurs arguments viennent étayer le fait que les *caveolae* sont impliquées dans la régulation du cholestérol :

- Les *caveolae* sont très fortement enrichies en cholestérol en comparaison avec la membrane plasmique classique.
- La cavéoline lie le cholestérol avec une très forte affinité (une molécule de cholestérol pour une molécule de cavéoline) (Thiele et *al.*, 2000).
- Un traitement pharmacologique (lovastatine ou mévinoline) entraînant un arrêt ou une diminution de la biosynthèse du cholestérol engendre une diminution majeure du nombre de *caveolae* (Hailstones et *al.*, 1998).

Le cholestérol cellulaire provient de deux sources : une production cellulaire mais aussi une entrée dans la cellule *via* une lipoprotéine (LDL : Low Density Lipoprotein) et des vésicules à clathrine (Fielding et *al.*, 1996, 1997 ; Simons et Ikonen, 2000). La cavéoline joue le rôle d'escorte pour le cholestérol en l'accompagnant du réticulum endoplasmique vers les *caveolae*. Celui-ci est alors utilisé comme source de cholestérol pour la membrane plasmique,

pour les *caveolae* ou est pris en charge par une deuxième catégorie de lipoprotéine (HDL : High Density Lipoprotein) (figure 12).

Tous ces éléments tendent donc à prouver que les *caveolae* interviennent comme une véritable plate-forme de régulation du cholestérol cellulaire.



**Figure 12 : Caveolae et cholestérol**

### III - 3) La régulation des signaux de transduction

Les cavéolines, hormis leurs rôles structuraux dans la formation des *caveolae*, agissent directement sur d'autres protéines en intervenant dans leurs régulations. Ces interactions se font donc très majoritairement par le « Caveolin Scaffolding Domain » (CSD) et confèrent à cette molécule un rôle central dans la régulation des signaux cellulaires. D'une manière générale, le rôle de ce domaine est de séquestrer ou d'inhiber certains acteurs de la signalisation cellulaire.

Ainsi les cavéolines agissent sur diverses protéines comme les protéines G (Li *et al.*, 1995), les Nitric Oxydes Synthases (Prabhakar *et al.*, 2000) et les PKCs en les inhibant (en particulier la PKC $\alpha$ ) (Oka *et al.*, 1997). D'autres protéines comme les protéines H-Ras, les tyrosines kinases de la famille Src, le récepteur à l'EGF peuvent se lier au domaine CSD.

Il a été montré que les *caveolae* intervenaient dans la modulation des signaux faisant intervenir le récepteur à l'EGF : ainsi celui-ci ne serait pas présent de façon constitutive dans ces vésicules, mais sa présence ou son absence serait soumise à une forte régulation hormonale (Schlegel et Lisanti, 2001). Il en est de même pour les récepteurs à la tyrosine kinase, leurs associations correspondent à un processus d'équilibre qui peut-être médié dans un sens ou dans l'autre en fonction des conditions externes.

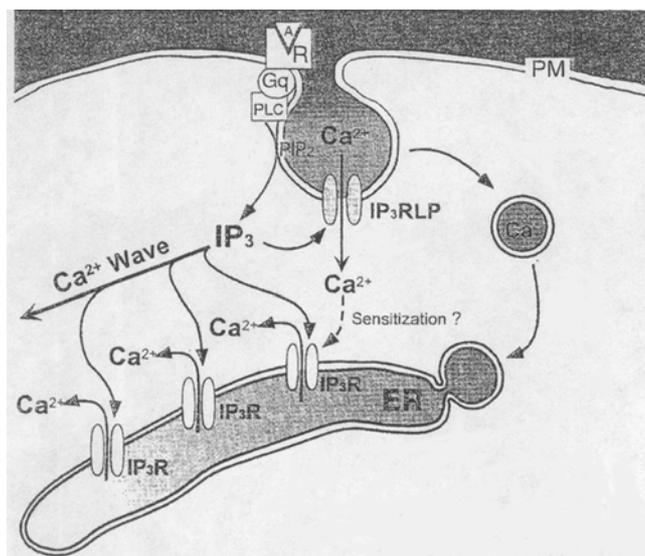
Ainsi plusieurs molécules impliquées dans la transduction du signal ont été identifiées dans les *caveolae*, suggérant que ces structures puissent servir à compartimenter, moduler et intégrer les signaux moléculaires à la surface de la cellule.

Les *caveolae* apparaissent donc comme d'importantes structures de transduction de par leurs capacités à concentrer un grand nombre de molécules de signalisation dans une petite localisation cellulaire (Couet et *al.*, 2001), raison pour laquelle le nom alternatif de « signalosomes » leur a été donné.

### III - 4) La régulation de l'homéostasie calcique

Il est fort probable que les *caveolae* soient un lieu de régulation de l'homéostasie calcique ainsi que des signaux de transduction calcium-dépendant (Isshiki et *al.*, 1999) (figure 13). Ainsi, ces microdomaines seraient impliqués dans la translocation du  $\text{Ca}^{2+}$  vers le milieu intracellulaire lors du cycle contraction/relaxation dans le muscle (Popescu et *al.*, 1974). La présence de récepteurs à l' $\text{IP}_3$  dans les *caveolae* confirmerait cette hypothèse : la forte concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  dans ces vésicules permettrait de relarguer des quantités précises et importantes de  $\text{Ca}^{2+}$  en réponse à un stimulus spécifique.

Par ailleurs, il a été soulevé l'hypothèse selon laquelle les *caveolae* fusionneraient avec le réticulum endoplasmique pour le recharger en  $\text{Ca}^{2+}$ . Tous ces éléments tendent à prouver la forte corrélation entre *caveolae* et signaux calcium dépendant.



**Figure 13 : Caveolae et signalisation calcique (d'après Isshiki et *al.*, 1999)**

## IV - LOCALISATION

Les cavéolines sont exprimées dans des tissus où les *caveolae* sont fortement représentées. Les cavéolines-1 et -2 sont co-exprimées dans de nombreuses cellules et notamment avec une forte présence dans les cellules endothéliales, les adipocytes et les pneumocytes de type 1 mais elles sont également très présentes dans les fibroblastes et les cellules musculaires.

Par contre, la cavéoline-3 est exclusivement et fortement exprimée dans les muscles squelettiques et cardiaques différenciés (Campbell et *al.*, 2001 ; Scherer et *al.*, 1994, 1996 ; Tang et *al.*, 1996). La cavéoline-3 est la protéine majeure (parmi les cavéolines) dans ces muscles différenciés. En outre, il a été récemment montré une expression de la cavéoline-3 dans les astrocytes et les chondrocytes (Couet et *al.*, 2000).

Dans le tissu musculaire, les *caveolae* se trouvent dans le sarcolemme au niveau du disque Z (tubule T) où elles sont associées avec le complexe DGC (Dystrophin-Glycoprotein Complex).

## V - PATHOLOGIES

Les *caveolae* sont impliqués dans un grand nombre de maladies comme les dystrophies musculaires, le cancer, le diabète, l'athérosclérose, et la maladie d'Alzheimer (Campbell et *al.*, 2001).

### *En aparté : les dystrophies musculaires*

La cavéoline-3 est présente dans tous les types de cellules musculaires et est impliquée dans le développement de certaines dystrophies musculaires chez l'homme : la **LGMD1C (Limb-Girdle Muscular Dystrophy de type 1C)** est due à une sous-expression protéique tandis que la **DMD (Duchenne Muscular Dystrophy)** serait consécutive à une sur-régulation de cette protéine (Galbiati et *al.*, 2001).

La **DMD** est la plus répandue et la plus sévère des dystrophies musculaires : elle affecte le muscle pelvien ainsi que le haut des bras et des jambes. Les personnes atteintes survivent rarement au-delà de 30 ans. Cette maladie génétique affecte uniquement les hommes et est due à une absence ou une production de dystrophine mutante. La dystrophine est une glycoprotéine faisant partie du complexe DGC (Dystrophin-Glycoprotéin Complex) ; elle traverse le sarcolemme formant un lien entre l'actine cytoplasmique et la matrice extracellulaire. Les *caveolae* chez les patients atteints de cette maladie sont beaucoup plus nombreuses mais leurs tailles sont plus réduites. Comme nous l'avons dit dans le paragraphe précédent, la cavéoline-3 est associée au complexe DGC. Son rôle serait alors de réguler l'interaction entre la dystrophine et la  $\beta$ -dystroglycane (un autre composant du DGC). Une sur-expression de la cavéoline-3 au niveau du sarcolemme a été constatée. La résultante de cette sur-expression serait une "down-regulation" de  $\beta$ -dystroglycane et de dystrophine (Galbiati et *al.*, 2000).

La dystrophie des ceintures **LGMD1C** est quant à elle caractérisée par deux mutations spécifiques au niveau du gène humain de la cavéoline-3 (3p25). Celles-ci engendrent des modifications d'acides aminés de la protéine synthétisée au niveau du CSD et de la région transmembranaire. Ces mutations génèrent un agrégat instable de cavéoline-3, lequel est alors dégradé par le protéasome (Razani et Lisanti, 2001). La conséquence est une diminution de plus de 90 % de l'expression protéique de la cavéoline-3 (Volonte et *al.*, 2003). Les patients atteints de cette maladie souffrent alors de nombreux désordres musculaires : hypertrophies musculaires, crampes, faiblesses musculaires,....

*3<sup>ème</sup> partie***LES PROTEINES KINASES C**

Les **Protéines Kinases C ou PKCs** représentent une famille de sérine thréonine kinases. Elles sont formées d'une chaîne polypeptidique de 80 kDa et assurent le transfert d'un phosphate de l'ATP vers les résidus séryls et thréonyls des protéines cibles. Elles sont considérées comme des médiateurs classiques de nombreux agonistes extracellulaires qui produisent divers seconds messagers lipidiques (Kishimoto A. et *al.*, 1980). Elles sont de ce fait impliquées dans de nombreux processus biologiques comme les phénomènes d'apoptose, l'activation des plaquettes, la conformation de l'actine dans le cytosquelette, la modulation de l'activité des canaux ioniques, la prolifération cellulaire (Toker A., 1998), la voie de translocation des petites protéines G telles que RhoA (Meacci et *al.*, 2000).

**I - CLASSIFICATION**

Les PKCs appartiennent à une famille multigénique dont on connaît à l'heure actuelle 12 isoenzymes ( $\alpha$ ,  $\beta_I$ ,  $\beta_{II}$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\varepsilon$ ,  $\theta$ ,  $\eta$ ,  $\mu$ ,  $\zeta$  et  $\tau/\lambda$ ).

Elles sont classées en 3 groupes d'après leurs structures et leurs propriétés enzymatiques (Jaken et *al.*, 2000) :

- le premier groupe (PKCs conventionnelles) constitué par les isoformes  $\alpha$ ,  $\beta_I$ ,  $\beta_{II}$ ,  $\gamma$  nécessite pour l'activité kinase, le  $Ca^{2+}$ , le diacylglycérol (DAG) et certains phospholipides tel que la phosphatidylsérine (PS) ;

- le deuxième groupe (PKCs nouvelles) composé des isoformes  $\delta$ ,  $\varepsilon$ ,  $\theta$  et  $\eta$  requiert le DAG et des phospholipides mais ne nécessite pas le  $Ca^{2+}$  ;

- le dernier groupe (PKCs atypiques) regroupe pour sa part les isoformes  $\xi$ ,  $\tau/\lambda$ ,  $\mu$  et requiert seulement des phospholipides.

Enfin, il convient d'ajouter les kinases rattachées aux PKCs comme l'isoforme  $\mu$ , plus récemment découverte et qui n'est pas encore définitivement classée (Johannes F.J. et *al.*, 1994).

Beaucoup d'entre-elles sont exprimées ubiquitairement (PKC  $\alpha, \beta_I, \beta_{II}, \xi$ ) alors que d'autres ont une expression tissu spécifique.

**Tableau II : Isoformes de la PKC dans les tissus de mammifères (thèse Xavier Siomboing 04/2003)**

groupe	sous type	nombre d'aa	activateur	localisation
cPKC	$\alpha$	672	$Ca^{2+}$ , DAG, PS, AGi, lysoPC	Ubiquitaire
	$\beta_I$	671	$Ca^{2+}$ , DAG, PS, AGi, lysoPC	Quelques tissus
	$\beta_{II}$	671	$Ca^{2+}$ , DAG, PS, AGi, lysoPC	Nombreux tissus
	$\gamma$	697	$Ca^{2+}$ , DAG, PS, AGi, lysoPC	Cerveau
nPKC	$\delta$	673	DAG, PS	Ubiquitaire
	$\epsilon$	737	DAG, PS, AGi, PIP <sub>3</sub>	cerveau et autres
	$\eta$	683	DAG, PS, PIP <sub>3</sub> , sulfate de cholestérol	peau, poumons, cœur
	$\theta$	707	inconnu	muscles, cellules T
aPKC	$\zeta$	592	PS, PIP <sub>3</sub>	Ubiquitaire
	$\nu/\lambda$	586	inconnu	Quelques tissus
$\mu$	$\mu$	912	inconnu	Cellules NRK

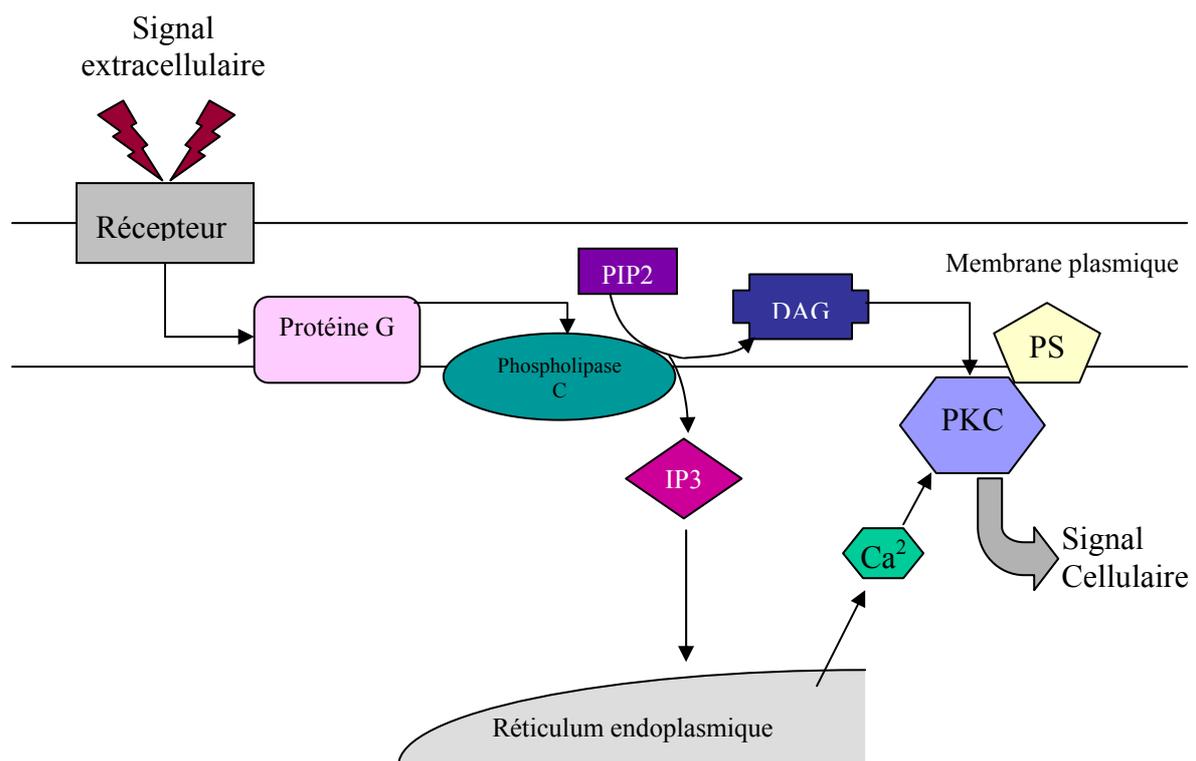
## II - STRUCTURE

Les différentes isoenzymes ont des masses moléculaires comprises entre 67 et 100 kDa et sont constituées d'une seule chaîne protéique composée de régions conservées (C1 à C4) et de régions variables (V1 à V5) (figure 14). Toutes les PKCs possèdent le même **domaine catalytique** (coté C-terminal) fixant l'ATP et le substrat, mais diffèrent par leur **domaine régulateur** (coté N-terminal) qui contient le site de fixation au  $Ca^{2+}$  (structure de type « EF Hand ») et une séquence C1 permettant l'interaction avec les autres effecteurs. Ces deux domaines sont séparés par une région charnière V3. Cette région **est sensible à la protéolyse** par la trypsine et les **calpaïnes** (Kishimoto et *al.*, 1989). Le domaine régulateur contient une séquence particulière dite « pseudo-substrat ». Cette séquence est responsable du maintien de la PKC dans une configuration inactive. Celle-ci est similaire à la séquence



Il est important de signaler que pour l'étude des mécanismes d'activation des PKCs, il existe un activateur chimique privilégié et couramment utilisé : « **les esters de phorbols** ». En effet, la PKC a été identifiée comme le récepteur intracellulaire privilégié de ces molécules. Ainsi, le phorbol 12-myristate-13-acétate (PMA) et le 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA) sont des analogues du DAG : ils peuvent se substituer à cette molécule et activer les PKCs *in vitro* et *in vivo* (Castagna *et al.*, 1982). Ils sont métabolisés très lentement dans la cellule et induisent une activation prolongée des PKCs. Cependant, les PKCs ne sont pas les seuls récepteurs des esters de phorbol et tous leurs effets ne transitent pas uniquement par les PKCs.

*En aparté : un exemple d'activation, la voie de la phospholipase C (figure 15)*



*Figure 15 : voie de la phospholipase C*

L'activation de la phospholipase C (*via* un stimulus extérieur) entraîne le clivage de PIP<sub>2</sub> en IP<sub>3</sub> et DAG. En parallèle, le Ca<sup>2+</sup> entraîne la translocation des PKCs conventionnelles

vers la membrane plasmique au niveau de récepteurs spécifiques : les protéines RACKS (Receptor for Activated C Kinase) (Mochly *et al.*, 1991).

Tous les effecteurs sont alors réunis pour l'activation :  $Ca^{2+}$ , PS, DAG (figure 15). Ces interactions induisent alors un changement de conformation libérant le pseudo-substrat et permettant l'accès au substrat. Il s'agit là de l'**activation réversible**.

L'**activation irréversible** consiste, quant à elle, en une coupure par les calpaïnes (ou plus rarement les caspases) dans la région charnière V3, donnant naissance à un fragment de 45 kDa nommé PKM, qui a par ailleurs une activité kinase constitutive, indépendante des effecteurs, et dont les substrats seraient des protéines cytosquelettiques ou nucléaires (figure 16).

Une stimulation prolongée par un agoniste conduit inéluctablement à la « down-regulation » de la PKC $\alpha$ , celle-ci se faisant *via* des ubiquitinations et une dégradation par le protéasome (Lu *et al.*, 1998). En outre, certaines molécules peuvent jouer le rôle d'inhibiteur de PKC comme par exemple l'annexine 5 (Russo-Marie, 1999).

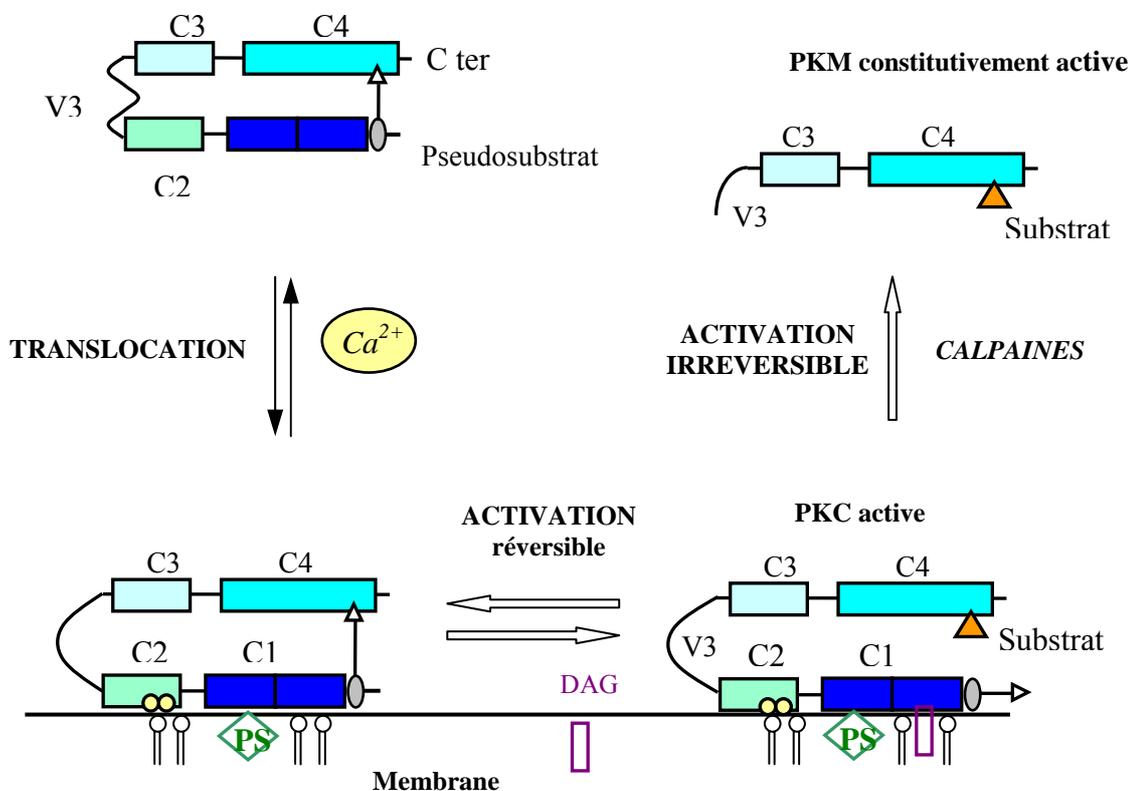


Figure 16 : Modèle d'activation des PKCs

## IV - LES PROTEINES D'ANCRAGE

En réponse à son activation, les PKCs transloquent vers la membrane plasmique. A ce niveau, plusieurs protéines ont été caractérisées comme protéine d'ancrage, parmi lesquelles **RACK** (Receptor For Activated C Kinase), capable de fixer les PKCs sous leurs formes actives uniquement. Celle-ci sert à stabiliser la PKC et ainsi augmenter son activité enzymatique (Csukai M. et *al.*, 1997), en effet cette liaison favoriserait l'accessibilité du substrat.

Par opposition au RACK, on trouve les **RICK** (Receptor For Inactive C Kinase isoenzymes), parmi celles-ci, l'**AKAP** (A kinase Anchoring Protein) a la particularité de se fixer à la fois aux structures subcellulaires et au domaine régulateur de la PKC. Son rôle serait différent de RACK, en effet elle pourrait déphosphoryler la PKC et donc l'inactiver (Mochly Rosen D. et *al.*, 1991).

## V - LES SUBSTRATS DES PKCs

Le nombre de protéines substrats des PKCs est très élevé (une centaine), ce qui explique un manque de sélectivité de l'enzyme.

La plekstrine se trouvant uniquement dans les cellules hématopoïétique peut être phosphorylée par toutes les isoformes (Brumell J.H. et *al.*, 1997). La ribonucléoprotéine A1 est phosphorylée par la PKC  $\zeta$  mais pas par les autres isoenzymes (Municio M. et *al.*, 1995). Les protéines du cytosquelette taline, vinculine, MARCKS, et plus récemment l'intégrine  $\beta 1$  sont identifiées comme substrats de la PKC $\alpha$ . Par ailleurs des enzymes, protéines nucléaires, facteurs de transcription et récepteurs sont également substrats des PKCs (phospholipase C et D, laminine, myogénine, récepteur à l'insuline,...).

En fait, le domaine régulateur spécifique pour chaque groupe est responsable de la spécificité de chaque isoforme vis-à-vis du substrat. Malgré ces différences, il est cependant clair que la spécificité du substrat est assez faible suggérant ainsi qu'il existe d'autres mécanismes pour expliquer une activité discriminante des PKCs. Ceci passe par une localisation intracellulaire

spécifique du type cellulaire et des activateurs variables. Les protéines d'ancrage permettant à la PKC d'atteindre le substrat approprié sont un autre élément d'explication.

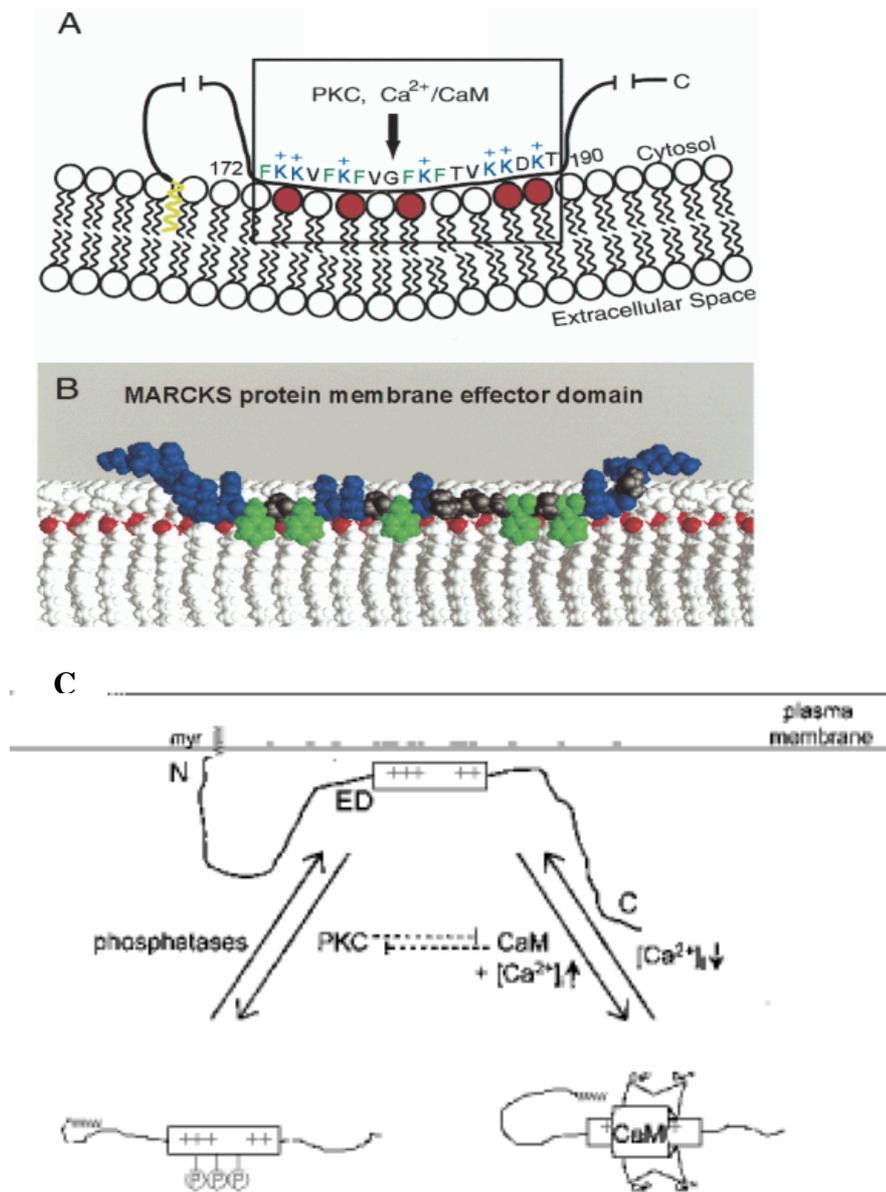
***En aparté : la protéine MARCKS, un substrat privilégié des PKCs***

La protéine **MARCKS (Myristoylated Alanine Rich C Kinase Substrate)** est un substrat ubiquitaire de la PKC dans toutes les cellules, elle est phosphorylable par toutes les isoformes à l'exception de la PKC  $\zeta$  (Uberall F. et *al.*, 1997). Il s'agit d'un polypeptide de 30 kDa qui sur gel de polyacrylamide, en conditions dénaturantes, présente une masse moléculaire estimée à 80 kDa en raison de sa forme en bâtonnet (Blackshear PJ, 1993) ; son point isoélectrique est : pHi = 4,3.

Il s'agit d'une protéine essentielle intervenant dans la coordination d'événements de signalisation entre la membrane et le cytosquelette comme l'adhésion cellulaire, la migration, la fusion, la sécrétion et la phagocytose, mais aussi dans la cancérisation (Manenti et *al.*, 1997) et l'apoptose (Schmitz et *al.*, 1998), ceci dans divers types cellulaires.

On trouve trois régions conservées : la région N-terminale comportant un groupe myristyl, lui donnant ainsi la possibilité de s'ancrer dans la bicouche phospholipidique par interactions hydrophobes ; un domaine MH<sub>2</sub> qui servirait d'ancrage pour la fixation de l'actine. Mais la caractéristique structurale la plus marquante de la MARCKS est un domaine effecteur basique central aussi appelé " Phosphorylation Site Domain " (PSD) liant l'actine, la Ca<sup>2+</sup>-calmoduline et les phospholipides acides, notamment le PIP<sub>2</sub> (Sundaram et *al.*, 2004).

La **phosphorylation** de certains résidus sérine dans le domaine effecteur par la PKC **empêche ces interactions**. Ainsi la MARCKS a souvent été utilisée comme marqueur d'activité intracellulaire de la PKC, en effet la MARCKS non phosphorylée est membranaire et la MARCKS phosphorylée est cytosolique (Dulong et *al.*, 2004). Ce processus est réversible puisque dans le cytoplasme, la protéine MARCKS peut être déphosphorylée par des phosphatases (Phosphatase 1A et 2A et calcineurine) (Seki et *al.*, 1995). En outre, l'interaction de la MARCKS avec la membrane peut également être neutralisée par une augmentation de Ca<sup>2+</sup> associée à celle de calmoduline (figure 17).



**Figure 17 :** A. Représentation schématique de la MARCKS en interaction avec la membrane (jaune : myristylation, bleu : charges positives, vert : résidus polaires, rouge : phospholipides négatifs). B. Image structurale du PSD en interaction avec la membrane. C. Modèle de régulation (Gambhir et al., 2004).

## 4<sup>ème</sup> partie

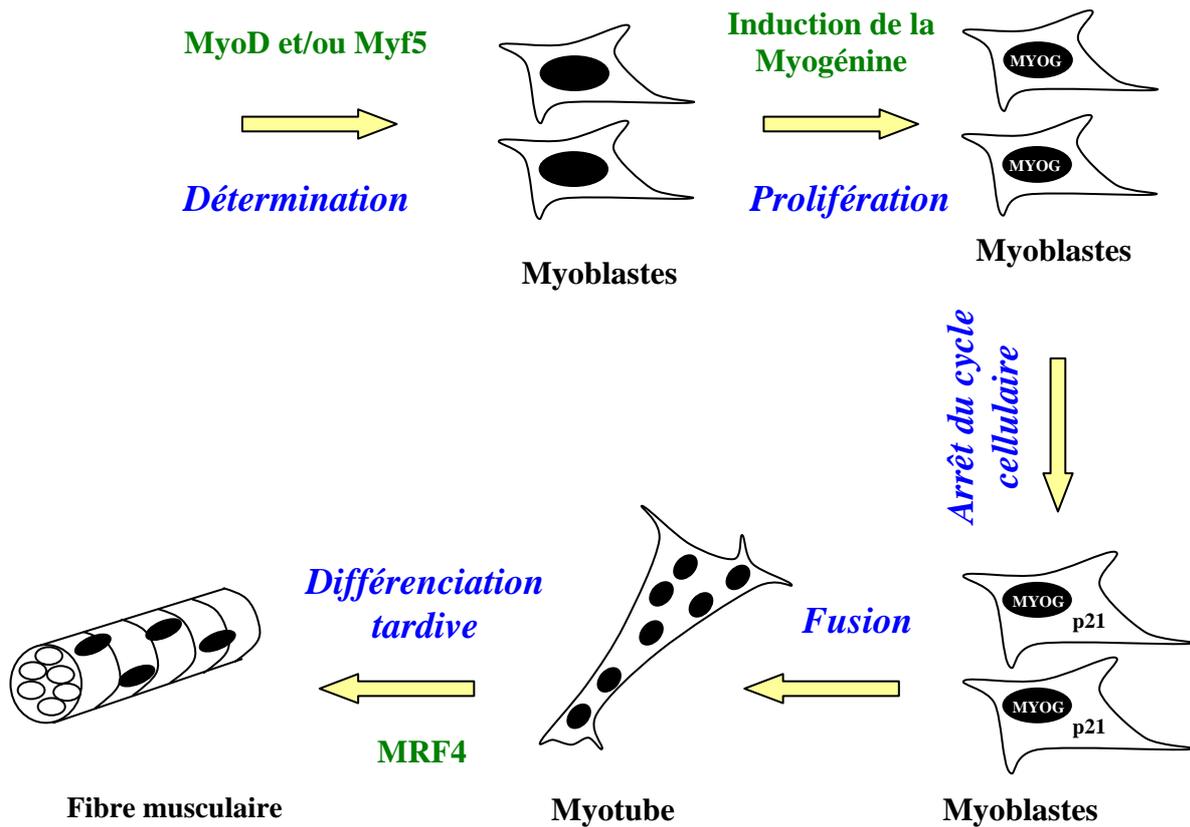
### **LA MYOGENESE**

Le phénomène de différenciation myogénique est le mécanisme par lequel les myoblastes (cellules fusiformes mononucléées) fusionnent pour donner naissance à des myotubes (cellules multinucléées) qui formeront plus tard les fibres musculaires (figure 18). La myogenèse consiste en l'élaboration de trois tissus très différenciés, composés pour chacun de cellules musculaires lisses, cardiaques et squelettiques. Elle prend place au cours du développement embryonnaire et en particulier à la suite de la somitogenèse, par spécification des cellules du myotome. A l'âge adulte, la différenciation de cellules souches myogéniques en périphérie des tissus musculaires, les cellules satellites, est à l'origine de la régénération de la masse musculaire.

Les travaux étudiant ce phénomène utilisent comme modèle expérimental la culture *in vitro* de myoblastes, soit isolés à partir de muscles embryonnaires ou adultes, soit des myoblastes transformés en lignée cellulaire. Le phénomène de fusion myoblastique est dépendant comme pour la plupart des processus de formation tissulaire, de différents types de facteurs.

#### **I – LES FACTEURS REGULATEURS DE LA TRANSCRIPTION DES GENES**

Les facteurs de transcription myogéniques sont appelés les MRFs (Myogenic Regulator Factors). Ils sont au nombre de quatre : MyoD (ou Myf3), Myf5, myogénine (ou Myf1) et MRF4 (Myf6 ou herculine) (figure 18). De plus, il a été identifié un grand nombre de facteurs positifs ou négatifs se fixant soit au niveau des facteurs eux-mêmes, soit au niveau de l'ADN, régulant ainsi de manière fine l'impact de ces derniers sur la cellule.



*Figure 18 : Principaux événements et facteurs régulateurs impliqués dans le développement musculaire (Ludolph et Konieczny, 1995)*

## II – LES FACTEURS PROTEIQUES

Lors de la myogenèse, le cytosquelette est impliqué dans des fonctions qui concernent l'activité motile, il participe à des fonctions de compartimentation en étroite interaction avec les structures membranaires et la matrice extra-cellulaire. Sa réorganisation (cycle cellulaire, différenciation, adhésion et mobilité cellulaire) engage la mise en place ou le démantèlement de structures d'ancrage et des modifications morphologiques spectaculaires de la cellule. Cette dynamique suppose la rupture d'interactions non covalentes et le clivage protéolytique des protéines qui stabilisent les réseaux et les faisceaux de  $\mu$ -filaments d'actine.

Des protéines effectrices (gelsoline,...) activent les processus de dépolymérisation et de reconstruction, tandis que les calpaïnes clivent les protéines d'ancrage et de réticulation. Ces processus sont fortement régulés localement par les ions  $\text{Ca}^{2+}$ , le pH, les phospholipides

et les petites protéines G. Les calpaïnes initialement localisées dans le cytosol (complexes inhibiteur-enzyme) se positionnent selon le stade cellulaire au niveau du cytosquelette, sous la membrane ou dans le noyau, à proximité de cibles spécifiques (Raynaud et *al.*, 2003 ; 2004). Ces mouvements sont fortement modulés par les flux de calcium (un flux de calcium important a notamment été mis en évidence avant la fusion (David et *al.*, 1981)) qui conditionnent parallèlement la dynamique de l'actine et les processus de fragmentation et d'élongation des  $\mu$ -filaments. Un autre argument est l'implication des calpaïnes dans la dégradation d'un grand nombre de protéines présentes dans les plaques d'adhésion et les jonctions cellulaires (structures impliquées dans l'interaction cellule/matrice extracellulaire et cellule/cellule) (Carragher et *al.*, 2001). **Les calpaïnes semblent fortement impliquées dans ces phénomènes.** L'utilisation d'inhibiteurs de cystéines-protéases (Barnoy et *al.*, 1998) ou de la calpastatine (Temm-Grove et *al.*, 1999) a d'ailleurs confirmé cette hypothèse.

Deux protéines membranaires sont impliquées dans les interactions cellules/cellules : les N-cadhérines et les N-CAM. Elles vont jouer un rôle prépondérant dans la reconnaissance et la fusion membranaire. D'autres protéines, membranaires également, vont jouer un rôle plus tardif dans la fusion. C'est le cas des protéines des GAP jonctions qui vont favoriser les communications intercytoplasmiques, ou des intégrines qui par la perte d'interactions avec le cytosquelette au niveau des plaques d'adhésion, vont favoriser la réorganisation de celui-ci. Cette augmentation de la fluidité membranaire va permettre la fusion des bicouches lipidiques et le mélange des cytoplasmes. Par la suite l'expression de gènes myogéniques, la migration des noyaux en périphérie et l'organisation de l'appareil contractile et cytosquelettique vont constituer les phases terminales de la fusion.

La Rho-GTPase va phosphoryler la paxiline et la FAK (focal adhesion kinase), coïncidant avec le début de la différenciation. Elle va d'autre part activer l'expression des MRFs, au même titre que la phosphatidyl inositol 3 kinase (PI3K).

Une autre conséquence du flux de calcium, associé à la formation de seconds messagers comme le DAG, serait **l'activation de la PKC** qui ainsi va phosphoryler plusieurs substrats comme la taline, la vinculine mais aussi la myogénine empêchant celle-ci de se fixer à l'ADN.

### III - LES ACTEURS DE LA PROTEOLYSE CALCIUM-DEPENDANTE ET DE LA DIFFERENCIATION MUSCULAIRE : ETUDES MENEES AU LABORATOIRE

Les études récentes menées au laboratoire ont montré que les calpaïnes sont particulièrement impliquées dans les phénomènes de migration et d'adhésion des myoblastes. En effet, l'ajout au milieu de culture d'inhibiteurs chimiques des calpaïnes tels que la calpeptine entraîne une inhibition importante de la migration des myoblastes (Dedieu et *al.*, 2004). La surexpression de manière stable de l'inhibiteur endogène des calpaïnes, la calpastatine, a pour conséquence une inhibition quasi-totale de l'activité migratrice des myoblastes. Par ailleurs, l'utilisation d'antisens dirigés contre la  $\mu$ - ou la m-calpaïne confirment que les deux isoformes jouent un rôle dans les phénomènes de migration (Dedieu et *al.*, 2003).

L'utilisation d'inhibiteurs chimiques des calpaïnes, de clones surexprimant la calpastatine, et de traitements antisens dirigés contre la  $\mu$ - et la m-calpaïne ont très clairement mis en évidence que le système protéolytique calcium-dépendant était également impliqué dans les phénomènes d'adhésion des cellules myogéniques et que les deux isoformes jouent un rôle dans ces phénomènes. Les calpaïnes interviendraient dans l'adhésion et la migration des myoblastes, directement *via* leurs substrats et indirectement *via* le cytosquelette d'actine ; les microtubules ne semblent cependant pas impliqués dans ces phénomènes (Mazères et *al.*, 2006).

La  $\mu$ -calpaïne est également impliquée dans la fusion des myoblastes, en effet, sa sur-expression entraîne la diminution du taux d'expression des protéines ezrine, vimentine et cavéoline-3 ainsi qu'une profonde désorganisation du cytosquelette (Moyen et *al.*, 2004). Un traitement antisens dirigé contre la p94 entraîne pour sa part de fortes perturbations dans l'ultra-structure cytosquelettique des myotubes (Poussard et *al.*, 1996).

La protéine MARCKS qui est impliquée dans la stabilisation du cytosquelette, lors de la différenciation cellulaire, a été identifiée comme substrat des calpaïnes dans la lignée C2C12, l'étape protéolytique serait dépendante de sa phosphorylation préalable par la PKC $\alpha$ .

De plus, l'utilisation d'antisens dirigés contre la protéine MARCKS engendre une augmentation très significative de la fusion. Au contraire, une augmentation de l'expression de cette protéine entraîne une inhibition du processus de fusion. La protéolyse de MARCKS serait donc nécessaire à la fusion des myoblastes (Dulong et *al.*, 2004). Par ailleurs, le rôle protéolytique des calpaïnes sur la PKC $\alpha$  a également été mis en évidence au cours de la fusion des myoblastes (Aragon et *al.*, 2002).

*Dans la continuité des travaux précédents, nous nous sommes efforcés de mieux comprendre l'implication des calpaïnes au cours de la myogenèse via leurs actions sur la PKC $\alpha$  et MARCKS, et ceci plus précisément au niveau des caveolae.*

## *Matériel & Méthodes*

### **I - CULTURES CELLULAIRES**

Le modèle biologique utilisé est la lignée de cellules musculaires C2C12. Il s'agit d'un sous-clone de la lignée de myoblastes de souris établie par Yaffe et Saxel en 1977. Ces cellules ont été obtenues à partir de muscles de pattes arrières de souris adultes C3H. Cette lignée présente toutes les caractéristiques nécessaires à l'étude de la myogenèse, à savoir une fusion relativement rapide conduisant à la formation de myotubes et exprimant l'ensemble des protéines spécifiques du muscle.

#### **I - 1) Milieux de culture**

Les myoblastes sont cultivés en conditions stériles dans du DMEM riche en glucose (Dulbecco's Modified Eagle Medium), (GIBCO-BRL) glucose 4,5 g/L, pyruvate de sodium 110 mg/L, L-glutamine 580 mg/L additionné de pénicilline/streptomycine 50 mg/L et L-Glutamine 1 mM (GIBCO-BRL).

#### **I - 2) Prolifération**

Les myoblastes sontensemencés à raison de 3000 cellules/cm<sup>2</sup> dans des flasques de 75 cm<sup>2</sup> avec du milieu DMEM 90 % complété par du sérum de veaux fœtal (SVF) 10 % (sérum utilisé pour sa richesse en facteurs de croissance prolifératifs). Les cellules sont alors incubées à 37°C dans une atmosphère humide et saturée en CO<sub>2</sub> (5 %). Lorsque les myoblastes ont atteint 80 % de confluence, les flasques sont rincées avec du PBS et les cellules décollées de leurs supports par ajout de 2 ml de trypsine (trypsine 0,25 % (v/v), ESA 0,03 % (v/v)) durant 5 min à 37 °C.

L'action de la trypsine est ensuite stoppée par addition de 2 ml de milieu DMEM 90 % contenant du SVF 10 %. Les cellules sont alors dénombrées et centrifugées durant 10 min à 1 000 g.

Le culot cellulaire est repris dans du milieu de prolifération pour un nouvel ensemencement ou dans du milieu de congélation (DMEM 50 %, SVF 40 %, DMSO 10 %) et placé en vapeur d'azote liquide pour la conservation.

### **I - 3) Différenciation**

Lorsque les cellules ont atteint 80 % de confluence, le milieu de prolifération est remplacé par du milieu de différenciation (DMEM 98 %, sérum de cheval (GIBCO-BRL) 2 %) qui contient moins d'agents prolifératifs. Le milieu est renouvelé tous les trois jours.

### **I - 4) Conservation des cellules**

Lorsque le stade de différenciation désiré est atteint, les boîtes sont rincées avec du tampon PBS froid, pour l'analyse par électrophorèse des protéines. Les boîtes sont ensuite congelées dans l'azote liquide et conservées à - 20°C. Pour la fixation, après rinçage avec du PBS froid, les cellules sont fixées par une incubation de 15 min dans du paraformaldéhyde (4 % (p/v)). Les cellules sont conservées soit dans du PBS pour une révélation immunochimique, soit dans de l'éthanol (70°) pour la quantification de la fusion.

### **I - 5) Extraction des protéines**

Au stade de différenciation voulu, les cellules sont homogénéisées dans du tampon PBS (NaCl 137 mM ; KCl 2,68 mM ; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,8 mM pH 7,5) additionné d'EGTA (5 mM), de DTT (0,5 mM), de NaN<sub>3</sub> (1 mM), de leupeptine (10 µg/mL), de benzamidine (10 mM) et de PMSF (1 mM). Le mélange est soniqué 3 fois 5 secondes et la concentration protéique est déterminée par la méthode de Bradford.

## **I - 6) Traitement des cultures**

### **A) Calpastatine peptide (CS-peptide)**

Il s'agit d'un peptide synthétique de 27 résidus. La séquence primaire de ce peptide est acétyl-DPMSSTYIEELGKREVTIPPKYRELLA-NH<sub>2</sub> correspondant au segment inhibiteur du domaine I de la calpastatine humaine (CALBIOCHEM). Il a un effet sur les calpaïnes ubiquitaires exclusivement et est capable de traverser les membranes cellulaires (Eto *et al.*, 1995). Il est ajouté au milieu de culture au stade choisi à une concentration finale de 10 µM. L'incubation est réalisée durant une heure.

### **B) Gö 6976**

Le Gö 6976 (ALEXIS BIOCHEMICALS) est un inhibiteur des PKC $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  (Martiny-Baron *et al.*, 1993).

Le traitement est réalisé au stade de culture choisi. Le Gö 6976 est dilué dans du DMSO et ajouté au milieu de culture à une concentration finale de 100 nM. Le traitement est arrêté après une heure d'incubation.

### **C) Ionophore à calcium A23187**

Ce ionophore (Sigma), transporteur d'ions divalents tels que le Ca<sup>2+</sup>, est utilisé pour augmenter la quantité de calcium intracellulaire et ainsi activer entre autres les protéases calcium-dépendantes. Dilué dans du DMSO, il est rajouté à une concentration de 1 µM dans le milieu de culture pendant 1 heure.

### **D) Ester de phorbol (PMA)**

Le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) (SIGMA) est un analogue du D.A.G. capable de stimuler l'activité des PKC conventionnelles et des PKC nouvelles.

Le PMA est dilué dans du DMSO et ajouté au milieu de culture à une concentration finale de 150 nM. Le traitement est arrêté après une heure d'incubation.

### **E) Mévinoline**

La mévinoline (ou lovastatine) est un inhibiteur de la HMG-CoA réductase, elle empêche la formation de mévalonate à partir de HMG-CoA, inhibant ainsi la biosynthèse du cholestérol. Les cellules sont cultivées à partir du jour 3 de différenciation en présence de mévinoline 4  $\mu\text{M}$ , le sérum de cheval est remplacé par un milieu sans lipide mais contenant de la BSA 1 % (p/v) et de l'insuline 5  $\mu\text{g/mL}$ . Ce traitement engendre une diminution du cholestérol cellulaire en moyenne de 35 % (Chamberlain et *al.*, 2001).

### **F) Les transfections antisens**

Un oligonucléotide antisens est complémentaire de la séquence d'un ARNm cible. Il peut donc se fixer de manière spécifique à celui-ci et ainsi en empêcher la traduction. Cette fixation des antisens sur les ARNm permet également l'action de la RnaseH qui dégrade les hybrides ADN/ARN. Il peut aussi se fixer à l'ADN, sur la séquence dont il est complémentaire et ainsi en bloquer la transcription. Ainsi la technique des traitements antisens permet d'obtenir une inhibition de la protéine cible, dans notre cas de la m-calpaïne.

#### ***Choix des séquences des oligonucléotides antisens***

Les oligonucléotides purifiés sont fournis par Sigma et ont été choisis de manière à être suffisamment courts pour pénétrer les cellules et assez longs pour être spécifiques des séquences ciblées, c'est à dire entre 17 et 25 bases (Varga et *al.*, 1999). Les deux nucléotides en 5' et 3' ont été modifiés d'une structure phosphodiester en structure phosphorothioate ; ceci leur conférant une résistance aux nucléases (Monia et *al.*, 1999 ; Zong, 1995). La spécificité de chacun des oligonucléotides a été vérifiée grâce aux bases de données de GenBank et au logiciel OligoV2, ils ne présentent ni auto-hybridation, ni de complémentarité avec des gènes autres que ceux ciblés. De plus chaque séquence est composée d'une majorité de bases pyrimidiques ce qui leur confère une force d'hybridation plus forte avec les ARNm cibles. Afin d'obtenir une inhibition maximale de la traduction des protéines ciblées nous avons choisi des séquences complémentaires des ARNm situées à quelques bases en aval des AUG initiateurs.

Pour chaque antisens une séquence *random* a été établie, possédant la même composition en bases que la séquence antisens mais ne présentant pas de complémentarité avec les gènes répertoriés dans GenBank.

Les cellules sont transfectées avec des oligonucléotides antisens ou *random*. Ces transfections sont réalisées en utilisant un lipide carrier, l'Oligofectamine Reagent (Invitrogen). L'Oligofectamine Reagent est mis à incuber pendant 5 min dans du DMEM sans sérum à raison de 0.5 µL/cm<sup>2</sup>. Les oligonucléotides sont ajoutés à ce mélange à une concentration de 300 nM. Cette solution est mise à incuber une seconde fois pour une durée de 15 min permettant au lipide carrier de s'associer aux oligonucléotides. Pendant ce temps, les cellules sont rincées puis placées dans du DMEM. Le mélange transfectionnel est alors appliqué sur les cellules pour une durée de 4 heures. Un volume de DMEM + 6 % HS, nécessaire au rétablissement d'une concentration en sérum de 2 %, est ensuite ajouté.

Séquence AS m-calpaïne : 5' ATG CGA CCC CAG CCC CTC GCG 3'

Séquence AS Random m-calpaïne : 5' ATC CCC GCA CCC CAG GCG GTC 3'

Les bases soulignées sont modifiées phosphorothioates.

## I - 7) Révélation immunochimique

Les cellules sont cultivées sur des lamelles de verres (Polylabo) préalablement gélatinées (gélatine Gibco 1 % (p/v) H<sub>2</sub>O). Une fois la culture effectuée, les cellules sont fixées au PAF (4 % (p/v)) pendant 15 min. Après fixation des cellules, les différentes protéines cibles vont être révélées en fluorescence.

Pour ce faire, les cellules sont perméabilisées par une incubation de 5 min dans du PBS additionné de Triton X-100 (1 %) si l'antigène ciblé est intracellulaire. Après saturation durant 15 min des sites aspécifiques par du PBS contenant de la BSA (3 % (p/v)), les cellules sont incubées durant 4 heures en présence des anticorps primaires à une dilution de 1/150 dans du PBS contenant de la BSA (1 % (p/v)).

Suite à trois rinçages successifs au PBS, une incubation des cellules est réalisée durant 1 heure à l'abri de la lumière en présence de l'anticorps secondaire marqué avec de l'isothiocyanate de fluorescéine ou de la rhodamine dilué au 1/200 dans du PBS additionné de BSA 1% (p/v). Toutes ces opérations sont réalisées sous agitation et à température ambiante. Après trois rinçages au PBS les cellules sont placées sur lame de verre dans du PBS-glycérol (v/v). L'observation des marquages fluorescents s'effectue à l'aide d'un microscope confocal (Olympus) couplé à un logiciel d'acquisition des images (Fluoview).

### **I - 8) Quantification de la fusion des myoblastes**

La fusion des myoblastes peut être exprimée par un pourcentage de fusion.

#### ***Fixation et coloration des cellules***

A différents temps de culture, les cellules sont fixées avec du PAF (4 % (p/v)) pendant 15 min après avoir été rincées deux fois avec du PBS (NaCl 0,137 M ; KCl 2,68 M ; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4 mM et KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,76 mM (Sigma)). Après deux nouveaux rinçages, les cellules sont conservées 12 heures à 4°C dans de l'éthanol 70 %.

La coloration des noyaux se fait à l'hémalum de Hansen (hématoxyline 10 mM, alun de potassium 260 mM et KMnO<sub>4</sub> 4 mM) (Balcerzak et *al.*, 1995). Après fixation, les cellules sont rincées à l'eau distillée et incubées 8 min en présence du colorant. Après trois nouveaux lavages à l'eau distillée, les cellules sont montées sous lamelle de verre dans du PBS additionné de glycérol (10% (v/v)).

#### ***Evaluation du pourcentage de fusion***

Les noyaux présents dans les myoblastes et les myotubes (contenant au minimum trois noyaux) sont dénombrés à l'aide d'un microscope inversé (grossissement X200). Ce comptage donne accès au pourcentage de fusion défini par le rapport :

$$\text{Fusion (\%)} = \frac{\text{Nombre de noyaux présents dans les myotubes}}{\text{Nombre de noyaux totaux (myotubes + myoblastes)}} \times 100$$

Le pourcentage de fusion est établi par l'analyse de deux boîtes provenant de trois cultures différentes. Douze champs, choisis de façon arbitraire, sont comptés pour chaque boîte, ce qui représente une surface d'environ 6 mm<sup>2</sup> et un nombre total d'environ 3000 noyaux.

## II - ACTIVITE PROTEOLYTIQUE DES CALPAÏNES

### II - 1) Quantification de la fluorescence des peptides libérés

La mesure de l'activité calpaïne est basée sur la méthode de Wolfe et *al.* (1989). Cette méthode permet de mesurer l'activité d'hydrolyse de la caséine marquée par l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). Les fractions 3 et 10 obtenues après fractionnement sur gradient de sucrose sont incubées durant 30 min à 25°C en présence de caséine-FITC (2,7 mg/mL) et de calcium (activité protéolytique totale) ou d'EGTA (activité protéolytique non calcium-dépendante). La différence entre les deux activités représente l'activité calcium-dépendante. Chaque essai contient 50 µL de fraction, 50 µL de substrat et 25 µL de CaCl<sub>2</sub> (25 mM) ou d'EGTA (2 mM).

Après incubation la réaction est arrêtée en présence de 125 µL de solution contenant de l'acide trichloroacétique (5 % (p/v)) et du triton X 100 (0,01 % (v/v)).

Après une centrifugation de 10 min à 3000 g à 4°C, 200 µL de surnageant sont recueillis et mélangés à 800 µL de tampon phosphate Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,3 mM).

La fluorescence des peptides marqués, non précipités, est quantifiée à l'aide d'un spectrofluorimètre (SHIMADZU type RF-551 S) à une longueur d'onde d'excitation de 495 nm et d'émission de 518 nm.

### II - 2) Aspect qualitatif par zymogramme

Le zymogramme est réalisé selon la technique décrite par Arthur et Mykles (2000). Il s'agit de gels de polyacrylamide, réalisés en conditions non dénaturantes, où de la caséine-FITC (10 mg/mL) est ajoutée au gel de séparation.

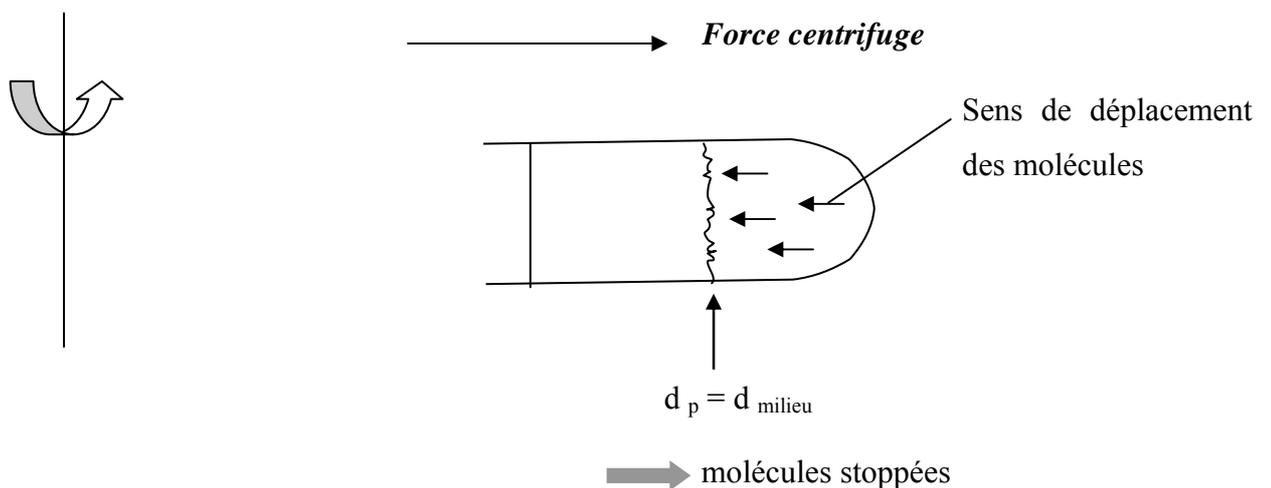
Les fractions 3 et 10 obtenues après fractionnement sur gradient de sucrose sont testées pour leurs activités protéolytiques en utilisant de la caseine-FITC comme substrat. Les échantillons

migrent en conditions non dénaturantes et en présence d'EDTA (5 mM). Après avoir enlevés les gels de l'EDTA, ils sont incubés une nuit dans trois bains successifs (10 mM de DTT) contenant 2 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  ou 10 mM d'EDTA. Les gels sont alors observés sous UV. Deux contrôles sont réalisés à partir de  $\mu$ - et de m-calpaines purifiés provenant de muscle squelettique de lapin (Garret et *al.*, 1988)

### III – EXTRACTION ET PURIFICATION DES *CAVEOLAE*

La méthode utilisée est issue des travaux de Meacci et *al.*, 2000. La séparation se fait suivant le principe de la flottation qui est une des techniques de séparation par ultracentrifugation, celle-ci se faisant sur gradient de sucrose. Les particules migrent en fonction de leurs coefficients de sédimentation et s'arrêtent sur la couche du gradient correspondant à leur densité. Les macromolécules déposées au fond du tube se déplacent dans le sens opposé à celui de la force centrifuge. Les *caveolae*, de par leurs compositions particulières en lipides, présentent une densité très faible et se séparent de la majorité des macromolécules.

axe de rotation du rotor



### **III - 1) Préparation du lysat**

Lorsque les cellules ont atteint le stade désiré (dans notre cas, toutes les études de co-fractionnement ont été réalisées aux jours 6 et 7 de différenciation), elles sont rincées avec du PBS puis récupérées par "grattage" dans du tampon HEPES (Hepes 10 mM pH 7,4 ; MgCl<sub>2</sub> 1 mM ; DTT 1 mM ; NaN<sub>3</sub> 5 mM) additionné d'inhibiteurs de protéases (PMSF 1 mM, leupeptine 10 µg/mL, benzamidine 10 mM, ovomucoïde 100 mg/L) et saccharose 250 mM (tampon I). La suspension cellulaire est alors centrifugée à 1000 g pendant 5 min, remise en suspension dans 600 µL du même milieu avant d'être lysée à l'aide d'un potter (120 coups). Le lysat obtenu est ajusté à une concentration de 45 % de saccharose, l'ensemble constituant la couche inférieure du gradient.

### **III - 2) Préparation du gradient de saccharose**

Les tubes d'ultracentrifugation sont pré-remplis par trois couches à trois concentrations différentes en saccharose : 45, 43, et 5 %.

D'après l'I.T.C. (International Critical Tables), les différents pourcentages sont obtenus à partir d'une solution mère de saccharose à 66 % (85,5 g de saccharose dans 49,5 mL de tampon HEPES) (p/p).

La couche de 45 % est obtenue par addition de 1,317 mL de solution (préalablement préparée) à 58 % et de 565 µL de lysat (250 mM de saccharose) ; les couches de 43 % (1,88 mL) et de 5 % (1,25 mL) sont obtenues par addition respective de 6 mL et 0,5 mL de solution mère à 4 mL et 9,5 mL de tampon HEPES.

### **III - 3) Ultracentrifugation**

Après avoir déposé les couches du gradient à l'aide d'une seringue (en prenant la plus grande précaution de ne pas perturber les interfaces) en commençant par celle dont le pourcentage est le plus faible, les tubes sont centrifugés à 200 000 g pendant 17 heures à 4°C (Optima Max Ultracentrifuge, BECKMAN, MLS-50 rotor).

Dix fractions de 500 µL sont alors récupérées pour les analyses ultérieures.

## IV – PURIFICATION PAR CULOTTAGE

Après l'ultracentrifugation à 200 000 g, la fraction 3 (contenant les *caveolae*) est récupérée puis diluée 3 fois dans du tampon HEPES. L'ensemble est centrifugé à 40 000 g pendant 1 heure à 4°C (Optima Max Ultracentrifuge, BECKMAN, TLA-110 rotor). Le culot est récupéré et solubilisé dans une solution dénaturante puis chauffé à 90°C pendant 2 min.

Le surnageant est précipité au TCA 10 % (p/v) afin de le concentrer. Après homogénéisation, l'ensemble est incubé 30 min dans la glace puis centrifugé pendant 15 min à 10 000 g. Le culot contenant les protéines est récupéré, lavé avec de l'acétone (-20°C). Après évaporation au speedvac durant 5 min, le culot est repris dans une solution dénaturante et chauffé 2 min à 90°C. Les échantillons sont ensuite déposés sur gel de polyacrylamide.

## V – IMMUNOPRECIPITATION MAGNETIQUE

Les expériences d'immunoprécipitation sont réalisées à l'aide du kit «  $\mu$ MACS protein G microbeads » (MACS). La protéine G est un composant de la paroi cellulaire de *Streptococcus sp.* qui se lie avec une grande affinité à la plupart des anticorps, et spécialement les immunoglobulines G (IgG). Cela permet la formation de complexes multimériques entre antigènes, anticorps et la protéine G fusionnée à une microbille magnétique. Les anticorps primaires utilisés dans ces expériences sont l'anticorps anti-cavéoline-3 et des anticorps anti-IgG non immuns.

Le lysat obtenu après pottérisation ou la fraction 3 obtenue après ultracentrifugation sont mélangés à 2  $\mu$ g d'anticorps anti-cavéoline-3 et 50  $\mu$ L de protéine G. Le lysat est ainsi incubé sous agitation rotative pendant 20 min à température ambiante et 10 min dans la glace.

En parallèle du tampon de charge 1X pH 6,8 (50 mM Tris-HCl, SDS 1 % (p/v), bleu de bromophénol 0,01 % (p/v), glycérol 30 %, 2-mercaptoéthanol (2-ME) 2 %) est mis à chauffer à 95°C. Les micro-colonnes fournies sont placées sur l'aimant puis rincées une fois avec 200  $\mu$ L de tampon I. Le lysat contenant les anticorps et les microbilles est ensuite ajouté.

L'ensemble est rincé 6 fois avec 200  $\mu$ L de tampon I puis les microbilles sont éluées avec 50  $\mu$ L de tampon de charge. Les échantillons sont ensuite analysés par Western Blot.

## VI – TRAITEMENTS

### VI - 1) Par la m-calpaïne exogène

La m-calpaïne est purifiée au laboratoire selon la méthode décrite par Garret et *al.* (1988). Les fractions cavéolaires sont incubées à 30°C avec de la m-calpaïne purifiée selon un rapport 1/500 pendant 5 min. La réaction est déclenchée par addition de CaCl<sub>2</sub> (concentration finale : 1,5 mM). Celle-ci est ensuite arrêtée par addition d'une solution dénaturante (tris-Hcl pH=6.8, SDS 1%, glycerol 30 %, bleu de bromophenol 0,01 %, 2-mercaptoethanol 0,02 %) et incubation durant 2 min à 100°C. L'analyse se fait ensuite sur gel de polyacrylamide.

### VI - 2) Par le carbonate de sodium

Après ultracentrifugation, la fraction 3 est récupérée et incubée dans 0,2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH=11,5 pendant 30 min à 0°C. Les échantillons sont alors soumis à une centrifugation à 40 000 g pendant 1 heure à 4°C (Optima Max Ultracentrifuge, BECKMAN, TLA-110 rotor). Le culot est récupéré et solubilisé dans une solution dénaturante puis chauffé à 90°C pendant 2 min.

### VI - 3) Par la protéinase K, le déoxycholate de sodium

Les fractions cavéolaires sont incubées à 37°C pendant 20 min en présence de protéinase K (0,5  $\mu$ g/mL) (Sigma) ou de déoxycholate de sodium (0,1 %) (Sigma) ou des deux traitements chimiques. Après l'incubation, la réaction est arrêtée avec du PMSF (1mM), lequel inhibe la protéinase K. Les échantillons sont alors soumis à une centrifugation à 40 000 g pendant 1 heure à 4°C (Optima Max Ultracentrifuge, BECKMAN, TLA-110 rotor). Le culot est récupéré et solubilisé dans une solution dénaturante puis chauffé à 90°C pendant 2 min.

## VII - SEPARATION ELECTROPHORETIQUE DES PROTEINES SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE

Les électrophorèses sont réalisées en conditions dénaturantes selon la technique décrite par LAEMMLI (1970).

Les gels de séparation sont en fait constitués de deux gels :

- le gel de concentration est un gel à 4 % (p/v) d'acrylamide avec un rapport acrylamide/bisacrylamide de 37,5/1 dans lequel sont aménagés les puits qui vont servir au dépôt des échantillons protéiques ;

- le gel de résolution est un gel à 10 % (p/v) d'acrylamide dans lequel les protéines vont être séparées en fonction de leurs masses moléculaires.

La séparation a lieu dans un tampon de migration (Tris-HCl 25 mM pH=8,6, Glycine 192 mM, SDS 0,1 % (p/v)).

Avant les dépôts, les échantillons sont dénaturés et réduits en présence de SDS à 4 % (p/v) et de 2-mercaptoéthanol à 9 % (v/v). Ce tampon contient aussi du glycérol afin d'augmenter la densité de l'échantillon et du bleu de bromophénol qui permet de suivre le front de migration. Les échantillons sont chauffés à 100°C durant 2 min pour parfaire la dénaturation.

La migration simultanée d'un mélange de protéines étalons (marqueurs) (Pharmacia) permet la détermination de la masse moléculaire des protéines analysées. La migration est réalisée à ampérage constant (30 mA/gel).

## VIII - TRANSFERT DES PROTEINES

Les protéines séparées par électrophorèse sont transférées sur une membrane Immobilon-P (Millipore). Les membranes doivent au préalable être réhydratées (méthanol puis eau).

L'électrotransfert s'effectue en milieu semi-sec dans le tampon de transfert (méthanol 15%, tris 0,025 M, glycine 0,192M, SDS 0,1%, eau 75%). Le champ électrique appliqué est de 0,8 mA/cm<sup>2</sup> pendant une durée variable fonction du poids moléculaire des protéines : 50 min pour PKC $\alpha$ , m- et  $\mu$ -calpaïnes, MARCKS et 30 min pour cavéoline-1 et -3.

## **IX - IMMUNOREVELATION DE PROTEINES**

Les membranes de transfert sont réhydratées puis incubées durant 2 heures dans du TBS (Tris-HCl 50 mM pH=8, NaCl 138 mM, KCl 2,7 mM) contenant 5 % (p/v) de lait écrémé en poudre afin de saturer les sites de fixation non spécifiques.

Après rinçage avec du TBS, les membranes sont placées 2 heures dans du TBS contenant du lait 1 % et l'anticorps primaire (dilution variable suivant les protéines).

Après trois rinçages de 10 min dans le TBS, les membranes sont incubées pendant 1 heure dans ce même tampon mais avec du lait 1 % (p/v) et l'anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline dilué au 1/10000, puis rincées à nouveau trois fois.

La révélation est alors réalisée avec du tampon Tris-HCl (pH = 7,5) 100 mM contenant du NaCl 100 mM et du MgCl<sub>2</sub> 5 mM, auquel sont additionnés les substrats colorés de la phosphatase alcaline qui sont le NBT et le BCIP. La révélation est terminée par rinçage à l'eau distillée.

## **X - DOSAGE DES PROTEINES**

### **X – 1) Dosage au bleu de Coomassie**

Ce dosage des protéines est réalisé à partir d'une méthode dérivée de celle de Bradford en utilisant une solution de bleu de Coomassie (Pierce). L'absorbance est lue à  $\lambda = 595$  nm après une incubation de 5 min à température ambiante. La détermination de la concentration protéique est faite à partir d'une gamme étalon réalisée avec de la bovine sérum albumine (BSA) (Pierce) 2 mg/mL.

### **X – 2) Dosage par la méthode de Pierce-BCA**

Le principe de cette méthode est basé sur la réduction de l'ion Cuivre Cu<sup>2+</sup> en Cu<sup>+</sup> par les protéines présentes dans l'échantillon. Le Cu<sup>+</sup> réagit ensuite avec l'acide bicinchoninique (BCA) pour former un composé coloré (violet). L'absorbance des échantillons, incubés 30 min à 60 °C puis ramenés à température ambiante, est lue à  $\lambda = 562$  nm.

La détermination de la concentration protéique est faite à partir d'une gamme étalon réalisée avec de la BSA (Pierce) 2 mg/mL.

## **XI – QUANTIFICATION DES SIGNAUX**

L'intensité (unités arbitraires) de chaque bande est quantifiée au moyen d'un analyseur d'image : Gel Doc 2000 (BIO-RAD). Dans ce travail, la quantification des signaux sera exprimée en pourcentage par rapport à l'intensité de la bande la plus intense.

## **XII – ANALYSE PROTEOMIQUE : GELS BI-DIMENTIONNELS**

### **XII – 1) Première dimension**

L'électrofocalisation se fait sur des gels pré-coulés de 13 cm présentant un gradient de pH linéaire de 3 à 10 (Amersham). Chacun de ces gels est réhydraté activement durant 12 heures à 30 V dans une solution de réhydratation (urée 8 M, thiourée 2 M, CHAPS 4 % (p/v), bleu de Bromophénol 0,01 % (p/v), DTT 0,28 % (p/v), IPG-Buffer 0,5 % (v/v)) contenant 150 µg de protéine préalablement extraites (fraction 3 après ultracentrifugation). Le volume total de réhydratation doit être de 250 µL. Une migration de 5 heures 30 min est ensuite effectuée au moyen d'un IPGphore (Amersham).

Celle-ci présente les caractéristiques suivantes :

- 200 V pendant 1 heure,
- 500 V pendant 1 heure,
- 1000 V pendant 1 heure,
- 30 min en gradient de 1000 à 8000 V,
- 2 heures à 8000 V.

Ceci correspond à une quantité totale d'énergie de 17 kV.h.

## **XII – 2) Seconde dimension**

Les gels de première dimension doivent être équilibrés avant d'effectuer la seconde dimension. Ils sont baignés de manières successives pendant 15 à 30 min dans deux solutions composées à partir d'un tampon d'équilibration pH=8,8 (urée 6 M, tris 50 mM, glycérol 30 % (v/v), SDS 2 % (p/v)). La première est effectuée avec 1 % (p/v) de DTT, la seconde avec 5 % (p/v) d'iodoacétamide. La deuxième dimension est réalisée sur gels de polyacrylamide 12 % (p/v) en présence de SDS. La migration s'effectue à ampérage constant à raison de 10 mA par gel pendant 30 min, puis 20 mA par gel pendant 4 heures 30 min.

## **XII – 3) Fixation et coloration des gels**

Les gels sont fixés à l'aide de deux solutions de fixations différentes : ils sont baignés tout d'abord pendant une nuit dans une solution composée d'éthanol 30 % (v/v) et d'acide orthophosphorique 2 % (v/v) (Sigma), puis dans de l'acide orthophosphorique à 2 % (v/v) deux fois 30 min. Ils sont ensuite colorés durant 72 heures au bleu de Coomassie colloïdal (Sigma) (acide orthophosphorique 2 % (v/v), sulfate d'ammonium 15 % (p/v), éthanol 18 %, bleu de Coomassie G-250 0,08 % (p/v)).

## **XII – 4) Analyse et quantification des *spots* obtenus**

Les images des gels sont obtenues grâce au logiciel d'acquisition d'image Labscan (Amersham). La détection et l'analyse des *spots* sont effectuées à l'aide du logiciel Image Master Platinum (Amersham).

## **XIII – ANALYSE PROTEOMIQUE : IDENTIFICATION DES SPOTS**

Les protéines constituant les *spots* d'intérêt sont soumises à une digestion trypsique, suivie d'une analyse MALDI-MS utilisant l'appareillage MALDI-TOF. Les masses sont comparées à celles identifiées dans les banques de données (<http://prowl.rockefeller.edu>).

L'acquisition des données a été réalisée en mode manuel, les données MS/MS sont recherchées en comparaison des bases de données NCBI.

#### **XIV - ANALYSE STATISTIQUE**

Pour chaque série expérimentale et pour chaque paramètre mesuré, la moyenne arithmétique de chaque valeur ( $n = 3$ ) est calculée. Chaque moyenne est accompagnée de son erreur standard (SEM). La comparaison des moyennes est effectuée par le logiciel Minitab. Une différence entre deux moyennes est considérée comme significative lorsqu'elle est associée à une probabilité  $p < 0,05$ .

# Résultats & Discussions

## Introduction

*Comme nous l'avons fortement signalé en introduction, les calpaines sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires dont la fusion des myoblastes (Cottin et al., 2000 ; Dourdin et al., 1997, 1999 ; Balcerzak et al., 1998). La caveoline-3, principale protéine de structure des caveolae dans les cellules musculaires, est également un élément clef dans la fusion des myoblastes et la formation des myotubes. Une altération des calpaines est à l'origine de nombreuses maladies humaines (diabète, maladie d'Alzheimer et dystrophies musculaires (Galbiati et al., 1999)) où sont également impliquées les caveolae. Nous avons donc émis l'hypothèse que les calpaines pouvaient être associées à ces vésicules dans les myoblastes et ainsi jouer un rôle dans la signalisation cellulaire médiée par les caveolae, hypothèse qui s'est avérée renforcée par la mise en évidence de la présence des calpaines au niveau des caveolae d'autres types cellulaires.*

*Récemment, il a été démontré la localisation de la PKC $\alpha$  au niveau de ces organites, cette localisation étant associée à sa « down-régulation ». La protéine MARCKS, substrat privilégié des PKC $\alpha$  co-localise également avec ces vésicules spécialisées dans les cellules neuronales (Morash et al., 2000). Par ailleurs,*

*MARCKS a récemment été classée dans la catégorie des "PIP2 raft modulating proteins", laquelle régulerait le cytosquelette d'actine et le trafic membranaire (Laux et al., 2000). En outre, sa phosphorylation par la PKC $\alpha$  entraîne son détachement de la membrane et sa dégradation partielle par les calpaines, ces événements facilitant le processus de fusion des myoblastes (Dulong et al. 2004).*

*Après avoir isolé et caractérisé les caveolae, nous avons donc identifié les acteurs du système protéolytique calcium-dépendant présents au niveau de ces vésicules, tout en confirmant la présence de la PKC $\alpha$  et de MARCKS. Nous avons par la suite réalisé une étude visant à mieux appréhender l'orientation et l'agencement des protéines sus-citées par rapport à la membrane des caveolae. Nous avons également observé l'incidence de l'inhibition de la biosynthèse du cholestérol sur les relations calpaines/caveolae et sur la fusion des myoblastes. Enfin une étude protéomique sur la fraction cavéolaire des cellules musculaires a permis l'identification de nombreuses protéines associées à ces vésicules.*

*Dans une seconde partie, nous avons montré que l'activation "in situ" des calpaines au niveau des caveolae induisait la protéolyse de la PKC $\alpha$  et la translocation de MARCKS vers le compartiment cytosolique. Enfin, une analyse protéomique différentielle à partir de gels bidimensionnels a été conduite dans le but d'identifier de nouveaux substrats des calpaines.*

## *1<sup>ère</sup> partie*

### **Association de la m-calpaïne ainsi que deux de ses substrats (PKC $\alpha$ et MARCKS) avec les *caveolae***

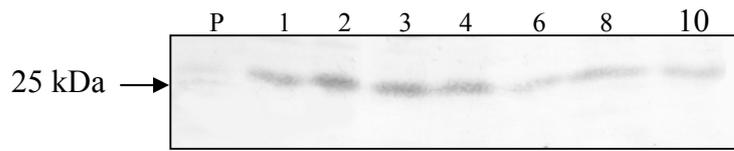
#### **I – CARACTERISATION DES *CAVEOLAE* DANS LA LIGNEE C2C12**

##### **I - 1) Mise en place des cavéolines au cours de la myogenèse**

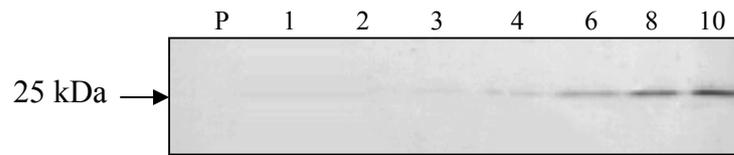
Les cavéolines sont les marqueurs protéiques des *caveolae*. Une étude préliminaire visant à observer la mise en place des cavéolines-1 (protéine la plus abondante et ubiquitaire) et 3 (présente uniquement dans la cellule musculaire) apparaissait donc instructive. Cette étude avait également pour but de choisir un stade adéquat de la différenciation pour la réalisation des expériences d'isolement des *caveolae* à partir des myoblastes en culture.

Les variations quantitatives des cavéolines sont suivies par immunorévélation au cours de la différenciation musculaire. Il apparaît très clairement une mise en place décalée des cavéolines-1 et 3 (figure 19). La cavéoline-1 apparaît la première, elle est présente de façon précoce, dès la prolifération, puis augmente de manière conséquente au jour 2 (73%), ensuite la quantité de cavéoline-1 diminue jusqu'au jour 6 pour se stabiliser (J 6 à J 10). La cavéoline-3 apparaît au jour 3 puis augmente linéairement jusqu'au dixième jour de culture. Les résultats observés, à savoir une augmentation de l'expression de la cavéoline-3 en début de fusion (en corrélation avec celle-ci) sont en accord avec ceux de Galbiati et *al.* (1999) qui ont montré que la cavéoline-3 est impliquée dans la différenciation des myoblastes et la formation des myotubes. Par ailleurs, ces résultats indiquent que, dans nos conditions expérimentales, les deux types de cavéolines-1 et 3 sont co-exprimées à partir du troisième jour de culture : *nous avons choisi le jour 6 pour les expérimentations suivantes.*

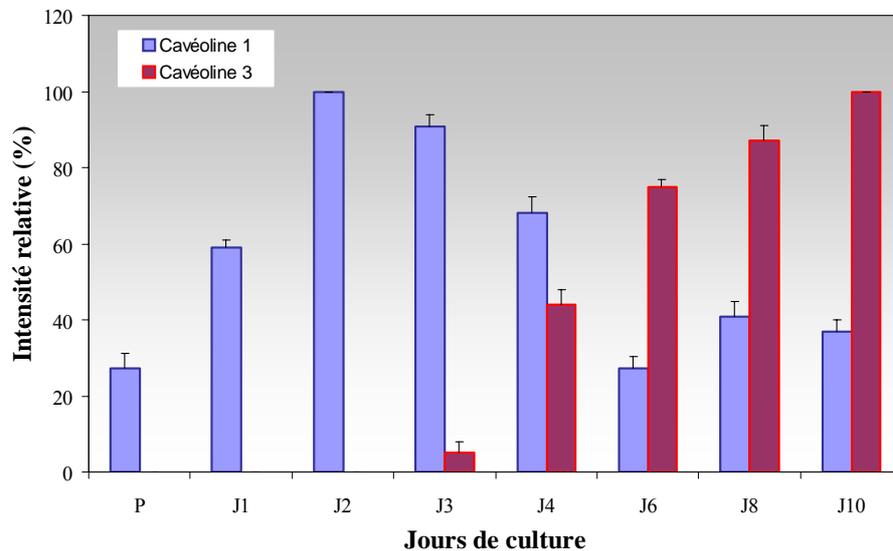
**A - Cavéoline-1**



**B - Cavéoline-3**



**C.**



**Figure 19 : Evolution quantitative de la cavéoline-1 (A) et de la cavéoline-3 (B) au cours de la différenciation musculaire**

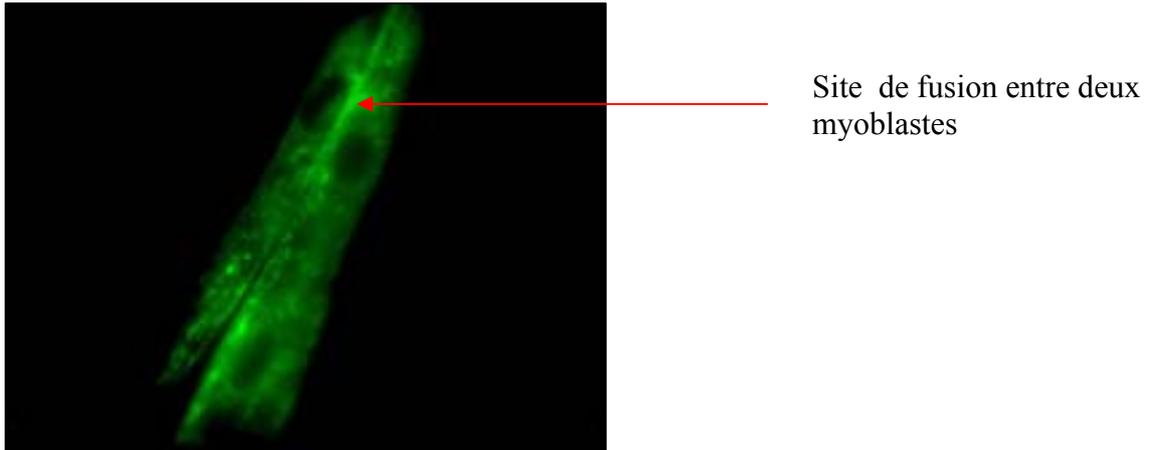
Des extraits cellulaires (100 µg de protéine) à différents stades de culture sont soumis à un "SDS-PAGE" et transférés sur membrane d'Immobilon. L'immunorévélation est réalisée en utilisant des anticorps polyclonaux (Santa-Cruz) dirigés contre la cavéoline-1 (dilution 1/500) et monoclonaux dirigés contre la cavéoline-3 (dilution 1/250) selon la technique décrite dans le chapitre "Matériel et Méthodes". Le jour P correspondant à la mise en différenciation.

**A, B : Immunorévélation.**

**C : Quantification par vidéo-densitométrie.**

L'intensité des signaux est exprimée en pourcentage par rapport à celle obtenue au stade le plus exprimé. Les valeurs correspondent à la moyenne ± l'erreur standard à la moyenne (n = 3).

L'observation microscopique présentée figure 20 montre une localisation membranaire de la cavéoline-3, ce qui est en accord avec les résultats d'Engelman *et al.* (1998). D'autre part Volonte *et al.* (2003) ont montré l'importance de la cavéoline-3 dans la fusion des myoblastes. Nos résultats sont en adéquation avec ces données puisqu'ils montrent bien une répartition majoritaire au niveau des sites de fusion des myoblastes.



**Figure 20 : Localisation par immunofluorescence de la protéine cavéoline-3**

Suite à la culture, les cellules sont fixées après 6 jours de différenciation et incubées en absence ou en présence d'anticorps dirigés contre la protéine cavéoline-3. Une deuxième incubation est ensuite réalisée en présence d'anticorps couplés à la FITC. L'observation est réalisée par microscopie de fluorescence au grossissement X1000.

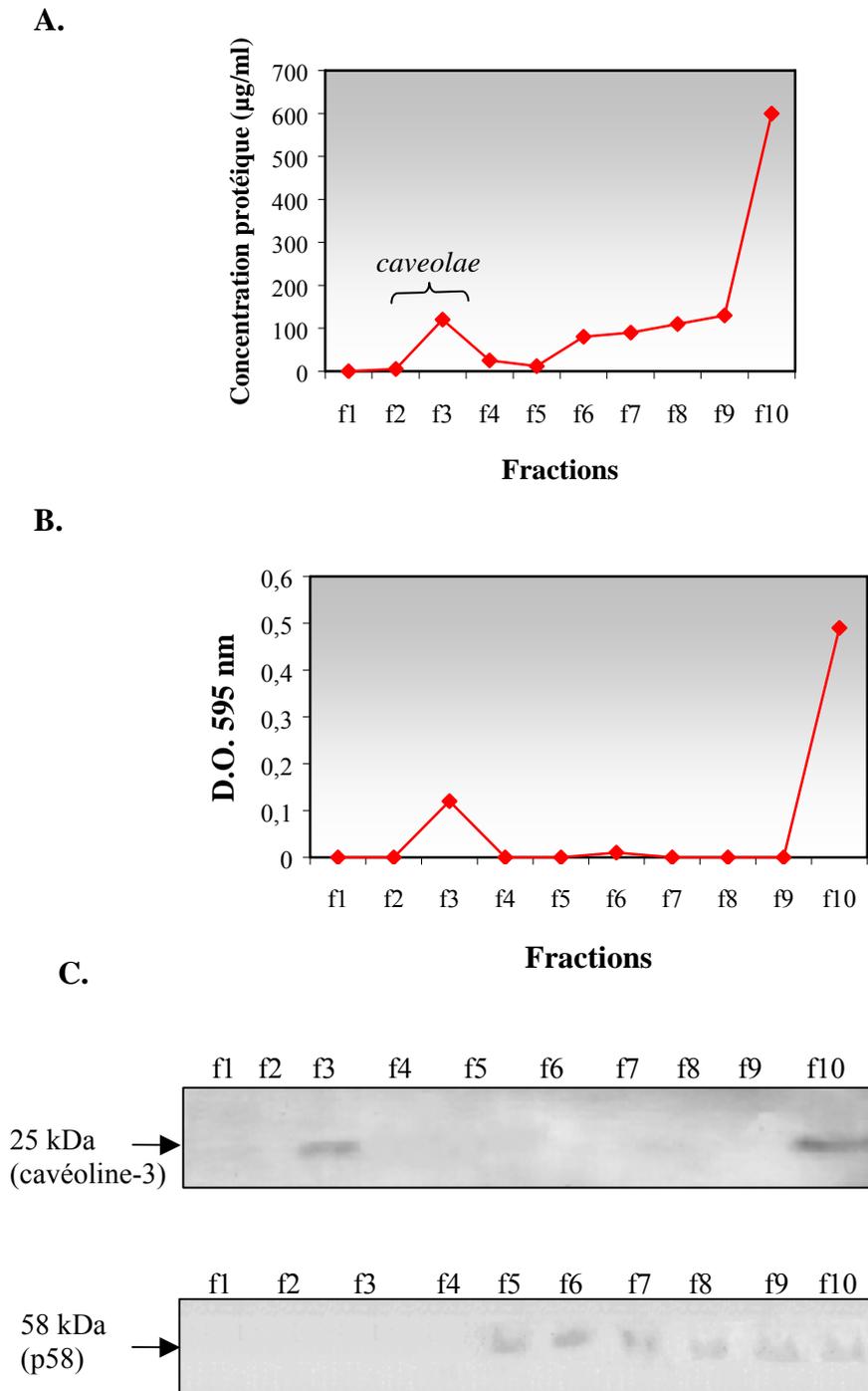
### **I - 2) Isolement des *caveolae* par ultracentrifugation**

Après solubilisation, le lysat est ajusté à 45 % de saccharose puis soumis à un fractionnement sur un gradient discontinu de saccharose. Le fractionnement est basé sur les propriétés physico-chimiques des *caveolae*, à savoir leurs faibles densités (dus à leurs fortes concentrations en cholestérol et glycosphingolipides). La figure 21 A montrent que la majorité des protéines cellulaires est retrouvée dans les fractions 6 à 10 (f6-f10) ou sédimentent dans le fond du tube sous forme de culot.

Une petite quantité de protéine (représentant moins de 10 % des protéines totales) est retrouvée au niveau de la fraction 3 (f3). Ces protéines se trouvent à l'interface entre les couches 5 % et 43 %. Ceci est également mis en évidence par une augmentation de la densité optique dans cette même fraction (figure 21 B).

Les fractions sont alors analysées par Western-blot et immunorévélées avec des anticorps anti-cavéoline-3. La figure 21 C montre la présence de cette protéine dans la fraction 3, ceci venant étayer le fait que cette fraction soit enrichie en *caveolae*. Cependant cette protéine est également présente dans la fraction 10, ce qui s'explique soit par une lyse incomplète des cellules, soit par une localisation autre de la cavéoline-3.

L'appareil de Golgi étant le constituant cellulaire de plus faible densité après les *caveolae*, nous avons ensuite immunorévélé la protéine p58, protéine spécifique de l'appareil de Golgi. En accord avec les résultats de Meacci et *al.* (2000), p58 est présente dans les fractions 5 à 10 et non dans la fraction 3 (figure 21 C).



**Figure 21 : Isolement des caveolae après ultracentrifugation sur gradient de saccharose**

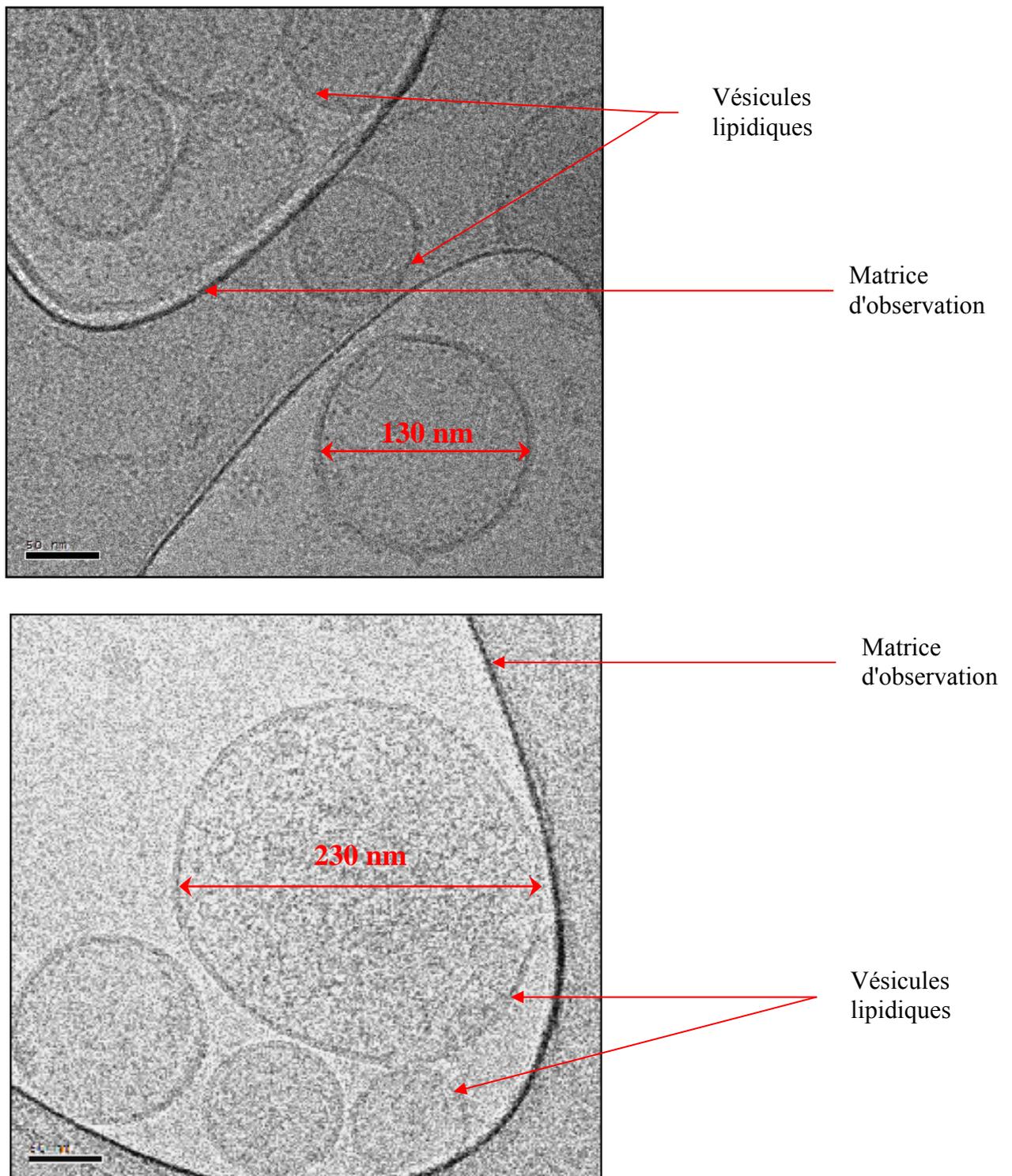
Après avoir lysé les cellules par potterisation, les protéines sont fractionnées par ultracentrifugation sur gradient de saccharose comme décrit dans la partie "Matériel et Méthodes". **A** : Quantification de la concentration protéique par la méthode de Bradford. **B** : Mesure de l'absorbance à 595 nm. **C** : Immunorévélation de la cavéoline-3 et de p58 à partir des fractions obtenues après ultracentrifugation (1/500 ; anticorps Santa-Cruz).

*En conclusion, au vu de la faible quantité de protéine présente dans la fraction 3 (excluant plus de 90 % des protéines totales), et d'après la représentation différentielle des protéines cavéoline-3 et p58, les résultats présentés figure 21 démontrent que notre protocole expérimental a correctement séparé les protéines associées aux caveolae des autres protéines cellulaires.*

Il faut également signaler que d'autres contrôles ont été réalisés (purification par culottage et saponification), mais pour une meilleure compréhension, ces résultats sont présentés dans le chapitre suivant intitulé "Mise en évidence d'une association de la m-calpaïne, de la PKC $\alpha$  et de MARCKS au niveau des *caveolae*".

### **I - 3) Observation par microscopie électronique de la fraction cavéolaire**

La figure 22 met en évidence une préparation dense en vésicules lipidiques. On observe une très grande majorité de vésicules dont la taille varie de 50 nm à 130 nm, ce qui est conforme aux résultats observés dans la littérature (Krajewska et Maslowska, 2004 ; Razani et Lisanti, 2001 ; Smart et *al.*, 1999 ; van Deurs et *al.*, 2002). Ces résultats appuient le fait que la technique utilisée permet un enrichissement significatif des *caveolae* à partir des cellules musculaires. On remarque la présence de quelques vésicules de taille supérieure (environ 230 nm), ces vésicules pourraient être des cavéosomes (Nabi et Le, 2003), leurs formations et leurs fonctions ne sont pas élucidées à l'heure actuelle. Nous excluons le fait qu'il s'agisse d'autres types de rafts. En effet, bien que les données soient confuses dans la littérature scientifique, les dernières publications font état de vésicules beaucoup plus petites que les *caveolae* (taille inférieure à 15 nm) (Kusumi et Suzuki, 2006).



**Figure 22 : Observation de la fraction 3 (après fractionnement) par cryomicroscopie électronique**

La fraction 3 obtenue après ultracentrifugation, (100 µg de protéine environ) est centrifugée à 40 000 g, repris dans 100 µL de tampon puis observée en cryomicroscopie électronique.

Cette étude a été réalisée au Laboratoire d'Imagerie Moléculaire et Nano-Bio-Technologie, IECB, UMR CNRS 5471 (Université Bordeaux 1, Alain Brisson et Olivier Lambert).

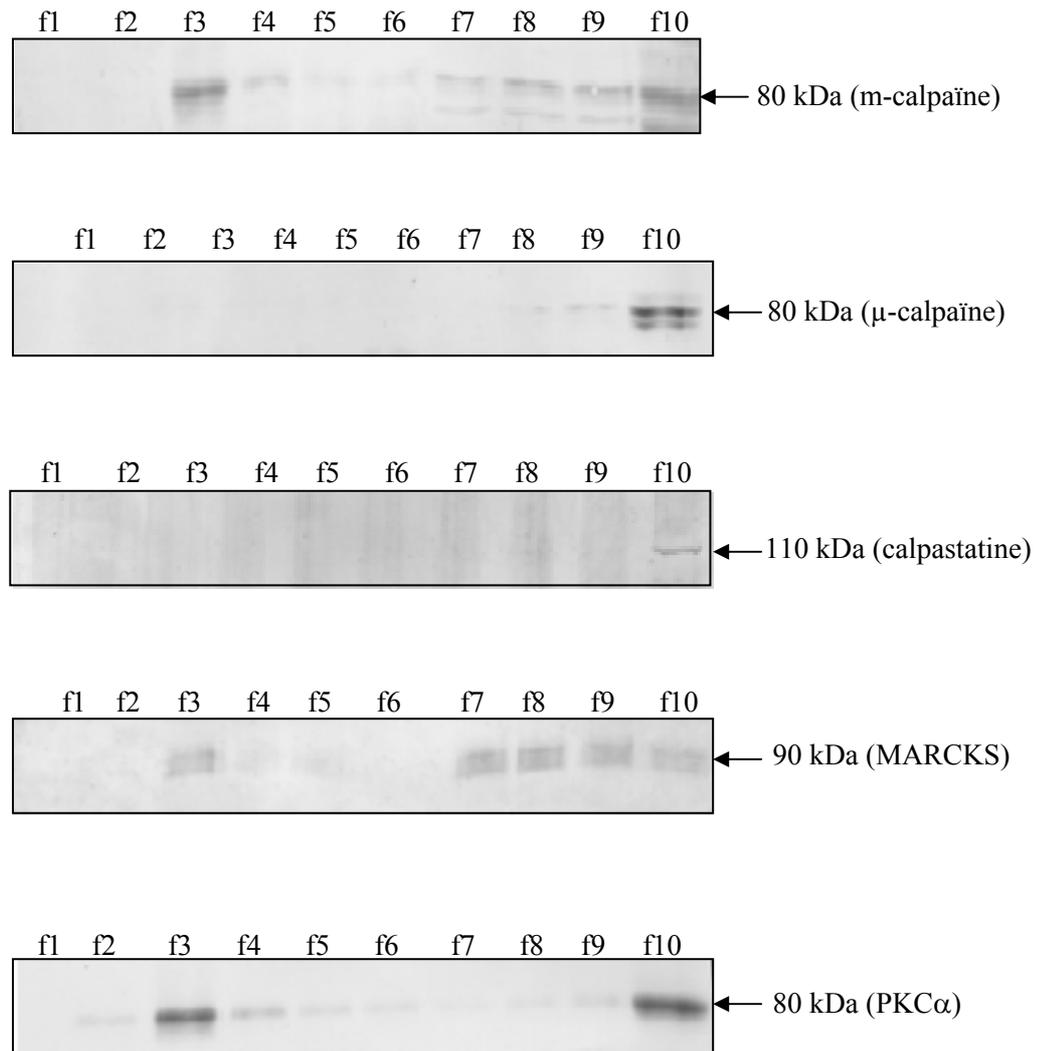
## **II – MISE EN EVIDENCE D'UNE ASSOCIATION DE LA M-CALPAINE, DE LA PKC $\alpha$ ET DE MARCKS AU NIVEAU DES CAVEOLAE**

### **II - 1) Mise en évidence du co-fractionnement par Western-blot**

Nous avons examiné la distribution des calpaïnes, de leur inhibiteur spécifique : la calpastatine et de certains de leurs substrats : PKC $\alpha$  et MARCKS.

La figure 23 montre la présence de la m-calpaïne, de la PKC $\alpha$  et de MARCKS dans la fraction cavéolaire. Par contre, la  $\mu$ -calpaïne et la calpastatine ne sont pas présentes dans la fraction 3 (f3) mais sont détectées dans la fraction 10 (f10). La m-calpaïne qui présente une localisation différentielle de son inhibiteur endogène ne serait pas régulée par celui-ci au niveau des *caveolae*. Par ailleurs, la localisation différente des deux protéases suggère un rôle différent pour chacune d'elle. Mais surtout, la co-localisation de la PKC $\alpha$ , de MARCKS et de la m-calpaïne permet d'envisager la capacité d'action de cette dernière sur ces substrats au niveau des *caveolae* lors de la myogenèse. Ces résultats sont en accord avec ceux de Morford et al. (2002) qui montrent une association de la m-calpaïne au niveau des *caveolae* dans les cellules lymphoblastoïdes T humaines, au contraire de la  $\mu$ -calpaïne. De la même façon, Kifor et al. (2003) montrent que la localisation de la m-calpaïne au niveau des *caveolae* pourrait contribuer à la régulation du niveau d'expression de la protéine "calcium-sensing receptor" dans les cellules parathyroïdes.

Dans un deuxième temps, divers contrôles ont été réalisés afin de confirmer l'association des trois protéines et des *caveolae*.



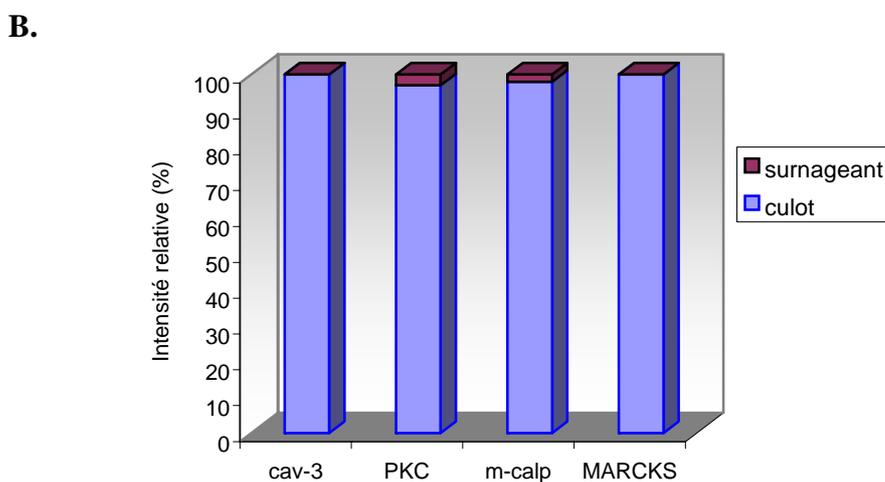
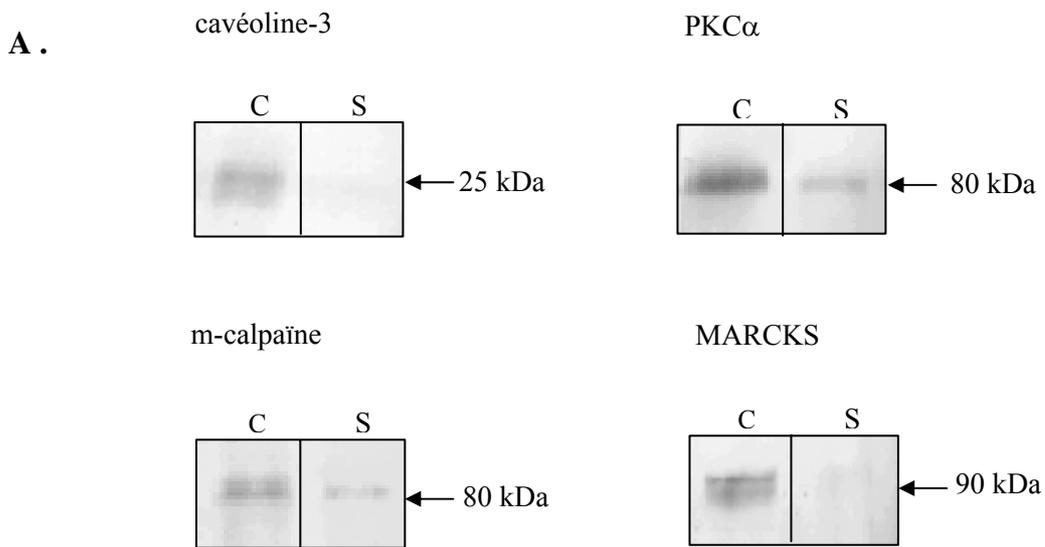
**Figure 23 : Co-fractionnement de la m-calpaïne, de la PKC $\alpha$  et de MARCKS au niveau de la fraction cavéolaire après ultracentrifugation sur gradient de saccharose**

Immunorévélation des protéines m-calpaïne (anticorps Santa-Cruz, dilution 1/1000),  $\mu$ -calpaïne (anticorps Chemicon, dilution 1/10 000), calpastatine (anticorps Santa-Cruz, dilution 1/500), MARCKS (anticorps Santa-Cruz, dilution 1/500), PKC $\alpha$  (anticorps Santa-Cruz, dilution 1/1000) à partir des fractions (0,5 mL) obtenues après ultracentrifugation.

## II - 2) Elimination des protéines cytosolubles

La fraction 3 obtenue après ultracentrifugation est soumise à une étape de centrifugation à 40 000 g. En effet dans ces conditions, les *caveolae* sont connues pour sédimenter dans le culot alors que les protéines cytosolubles restent dans le surnageant (Rybin et *al.*, 1999).

Les expériences de Western-blot réalisées par la suite (figure 24) indiquent que 95 % à 100 % des protéines sont retrouvées dans le culot, ce qui confirme la sédimentation des *caveolae*. Il apparaît que la PKC $\alpha$  et la m-calpaïne sont très minoritaires dans le surnageant, MARCKS est quant à elle totalement absente. La m-calpaïne, la PKC $\alpha$  et MARCKS ne sont donc pas cytosolubles et copurifient bien avec les *caveolae*.

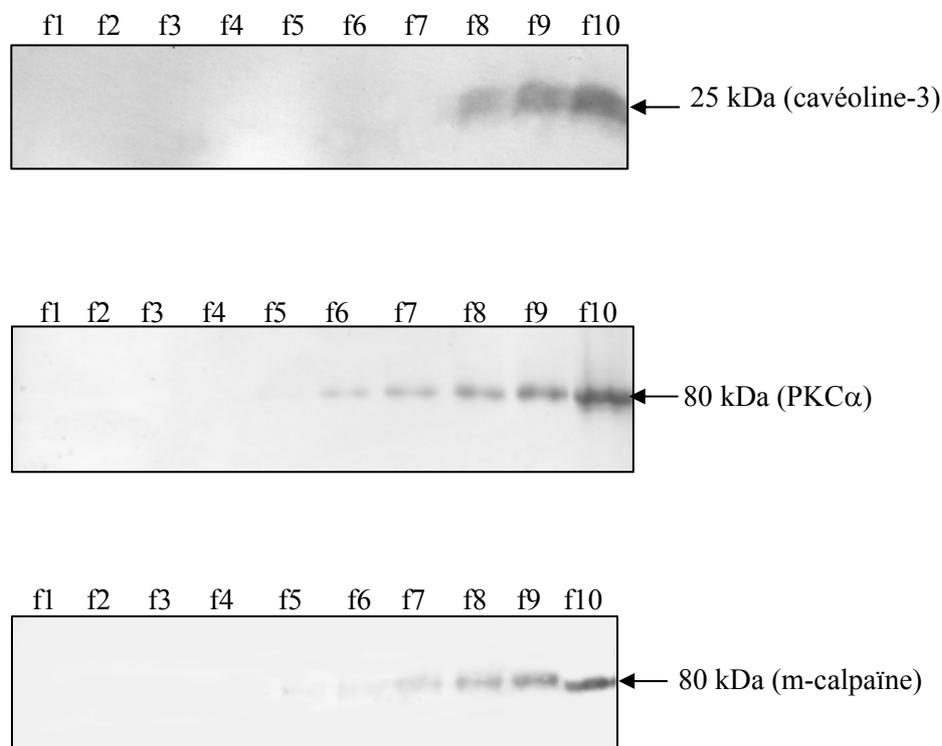


**Figure 24 : Purification des caveolae par culottage**

La fraction 3 (obtenue après ultracentrifugation) correspondant aux *caveolae* (100  $\mu$ g de protéine environ) est centrifugée à 40 000 g pendant 1 heure à 4°C. Les protéines sont ensuite immunorévélées avec les anticorps correspondants selon la méthode décrite dans le "Matériel et Méthodes". (C : culot ; S : surnageant). **A** : Immunorévélation. **B** : Quantification (n=3).

### II – 3) Traitement *in vitro* par la saponine

Nous avons, par la suite, réalisé un traitement *in vitro* par la saponine, traitement connu pour détruire les *caveolae* par dégradation du cholestérol (Chamberlain et *al.*, 2001). Les résultats présentés figure 25 montrent bien une destruction des vésicules, la cavéoline-3 n'est plus retrouvée dans la fraction 3 mais dans les fractions 8 à 10. Il en est de même pour les protéines associées. La dépendance vis-à-vis du cholestérol pour ces protéines est un argument supplémentaire allant dans le sens de leurs associations avec ces vésicules lipidiques. La validité de la méthode utilisée pour l'isolement des *caveolae* est ainsi confirmée.

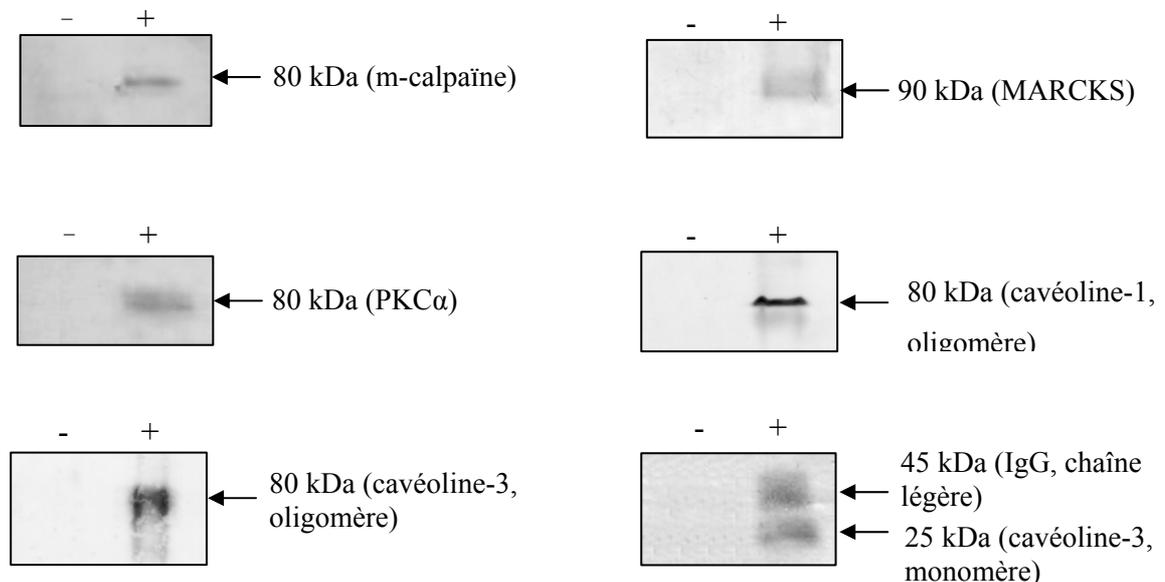


**Figure 25 : Fractionnement sur gradient de saccharose des protéines PKC $\alpha$ , m-calpaïne et cavéoline-3 après traitement par la saponine**

Le fractionnement est réalisé comme précédemment mais le lysat cellulaire est mélangé avec 0.5 % (P/V) de saponine.

## II – 4) Immunoprécipitations magnétiques en présence d'un anticorps anti-cavéoline-3

Enfin, des expériences d'immunoprécipitations magnétiques en présence d'anticorps anti-cavéoline-3 ont été réalisées. La fraction 3 contenant les *caveolae* est immunoprécipitée en présence d'anticorps anti-cavéoline-3 et ceci dans le but d'obtenir l'ensemble des protéines associées aux *caveolae*. Les résultats présentés figure 26 confirment la présence de la cavéoline-3 sous deux formes : monomère et oligomère ; l'oligomère cavéoline-1 est également mis en évidence. Ils confirment par ailleurs une association entre la cavéoline-3 et les protéines m-calpaïne, MARCKS et PKC $\alpha$  et complètent ceux de Meacci et *al.* (2000) qui ont montré par la même méthodologie une association entre la cavéoline-3 et la PKC $\alpha$  sur la lignée C2C12. Les co-immunoprécipitations des trois protéines avec la cavéoline-3 permettent d'envisager la présence d'un complexe entre ces protéines. Mais surtout, cette stratégie démontre la spécificité d'association de ces protéines au niveau des *caveolae* et non au niveau d'autres types de "rafts".



**Figure 26 : Immunorévélations des protéines m-calpaïne, cavéolines, PKC $\alpha$  et MARCKS après immunoprécipitations magnétiques par les anticorps anti-cavéoline-3**

Analyses réalisées par Western-blot des protéines m-calpaïne, PKC $\alpha$ , cavéoline-1, cavéoline-3 et MARCKS après immunoprécipitations magnétiques de la fraction 3 avec des anticorps anti-cavéoline-3.

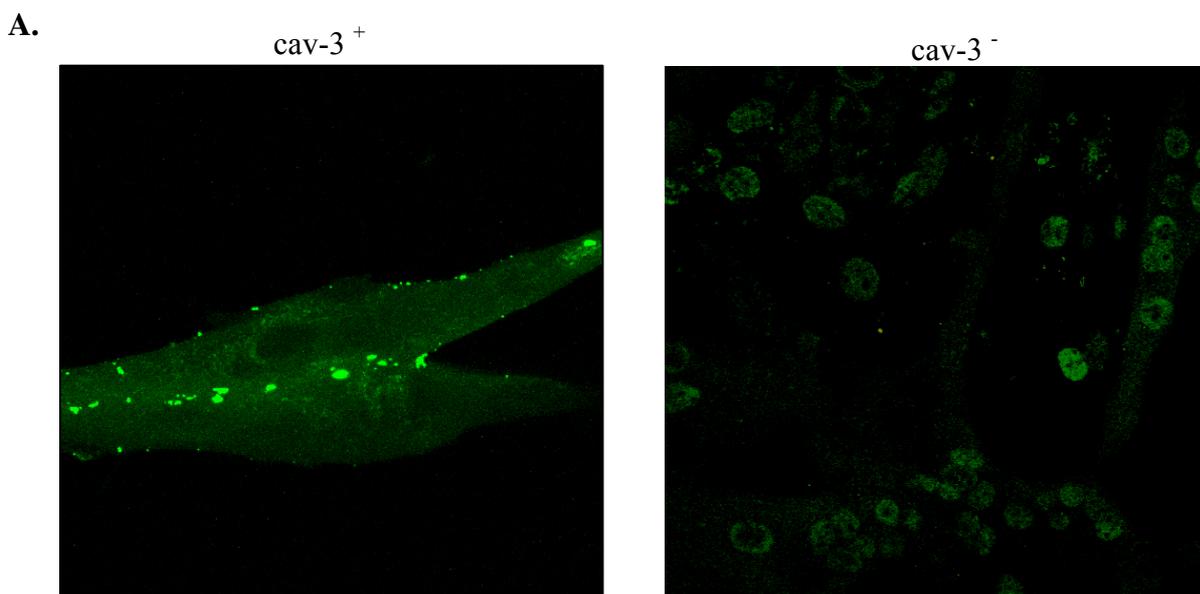
- : Témoin négatif (Ig G non immunes)

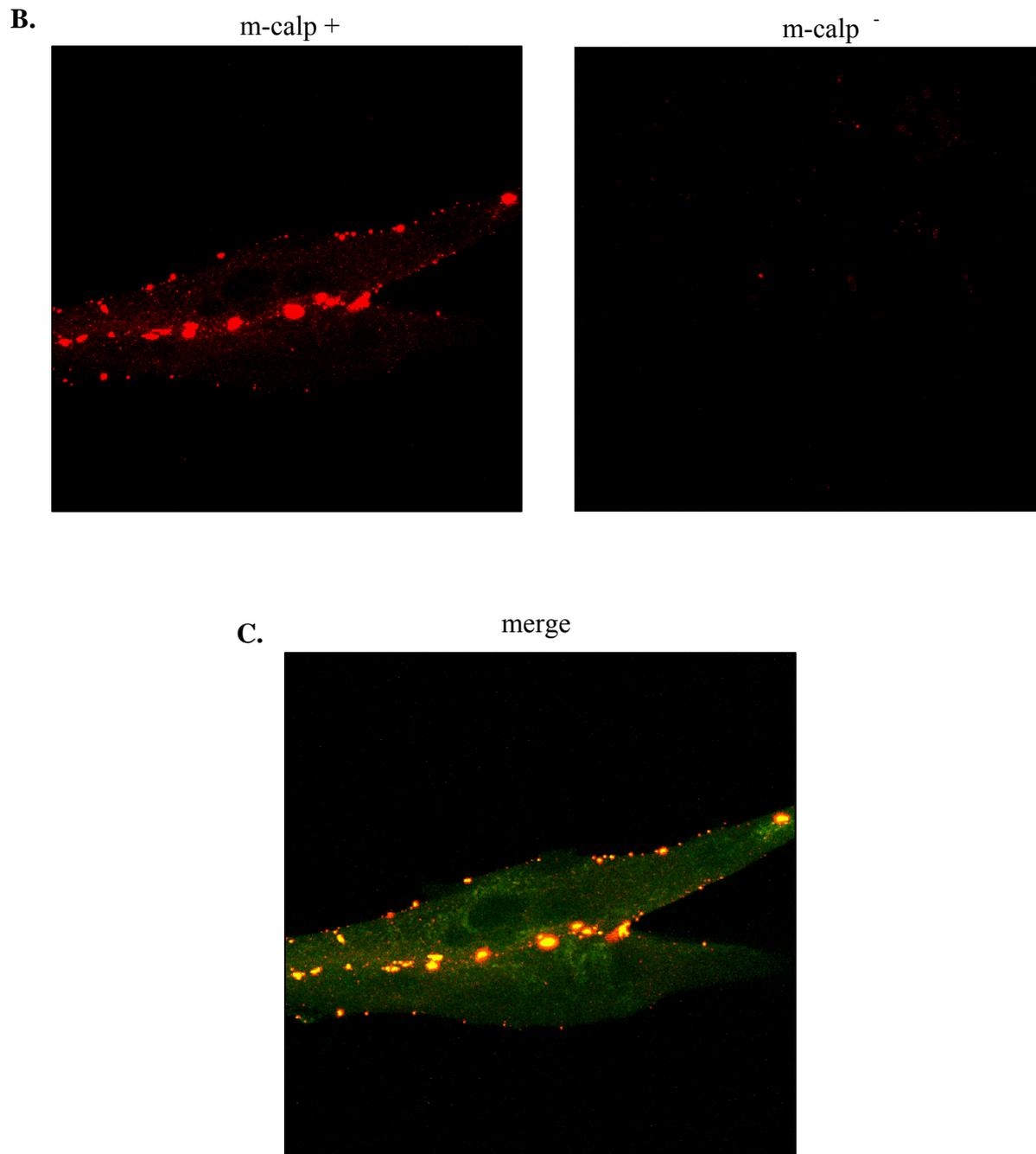
+ : Anticorps anti-cavéoline-3

## II – 5) Colocalisation de la m-calpaïne et de la cavéoline-3 dans les cellules C2C12 au cours de la fusion des myoblastes

Après une première approche de localisation de la cavéoline-3 par immunofluorescence, nous avons réalisé des expériences de co-immunolocalisation de la m-calpaïne et de la cavéoline-3 par microscopie confocale et ce afin de confirmer définitivement la présence de la m-calpaïne au sein des *caveolae*. La figure 27 représente deux myotubes qui fusionnent. Les résultats présentés figure 27A confirment les précédents (figure 20) et montrent une localisation membranaire de la cavéoline-3 et plus spécifiquement une répartition majoritaire au niveau des sites de fusion, en accord avec les résultats d'Engelman et *al.* (1998) et Volonte et *al.* (2003). De plus l'aspect "ponctué" du marquage au niveau membranaire est caractéristique des *caveolae*. Les résultats présentés figure 27B montrent une répartition quasi similaire de la m-calpaïne. La juxtaposition de ces 2 images ou "Merge" réalisée informatiquement confirme la colocalisation des deux protéines cavéoline-3 et m-calpaïne. La présence de la m-calpaïne au niveau des *caveolae* est donc confirmée.

Les témoins négatifs sont réalisés en absence des anticorps primaires. Dans le cas de la cavéoline-3, nous pouvons observer une légère fluorescence inattendue au niveau des noyaux. Cette fluorescence est aspécifique puisqu'elle disparaît en présence des anticorps primaires.





**Figure 27 : Co-localisation des protéines cavéoline-3 et m-calpaïne au cours de la fusion des myoblastes par microscopie confocale**

Après six jours de différenciation, les cellules sont fixées sur leurs supports et incubées en absence ou en présence d'anticorps dirigés contre les protéines cavéoline-3 (1/150) ou m-calpaïne (1/150). Une deuxième incubation est ensuite réalisée en présence d'anticorps couplés au FITC (A) ou au TRITC (B) (dilution 1/100). L'observation est réalisée sur un microscope confocale. (A) cavéoline-3 et témoin (cav-3<sup>-</sup>) ; (B) m-calpaïne et témoin (m-calp<sup>-</sup>); (C) superposition de A et de B (merge). Grossissement X1000.

Après avoir réalisé la co-localisation cavéoline-3/m-calpaïne, nous nous sommes intéressés à la PKC $\alpha$ . Celle-ci présente une répartition majoritaire au niveau des sites de fusion (figure 28) : ces résultats viennent appuyer le fait d'une représentation de la PKC $\alpha$  au niveau des *caveolae*.



***Figure 28 : Immunolocalisation de la protéine PKC $\alpha$  au cours de la fusion des myoblastes par microscopie confocale***

Après six jours de différenciation, les cellules sont fixées sur leurs supports et incubées en présence d'anticorps dirigés contre la protéine PKC $\alpha$  (dilution : 1/150). Une deuxième incubation est ensuite réalisée en présence d'anticorps couplés au FITC. Grossissement X900.

### **III - ETUDE DE L'AGENCEMENT DES PROTEINES D'INTERET AU NIVEAU MEMBRANAIRE**

Après avoir montré la localisation des protéines m-calpaïne, PKC $\alpha$  et MARCKS au niveau des *caveolae*, nous nous sommes attachés à déterminer l'agencement de ces trois protéines par rapport à la membrane cavéolaire. Pour cela, plusieurs types de traitements biochimiques ont été combinés (carbonate de sodium, protéinase K et déoxycholate de sodium). Après purification des vésicules, les traitements sont réalisés *in vitro*.

#### **III - 1) Extraction des protéines extrinsèques par le carbonate de sodium**

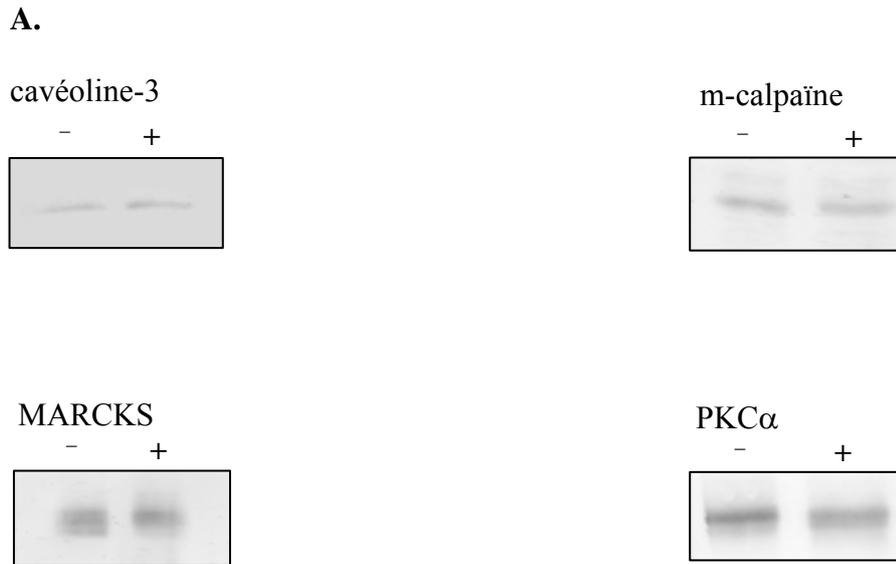
Après avoir purifié les fractions cavéolaires, nous avons réalisé un traitement par le carbonate de sodium, pH=11,5 (figure 29), une centrifugation à 40 000 g est ensuite réalisée pour récupérer les vésicules. Ce traitement est un moyen simple pour différencier les protéines trans-membranaires (ou assimilées : protéines fortement liées à la membrane) des protéines extrinsèques. En effet, compte tenu du pH extrêmement basique il permet l'extraction de toutes les protéines extrinsèques ou faiblement liées à la membrane sans affecter la disposition des protéines transmembranaires ou des protéines ancrées aux lipides. Par ailleurs, ce traitement convertit les vésicules en feuilletts membranaires libérant toutes les autres protéines (Current Protocols in Protein Science). Dans le cas des protéines extrinsèques, le traitement ne permet donc pas de savoir si la protéine est cytosolique, périphérique et/ou à l'intérieur des *caveolae*.

**cavéoline-3** : la totalité de cette protéine est retrouvée dans le culot. Nous savons déjà que cette protéine est en partie **trans-membranaire**, nos résultats sont donc en adéquation avec ces données.

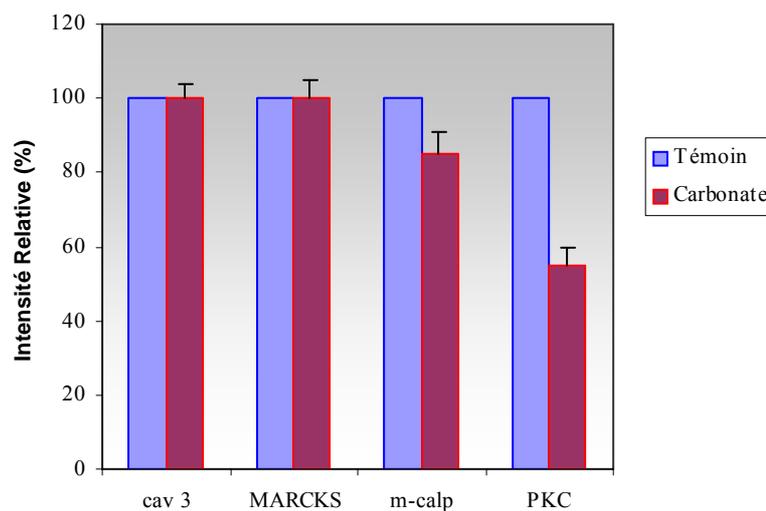
**MARCKS** : les résultats sont similaires et sans équivoque, la MARCKS est une protéine myristoylée (Graff et *al.*, 1989) et comme dans le cas d'une membrane classique, elle est donc fortement ancrée à la membrane cavéolaire.

**m-calpaïne** : environ 85 % de cette protéine étant retrouvé dans le culot, nous pouvons penser que la majorité de cette protéine interagit avec la membrane par l'intermédiaire de liaisons fortes (présomption d'ancrage ou d'interactions de type liaisons hydrophobes avec la membrane des *caveolae*).

**PKC $\alpha$**  : nous constatons une forte diminution de la PKC $\alpha$  dans le culot (45 %). Ces résultats suggèrent que la protéine est associée à la membrane mais faiblement liée à celle-ci : il s'agit donc d'une protéine extrinsèque, périphérique, non trans-membranaire ou assimilée (Hood et *al.*, 2004). Le traitement ne permet pas par ailleurs de savoir si la protéine est cytosolique périphérique et/ou à l'intérieur des *caveolae*.



**B.**



**Figure 29 : Traitement de la fraction 3 (obtenue après ultracentrifugation sur gradient de saccharose) par le carbonate de sodium**

Après ultracentrifugation, la fraction 3 est récupérée et incubée dans 0,2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 11,5 pendant 30 min à 0°C. Celle-ci est ensuite soumise à une centrifugation (40 000 g, 1 heure, 4°C). Le culot est ensuite solubilisé dans du SDS puis analysé par Western-blot.

**A.** Immunorévélation des protéines cavéoline-3, MARCKS, m-calpaïne, PKCα .

**B.** Quantification par vidéo-densitométrie.

L'intensité des signaux est exprimée en pourcentage par rapport au témoin. Les valeurs correspondent à la moyenne ± l'erreur standard à la moyenne (n = 3).

### **III - 2) Traitement *in vitro* par la protéinase K et le déoxycholate de sodium : détermination de l'orientation (cytosolique ou interne) des protéines par rapport à la membrane des *caveolae***

Le traitement par le carbonate de sodium ne nous renseignant que partiellement sur l'agencement des protéines, nous avons réalisé deux autres traitements visant à déterminer l'orientation des protéines (figure 30). La protéinase K est une enzyme qui clive les protéines accessibles (à savoir sur la face cytosolique) ; le déoxycholate de sodium perméabilise la membrane des *caveolae* permettant ainsi la libération des protéines se situant à l'intérieur des vésicules. De plus, le déoxycholate de sodium complète le traitement par le carbonate de sodium puisqu'il solubilise les protéines fortement ancrées à la membrane sans avoir d'effet sur les protéines transmembranaires.

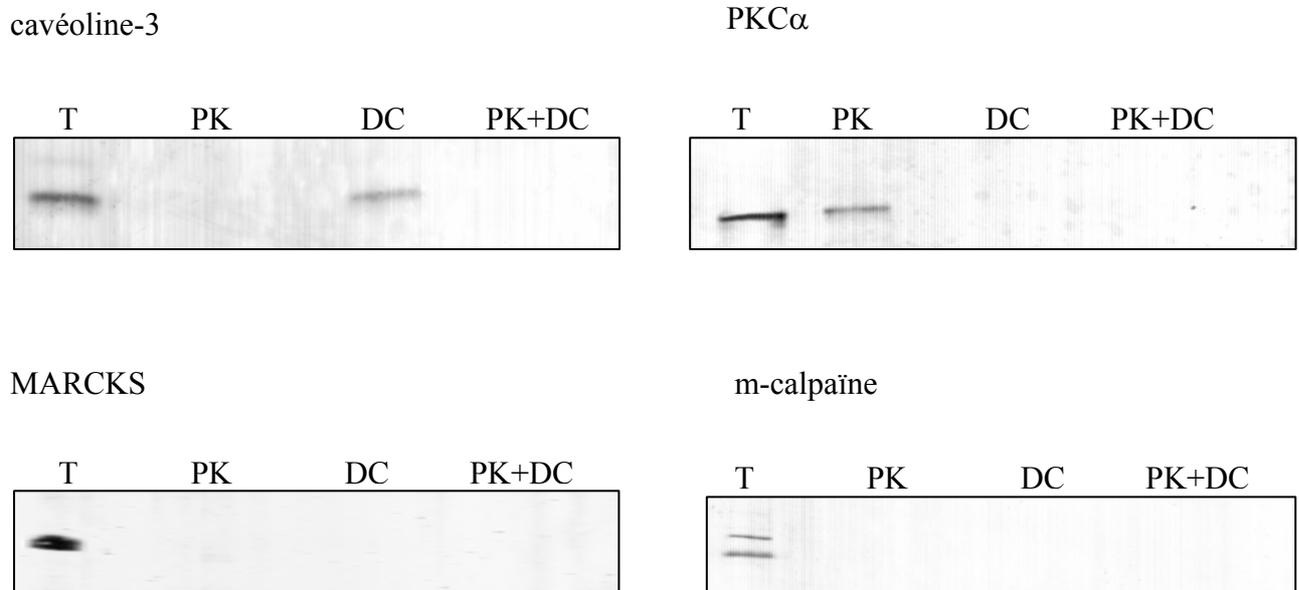
**cavéoline-3** : conformément aux données bibliographiques (Galbiati et *al.*, 2001 ; Schlegel et Lisanti, 2001), le traitement avec la protéinase K dégrade la totalité de la cavéoline-3, qui est accessible et donc située sur la face cytosolique. Après traitement par le déoxycholate de sodium, une partie de la cavéoline-3 n'est pas solubilisée, la protéine est donc transmembranaire.

**MARCKS et m-calpaïne** : le traitement par la protéinase K dégrade la totalité de ces deux protéines, elles sont de ce fait situées sur la face cytosolique. Le traitement par le déoxycholate de sodium entraîne la solubilisation complète des deux protéines, celles-ci ne sont donc pas trans-membranaires mais fortement liées à la membrane. Ces résultats sont tout à fait conformes aux données bibliographiques.

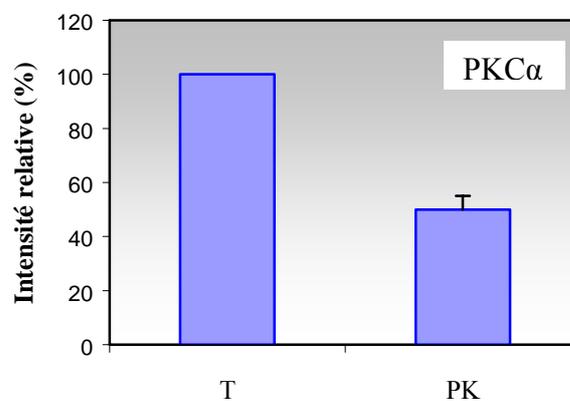
**PKC $\alpha$**  : après traitement par la protéinase K, 50 % de la PKC $\alpha$  est dégradée, cette dernière, accessible au traitement est située sur la face cytosolique. Cependant l'autre fraction de la PKC $\alpha$ , résistante à la protéinase K, est libérée suite au traitement par le déoxycholate de sodium. L'autre moitié de la PKC $\alpha$  serait donc localisée à l'intérieur des *caveolae*.

Après avoir réalisé ces divers traitements biochimiques, nous pouvons proposer le modèle présenté figure 31 en ce qui concerne l'agencement des protéines MARCKS, PKC $\alpha$ , m-calpaïne, et cavéoline-3 par rapport aux *caveolae*.

**A.**



**B.**



**Figure 30 : Traitement de la fraction 3 (obtenue après ultracentrifugation sur gradient de saccharose) par la protéinase K ou/et le déoxycholate de sodium**

Après ultracentrifugation, les fractions 3 sont récupérées et incubées dans 0,5  $\mu\text{g/mL}$  de protéinase K, et/ou 0,1% déoxycholate de sodium pendant 20 min à 37°C. Celles-ci sont ensuite soumises à une centrifugation (40 000 g, 1 heure, 4°C). Les culots sont ensuite repris dans du SDS et analysés.

**A.** Immunorévélation des protéines cavéoline-3, MARCKS, m-calpaïne, PKC $\alpha$  .

**B.** Quantification par vidéo-densitométrie de la PKC $\alpha$  après traitement par la protéinase K (T : témoin ; PK : protéinase K). L'intensité des signaux est exprimée en pourcentage par rapport au témoin. Les valeurs correspondent à la moyenne  $\pm$  l'erreur standard à la moyenne (n = 3).

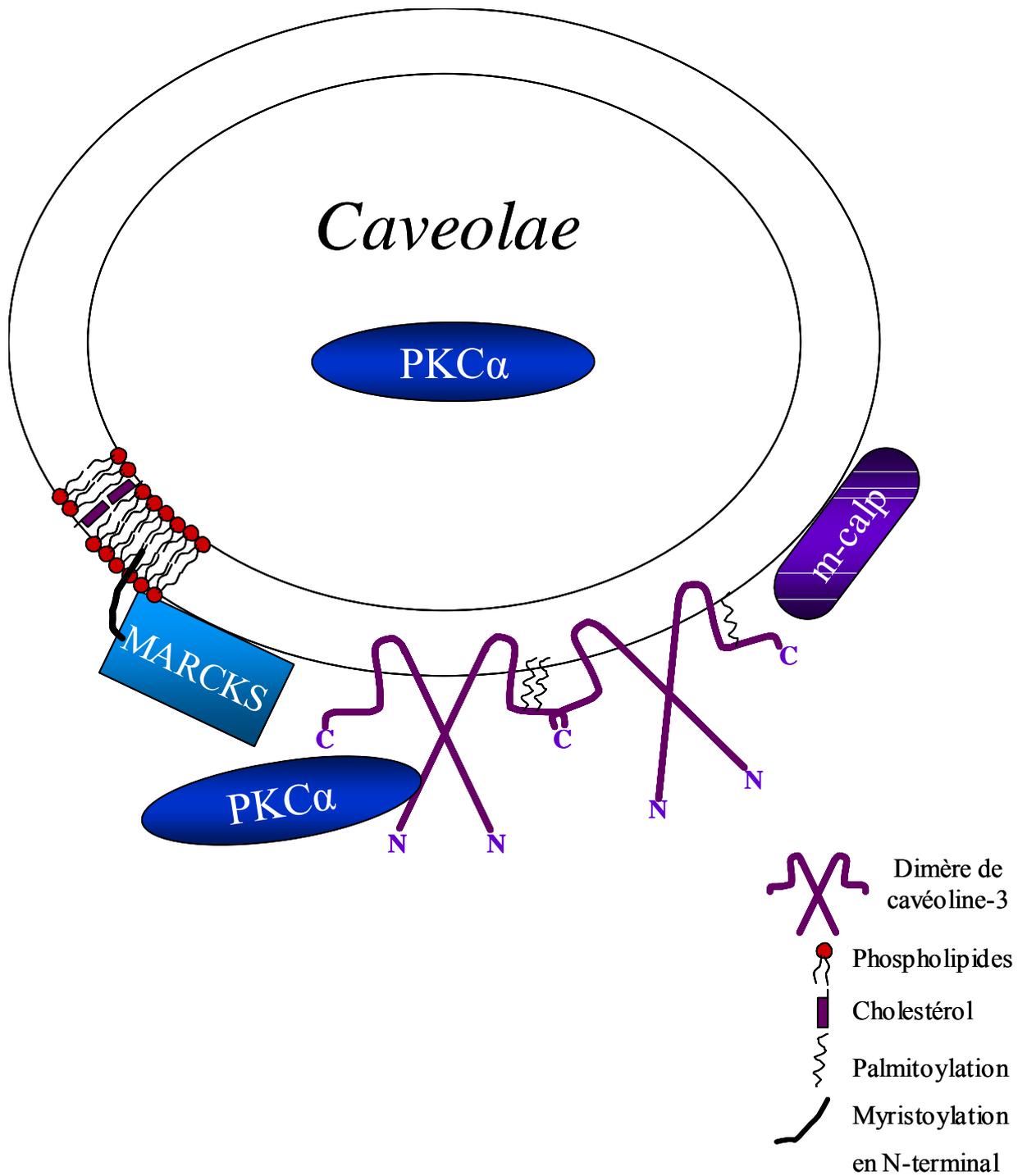


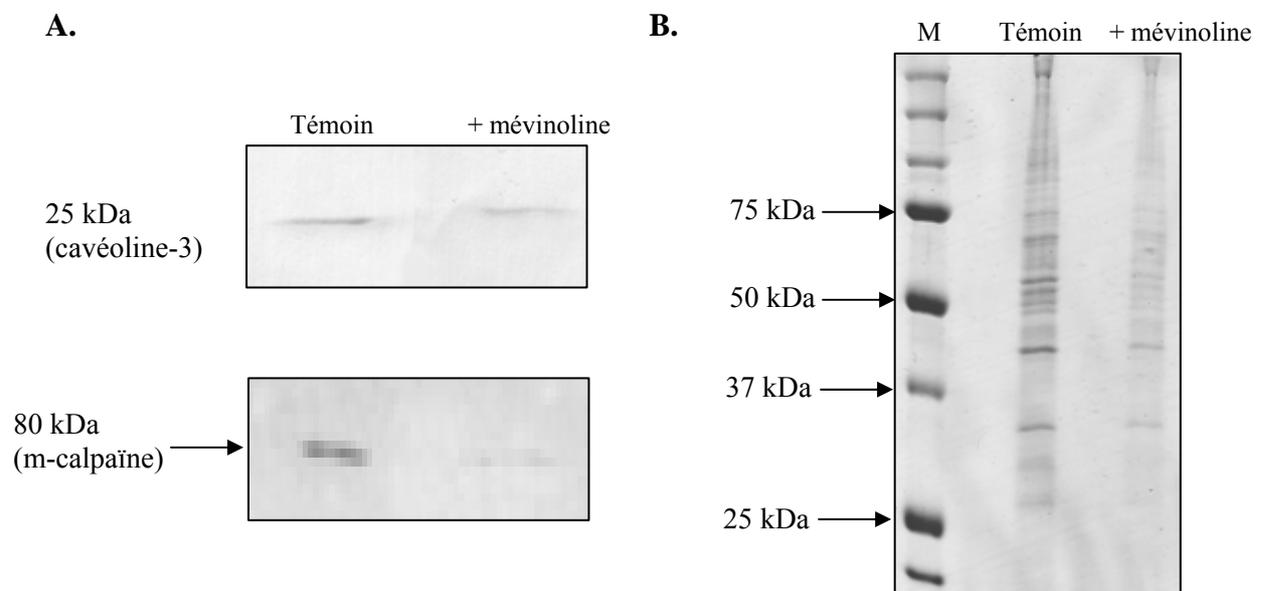
Figure 31 : Modèle hypothétique d'association des protéines cavéoline-3, MARCKS, m-calpaïne et PKC $\alpha$  avec les caveolae

## IV - EFFET DE L'INHIBITION DE LA BIOSYNTHESE DU CHOLESTEROL SUR LES INTERACTIONS ENTRE CALPAÏNES ET CAVEOLAE

Le cholestérol étant fortement représenté au niveau des *caveolae* et nécessaire à leurs formations (Chamberlain *et al.*, 2000 ; Hailstones *et al.*, 1998 ; Quest *et al.*, 2004), nous avons étudié l'incidence de l'inhibition de sa biosynthèse sur la formation des vésicules, sur la fusion des myoblastes et sur la localisation cellulaire de la m-calpaïne.

### IV - 1) Incidence sur l'intégrité des *caveolae*

Après traitement des cellules par l'inhibiteur de la biosynthèse du cholestérol (la mévinoline) selon le protocole de Chamberlain *et al.* (2000), les *caveolae* sont isolées et analysées sur gel de polyacrylamide comme décrit dans le "Matériel et Méthodes". La figure 32 B montre une diminution de la quantité de protéines totales présentes dans la fraction 3, cette diminution est corrélée à une diminution de 59 % du taux de cavéoline-3 et de 60 % du taux de m-calpaïne (figure 32 A). Ces résultats confirment bien que le cholestérol est nécessaire à la formation des *caveolae*.



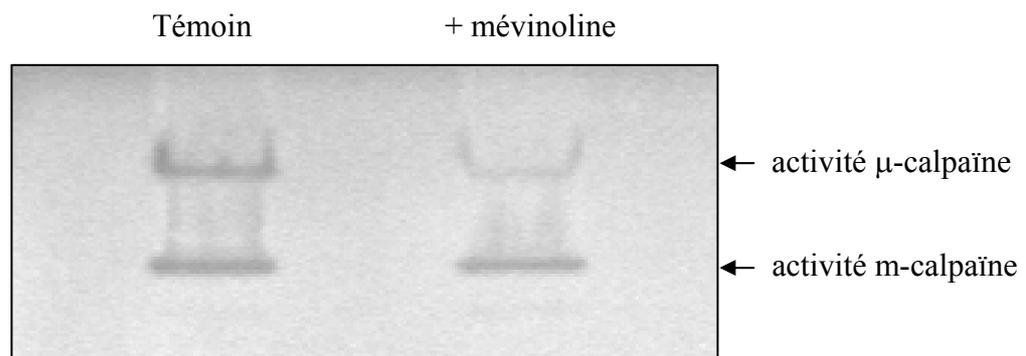
**Figure 32 : Effet de l'inhibition de la biosynthèse du cholestérol sur l'intégrité des *caveolae*.**

Après traitement des cellules à la mévinoline, les *caveolae* sont isolées et analysées sur gel de polyacrylamide.

**A.** Immunorévélation de la cavéoline-3. **B.** Gel coloré au bleu de Coomassie. M : marqueur de taille.

#### IV - 2) Incidence sur les activités calpaïnes

Par la suite, nous avons voulu vérifier l'incidence du traitement par la mévinoline sur les activités calpaïnes. Pour cela nous avons utilisé la technique de zymogramme. Les résultats présentés figure 33 montrent une forte diminution de l'activité  $\mu$ -calpaïne, ainsi qu'une légère décroissance de l'activité m-calpaïne. Les *caveolae* seraient donc impliqués dans la ou les voies d'activation des calpaïnes. Ces résultats sont également logiques dans la mesure où la quantité de  $\text{PIP}_2$  diminue lorsque la biosynthèse du cholestérol est inhibée : d'une part le  $\text{PIP}_2$  est un puissant activateur des calpaïnes (Saïdo et *al.*, 1992), d'autre part, il est nécessaire à la mobilité des protéines membranaires et donc à la fusion des myoblastes, processus dans lequel les calpaïnes sont des régulateurs positifs.



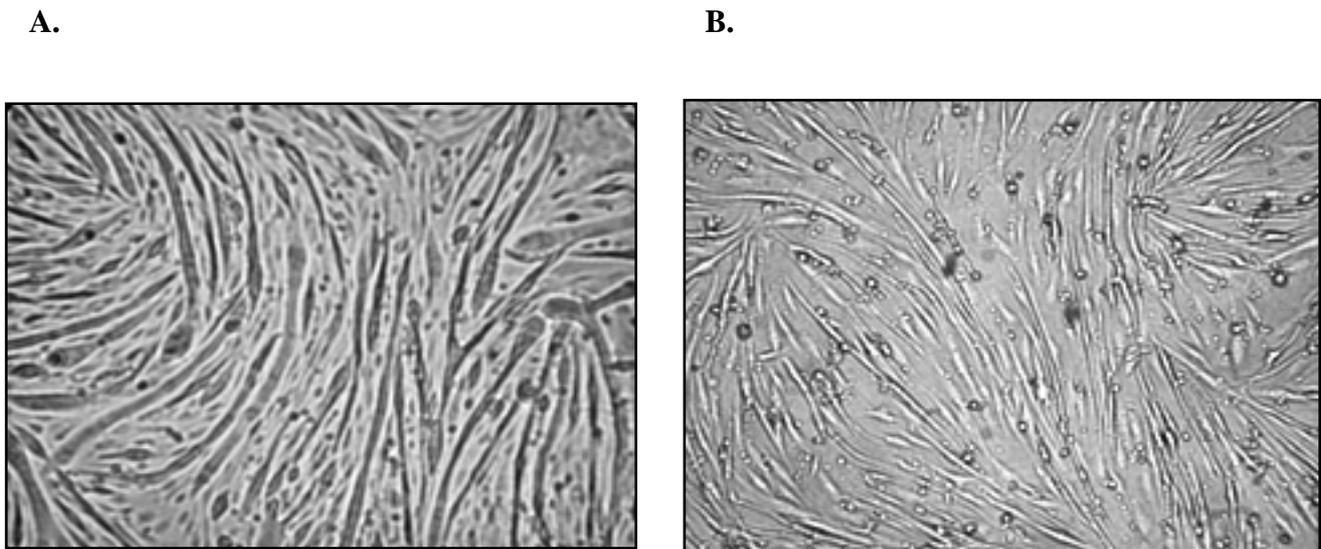
**Figure 33 : Effet de l'inhibition de la biosynthèse du cholestérol sur les activités calpaïnes (zymogramme)**

Après traitement des cellules par la mévinoline (4  $\mu\text{M}$  pendant 3 jours), 10  $\mu\text{g}$  de protéine obtenus à partir d'extraits cellulaires totaux sont déposés sur gel. Trois bains de calcium (2 X 20 min puis une nuit) sont réalisés. Un contrôle négatif est effectué dans du tampon EDTA (cf. "Matériel et Méthodes"). L'observation est faite au moyen d'un scanner à fluorescence.

#### IV - 3) Incidence sur la fusion

Après traitement, un test de fusion et une observation microscopique ont été réalisés. Les cellules (témoins et traitées par la mévinoline) ont été fixées et colorées au stade de

culture correspondant au jour 7 de différenciation. Le dénombrement des noyaux présents dans les myoblastes et dans les myotubes a permis l'obtention du pourcentage de fusion. Dans nos conditions expérimentales, pour les cellules non traitées, environ 60 % des myoblastes ont fusionné. Concernant les cellules traitées par la mévinoline, le pourcentage de fusion n'est que de 10 %. L'observation microscopique réalisée au même stade de différenciation permet de voir des différences morphologiques significatives : en effet dans le cas des cellules traitées, les myoblastes sont alignés mais n'ont pas fusionné (figure 34).



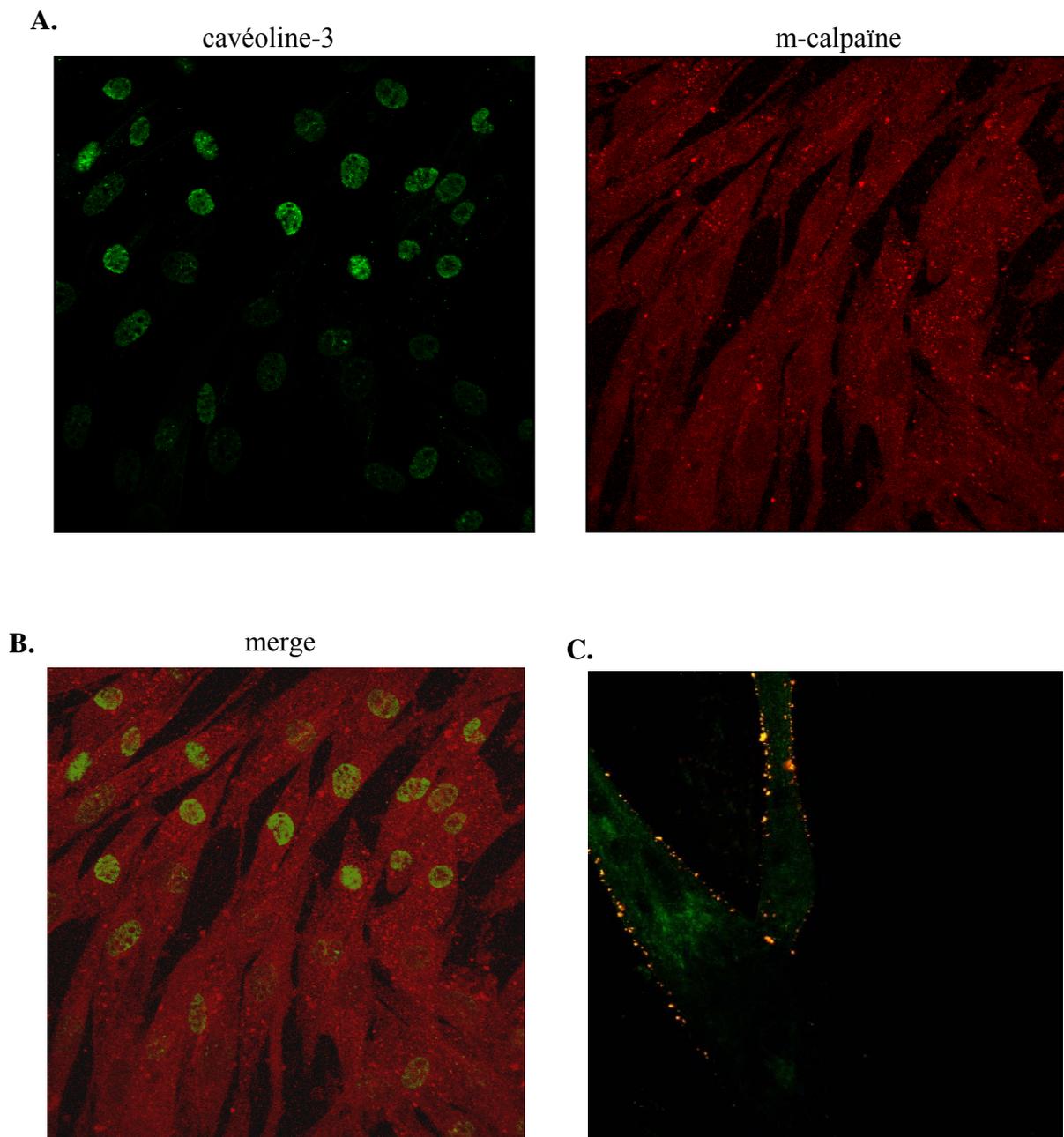
**Figure 34 : Incidence de l'inhibition de la biosynthèse du cholestérol sur la fusion des myoblastes C2C12**

Les cellules sont observées au microscope optique au jour 7 de différenciation. **A.** Témoin. **B.** Après traitement des cellules par la mévinoline (4  $\mu$ M) pendant 3 jours.

#### **IV - 4) Incidence sur la localisation de la m-calpaïne au cours de la fusion des myoblastes**

Cette étude a été réalisée par microscopie confocale. Comme le montre la figure 35, la mévinoline induit une perte de la localisation membranaire de la m-calpaïne. En effet, dans ces conditions, la m-calpaïne présente une localisation diffuse, majoritairement cytosolique. Lorsque l'on observe les photos représentant la localisation de la cavéoline-3, on remarque un phénomène particulier, à savoir que comme dans le cas du témoin montré figure 27 (sans anticorps primaire anti-cavéoline-3), le marquage apparaît au niveau des noyaux, cette localisation n'étant pas spécifique. Ce phénomène est très certainement dû au faible niveau d'expression de la cavéoline-3 par rapport aux cellules non traitées et à la non spécificité des anticorps secondaires dans ces conditions. Le "merge" n'apparaît pas en jaune, il n'y a donc pas de colocalisation à ce niveau. Pour information, la figure 35 C, correspond au "merge", sans traitement par la mévinoline, la différence est significative.

La destruction des *caveolae* suite à la diminution du taux de cholestérol est donc associée à une dissociation de la m-calpaïne des phospholipides membranaires et plus particulièrement au niveau des sites de fusion. Ce dernier résultat renforce l'hypothèse d'une association de la m-calpaïne membranaire au niveau des *caveolae* et de l'implication du tandem m-calpaïne/cavéoline-3 dans la fusion des myoblastes.



**Figure 35 : Localisation des protéines cavéoline-3 et m-calpaïne au cours de la fusion des myoblastes par microscopie confocale après traitement par un inhibiteur de la biosynthèse du cholestérol (mévinoline)**

Après six jours de différenciation, les cellules sont fixées sur leurs supports et incubées en absence ou en présence d'anticorps dirigés contre les protéines cavéoline-3 (1/150) ou m-calpaïne (1/150). Une deuxième incubation est ensuite réalisée en présence d'anticorps couplés au FITC (A) ou au TRITC (B) (dilution 1/100). L'observation est réalisée en microscopie confocale. (A) cavéoline-3 et m-calpaïne (B) superposition (Merge). (C) Merge sans traitement par la mévinoline. Grossissement X1000.

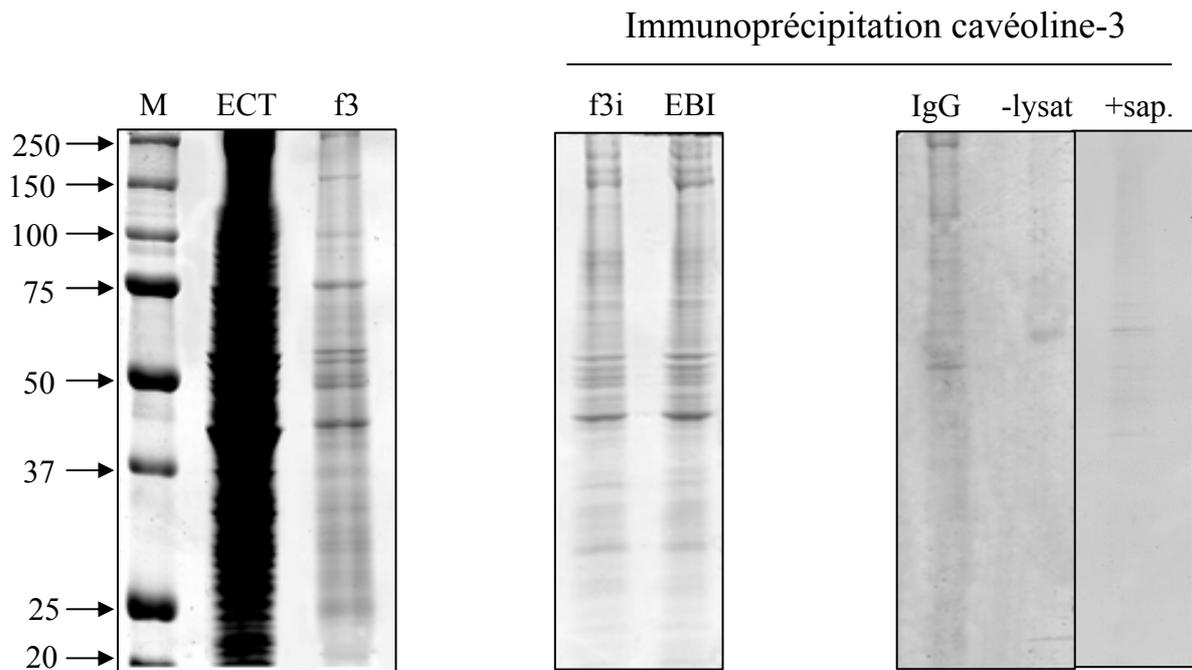
## V – IDENTIFICATION DE L'ENSEMBLE DES PROTEINES ASSOCIEES AUX CAVEOLAE : ANALYSE PROTEOMIQUE ET SPECTROMETRIE DE MASSE

Afin de mieux caractériser les *caveolae* des C2C12 et d'identifier un plus grand nombre de substrats potentiels des calpaïnes, une étude protéomique a été réalisée. Après ultracentrifugation sur gradient de saccharose, nous avons réalisé une immunoprécipitation magnétique en présence d'anticorps anti-cavéoline-3 (cf. chapitre II – 4). Par cette stratégie, nous isolons l'ensemble des protéines associées aux *caveolae*. Les protéines isolées sont déposées sur gel dénaturant en présence de SDS et colorées au bleu de coomassie (figure 36). La spectrométrie de masse permet ensuite d'identifier ces protéines.

Les résultats obtenus (figure 36) permettent de valider la méthode d'immunoprécipitation :

- les profils électrophorétiques de la fraction 3 immunoprécipitée et de l'extrait brut immunoprécipité sont similaires ;
- les expériences réalisées en présence d'immunoglobulines (IgG) non immunes ou en absence de lysat présentent un profil électrophorétique pratiquement dépourvu en protéines ;
- lorsque la fraction 3 est isolée en présence de saponine (agent permettant de détruire les *caveolae*), plus aucune protéine n'est immunoprécipitée.

La fraction 3 non immunoprécipitée bien que présentant un taux de purification très important est légèrement plus enrichie en protéines qu'après l'immunoprécipitation.



**Figure 36 : Profils électrophorétiques d'extraits cellulaires immunoprécipités par les anticorps anti-cavéolines-3 après SDS PAGE et coloration au bleu de coomassie**

M : marqueurs (kDa) ; ECT : extrait cellulaire total ; f3 : fraction 3 non immunoprécipitée ;

f3i : fraction 3 immunoprécipitée ; EBI : extrait brut immunoprécipité ; IgG : immunoprécipitation en présence d'immunoglobulines non immunes ; lysat : immunoprécipitation en absence d'extrait cellulaire ; +sap : traitement à la saponine puis immunoprécipitation.

Les extraits protéiques obtenus après immunoprécipitation sont déposés sur gel de polyacrylamide 10 % puis révélés au bleu de coomassie.

Le gel de la fraction 3 immunoprécipitée a donc été utilisé pour l'identification protéique. Cette dernière est réalisée par un spectromètre de masse à trappe ionique (LC-MS/MS), après digestion trypsique systématique sur toute la hauteur du gel (bandes de 2 mm) (plate-forme Génomique Fonctionnelle Bordeaux ; S. Claverol et M. Bonneu). Environ 120 protéines ont ainsi été identifiées dont les principales sont reportées dans le tableau III.

Les résultats indiquent la présence de la protéine cavéoline-1 (marqueurs des *caveolae*), sous forme oligomérisée, ce qui confirme une bonne purification des *caveolae*. De manière générale, la très grande majorité des protéines présentes dans cette annexe a déjà été mise en évidence au niveau des *caveolae* (ras, récepteur à l'IP3 , intégrines, cadherines , actines, ..) (Couet et *al.*, 2001 ; Razani et *al.*, 2000 ; Schlegel et Lisanti, 2001 ; Volonte et *al.*, 2001). On trouve notamment un très grand nombre de protéines mitochondriales, ces résultats sont conformes à ceux de Mc Mahon et *al.* (2006) qui suggèrent une interaction des *caveolae*

avec les mitochondries. Beaucoup de protéines sont des protéines cytosquelettiques ou impliquées dans la régulation du cytosquelette, ce qui est en adéquation avec les fonctions des *caveolae*. On trouve également la protéine SNAP $\alpha$  qui joue un rôle clef dans le trafic vésiculaire (Barnard R.J. et al., 1997) ou dans la fusion membranaire (Ungermann C et al., 2005).

Qui plus est, la présence de la m-calpaïne, bien qu'identifiée sur la base d'un seul peptide confirme les expérimentations précédentes et va dans le sens d'une représentation importante de l'enzyme au niveau des *caveolae*. Malgré que la PKC $\alpha$  n'ait pas été identifiée, on trouve de nombreuses protéines en relation avec les PKCs et leurs régulations. En effet, la présence d'une part de la protéine SDR (Serum Deprivation Response), qui est une "PKC $\alpha$ -binding protein" (celle-ci pouvant lier le domaine régulateur de la PKC $\alpha$ ) et d'autre part de toutes les protéines de la famille des 14-3-3 (en relation directe avec les PKCs), sont des arguments en faveur de la représentation de cette enzyme au niveau des *caveolae*.

Cependant nous nuancerons nos résultats dans la mesure où plusieurs protéines comme la MARCKS ainsi que certaines protéines considérées comme faisant partie intégrante de la fonctionnalité des *caveolae* (eNOS, Phospho-fructo-Kinase M, cavéoline-3), ne sont pas identifiées. Il est possible que ces protéines ne soient pas suffisamment représentées pour être détectées *via* l'analyse par spectrométrie de masse. La complexité des échantillons, jusqu'à une douzaine de protéines différentes par bande, peut être une autre raison pour laquelle la détection n'est pas optimale.

Comme nous l'avons dit précédemment, le but de cette étude protéomique est d'identifier un plus grand nombre de substrats des calpaïnes présents au niveau des *caveolae*. Il est à noter que leurs présences ne signifient pas forcément que celles-ci soient protéolysées par les calpaïnes au niveau des *caveolae*, mais il s'agit d'une possibilité qui devra être examinée au cas par cas. Ainsi, parmi l'ensemble des protéines reconnues, un certain nombre a déjà été identifié comme substrats de ces protéases (Glading et al., 2002) : on retrouve notamment beaucoup de protéines cytosquelettiques telles que : la gelsoline (Wadhawan et al., 2004), la myosine, la caténine, la filamine, la desmine, la vinculine, la taline et la tubuline. Certaines, impliquées dans le processus de différenciation, ont fait l'objet d'études au laboratoire ainsi : la vimentine (Moyen et al., 2004), la fibronectine (Dourdin et al., 1997) ou la tropomyosine (Mazeres et al., 2006) ont été identifiées comme substrats des calpaïnes dans les myoblastes C2C12.

**Tableau III : Identification des principales protéines retrouvées dans la fraction cavéolaire des myotubes C2C12**

\* : très grand nombre de peptides libérés suite à l'hydrolyse trypsique.

Type de protéines	Numéro d'accèsion	Identification de la protéine	Nombre de peptides
<b>Enzymes transductrices</b>	Q9JLM8	Sérine/thréonine protéine kinase	2
	P08129	Sérine/thréonine protéine phosphatase 1	2
	P30153	Sérine/thréonine protéine phosphatase 2 A	4
	P10833	R-Ras	3
	Q9JKF1	Ras GTPase-activating-like protein (IQGAP1)	4
	P35293	Rab	2
	P15154	Rac 1	2
	PO4894	G(s) $\alpha$ subunit	2
	P04901	G(I)/G(S)/G(T) b subunit	3
	P61205	ADP ribosylation factor	3
	P35215, Q9CQV8, P11576	Famille des "14-3-3 protein"	5 6 2
<b>Canaux ioniques</b>	Q60932	Voltage-dependent anion selective channel protein, (VDAC-1)	*
	Q60630	Voltage-dependent anion selective channel protein, (VDAC-2)	7
	Q60631	Voltage-dependent anion selective channel protein, (VDAC-3)	6
	O08532	Dihydropyridine-sensitive L-type, calcium channel	6
	P54116	Stomatine (band 7 integral membrane protein)	6
<b>Récepteurs</b>	P09055	Intégrine ( $\beta$ 1) (récepteur fibronectine)	6
	Q62470	Intégrine ( $\alpha$ 3)	3
	P43406	Intégrine ( $\alpha$ 5)	5
	Q9Z0T9	Intégrine ( $\beta$ 6)	2
	Q61738	Intégrine ( $\alpha$ 7)	5
	O55222	ILK (Integrin-linked protein kinase)	2
	P16960	Récepteur ryanodine	4
	Q07954	LDL (LRP)	2
	P11881	IP3 récepteur	2

Type de protéines	Numéro d'accension	Identification de la protéine	Nombre de peptides
<b>Microtubules</b>	P02551	Tubuline ( $\alpha 1$ )	3
	P05213	Tubuline ( $\alpha 2$ )	*
	P04691	Tubuline ( $\beta 15$ )	9
	Q9ERD7	Tubuline ( $\beta 3$ )	*
<b>Annexines</b>	P10107	Annexine I	8
	P07356	Annexine II	11
	P97429	Annexine IV	6
	P14668	Annexine V	3
	P14824	Annexine VI	*
	Q07076	Annexine VII	2
	P97384	Annexine XI	3
<b>Protéines du cytosquelette</b>	P40926	Actine $\alpha 1$	6
	P47754	F-Actin capping protein $\alpha 2$	2
	P53465, Q00214, Q98972	Actines (muscle)	*
	P18760	Cofiline	2
	P10924	Profiline 1	3
	Q02566	Myosine, chaîne lourde (famille de la dystrophine)	10
	Q9WT17	Myosine 1 C	8
	P11276	Fibronectine	11
	B0999	Catenine d1	2
	Q9WTR5	Cadherine (T- cadherine)	5
	P13020	Gelsoline (ADF)	3
	P20152	Vimentine	8
	P11276	Précurseur fibronectine	11
	P58771	Tropomyosine 1	4
	P58774	Tropomyosine 2	10
	Q8BTM8	Filamine A	*
	Q80X90	Filamine B	*
	Q14315	Filamine C	11
	P18206	Vinculine	10
	P26039	Taline 1	2
P31001	Desmine	7	
<b>Marqueurs des caveolae</b>	P49817	<b>Cavéoline 1</b>	1

Type de protéines	Numéro d'accèsion	Identification de la protéine	Nombre de peptides
<b>Protéases</b>	O08529	<b>Calpaïne II (sous-unité catalytique)</b>	1
<b>Chaperonnes</b>	P20029	HSP 70 (GRP 78)	*
	P11499	HSP 84	*
	P16226	HSP 60	*
	P14211	Calreticuline précurseur	5
	P08113	Endoplasmine (GRP94)	9
<b>Protéines en relation avec les mitochondries</b>	Q9WUM5	Succinyl-CoA ligase (précurseur mitochondrial)	3
	Q9DOM3	Cytochrome C1 (précurseur mitochondrial)	3
	Q9DC69	NADH-ubiquinone oxidoreductase	4
	P08249	Malate déshydrogénase (précurseur mitochondrial)	8
	Q9D051	Pyruvate déshydrogénase E1 (précurseur mitochondrial)	*
	Q8VEM8	Phosphate carrier (précurseur mitochondrial)	3
	Q9R0X4	Acyl-Co A thioester hydrolase (précurseur mitochondrial)	2
	Q03265	ATP Synthase (précurseur mitochondrial)	10
	O75746	Calcium-binding mitochondrial carrier protein (CMC1)	3
	Q64521	Glycerol-3 phosphate déshydrogénase (précurseur mitochondrial)	3
	Q9WUM5	Succinyl-CoA ligase (précurseur mitochondrial)	3
	Q9DOM3	Cytochrome C1 (précurseur mitochondrial)	3
<b>Métabolisme des stérols</b>	Q8VDJ3	Vigiline	2
	O70503	Stéroïde déshydrogénase KIK-I	3
	P70500	CDP-DAG-IP3 Transférerase	2
	P08003	Protéine disulfide isomérase (ERp-72)	2
	P46978	Transférerase STT3	2
	Q8ROX7	Sphingosine-1-phosphate lyase 1 (mSPL)	2
<b>Trafic vésiculaire</b>	P51863	Vacuole ATP synthase	3
	Q9DB05	SNAP $\alpha$	2
	O08547	Sec 22 b	3

## VI – DISCUSSION

Dans cette première partie, une association de la m-calpaïne avec les *caveolae* dans les myoblastes C2C12 a été mise en évidence pour la première fois. Au contraire, la  $\mu$ -calpaïne et la calpastatine ne sont pas représentées dans ces vésicules. L'association de la m-calpaïne a été confirmée par Western-blot, centrifugation à 40 000 g et immunoprécipitation. Par ailleurs un traitement *in vitro* par la saponine, entraîne l'absence totale de protéine dans la fraction cavéolaire. La dépendance vis-à-vis du cholestérol pour les protéines PKC $\alpha$ , m-calpaïne, cavéoline-3 et MARCKS est un autre argument allant dans le sens d'une association avec ces vésicules lipidiques. L'analyse par microscopie confocale confirme ces résultats en montrant une véritable co-localisation entre la m-calpaïne et la cavéoline-3. Ces deux protéines présentent essentiellement une localisation membranaire et plus spécifiquement une répartition majoritaire au niveau des sites de fusion. En accord avec la littérature (Cottin et *al.*, 1994, Dargelos et *al.*, 2002 ; Galbiati et *al.*, 1999), ces résultats viennent étayer le rôle essentiel de la m-calpaïne et de la cavéoline-3 dans la fusion des myoblastes. Parallèlement, l'inhibition *in situ* de la biosynthèse du cholestérol par un inhibiteur spécifique, la mévinoline, engendre une forte diminution de l'expression de la cavéoline-3 et du nombre de *caveolae* (Hailstones et *al.*, 1998), ceci associé à une diminution drastique de la fusion.

En plus de la m-calpaïne, la présence de deux de ses substrats, PKC $\alpha$  et MARCKS au niveau des *caveolae* a également été mise en évidence. L'immunolocalisation de la PKC $\alpha$  montre également une répartition majoritaire au niveau des sites de fusion. Ces résultats corroborent ceux de Mineo C. et *al.* (1998) qui ont montré que la PKC $\alpha$  présente au niveau

des *caveolae* intervenait dans de nombreux signaux de transductions et notamment dans le processus d'invagination membranaire.

Concernant le système calpaïne, ces données sont en accord avec ceux de Morford et *al.* (2002) qui ont trouvé des résultats similaires sur un modèle cellulaire différent (cellules lymphoblastoïdes T humaines). En effet, ils montrent que la m-calpaïne mais pas la  $\mu$ -calpaïne est associée à ces vésicules lipidiques. Ainsi la protéase pourrait cliver entre autres une protéine cytosquelettique, la taline et par ce biais agir sur le remodelage du cytosquelette.

Rappelons que les calpaïnes sont connues pour protéolyser de nombreuses protéines membranaires ou cytosquelettiques, leurs dérégulations étant à l'origine d'un grand nombre de désordres physiologiques (Goll et *al.*, 2003). Les calpaïnes sont essentiellement représentées au niveau membranaire où elles seraient soumises à de nombreuses régulations. La présence d'un domaine de liaison "C2- like calcium/phospholipid" (Tompa et *al.*, 2001) au niveau de la m-calpaïne permettrait son ancrage dans la membrane et son activation par le PIP2. Le confinement de la m-calpaïne au niveau des *caveolae*, en absence de calpastatine, permettrait d'exposer l'enzyme à divers régulateurs et en particulier le PIP2 et le calcium induisant ainsi son activation *in situ* à proximité de ses substrats. Le fait que le PIP2 soit fortement représenté par rapport à une membrane classique vient conforter ce "scénario".

Il apparaissait donc intéressant de savoir comment la m-calpaïne et ses substrats sont agencés par rapport à la membrane cavéolaire. L'utilisation et la combinaison de traitements biochimiques (carbonate de sodium, déoxycholate de sodium) ou enzymatiques (protéinase K) nous ont permis de confirmer que la cavéoline-3 est une protéine transmembranaire, ancrée dans la bicouche phospholipidiques, tapissant la face externe de la vésicule. Ces résultats sont

en accord avec ceux obtenus par différents auteurs (Galbiati *et al.*, 2001 ; Quest *et al.*, 2004 ; Schlegel et Lisanti, 2001). Ces traitements ont également permis de montrer que la m-calpaïne et la MARCKS sont des protéines fortement liées à la membrane des *caveolae* et situées uniquement sur la face externe. Enfin, la PKC $\alpha$  serait localisée (en quantité similaire) à l'intérieur et à l'extérieur des *caveolae*, elle est d'ailleurs assimilée à une protéine extrinsèque et donc faiblement liée à la membrane.

L'analyse protéomique a permis d'avoir une vue moins restrictive de l'ensemble des protéines présentes au niveau des *caveolae*. Un grand nombre de protéines reconnues comme substrats des calpaïnes ainsi que certaines protéines intervenant dans la signalisation des PKCs ont été identifiées. Ces résultats montrent bien que les *caveolae* sont de véritables "signalosomes", tous les éléments étant réunis au niveau de la localisation des protéines pour obtenir une régulation intense.

Au laboratoire, nous avons préalablement montré que les calpaïnes intervenaient dans la fusion des myoblastes de par leurs actions sur la PKC $\alpha$  et la forme cytosolique, phosphorylée de MARCKS (Dulong *et al.*, 2004). La co-localisation et le positionnement des trois protéines au niveau des *caveolae* laissent penser que celles-ci pourraient intervenir conjointement dans une voie de régulation "cavéolaire" nécessaire à la fusion des myoblastes.

Afin de mieux appréhender le rôle de l'enzyme au niveau des *caveolae*, nous avons entrepris de déréguler le système calpaïne. En effet, la présence de la m-calpaïne au niveau des *caveolae* ne signifie pas que l'enzyme soit active, ou que celle-ci puisse être activée sous l'action de stimuli externes. Dans un premier temps, nous nous sommes donc attachés à vérifier ce fait par la mesure des activités calpaïnes et ceci par deux approches

complémentaires. Nous avons par la suite dérégulé le système par l'utilisation combiné d'un ionophore à calcium et d'un inhibiteur des calpaïnes : les effets sur les substrats PKC $\alpha$  et MARCKS ont été observés. Il est reconnu que dans certaines conditions d'activation la PKC $\alpha$  transloque du cytosol vers divers compartiments cellulaires spécifiques comme les noyaux, les contacts focaux et les *caveolae* (Godson et *al.*, 1996 ; Orito et *al.*, 2001). Les effets d'un traitement par un ester de phorbol, le PMA et par un inhibiteur spécifique, le Gö ont donc été analysés. Par ailleurs, une étude plus globale de l'activité protéolytique calcium-dépendante au niveau des *caveolae* a été entreprise via une approche protéomique différentielle.

## *2<sup>ème</sup> partie*

### **Protéolyse neutre calcium-dépendante au niveau des** **caveolae**

#### **I – LA M-CALPAÏNE DE LA FRACTION CAVEOLAIRE EST ACTIVABLE PAR LE CALCIUM**

Les activités calpaïnes ont été testées en utilisant la caséine-FITC comme substrat. Pour cela deux techniques complémentaires ont été utilisées :

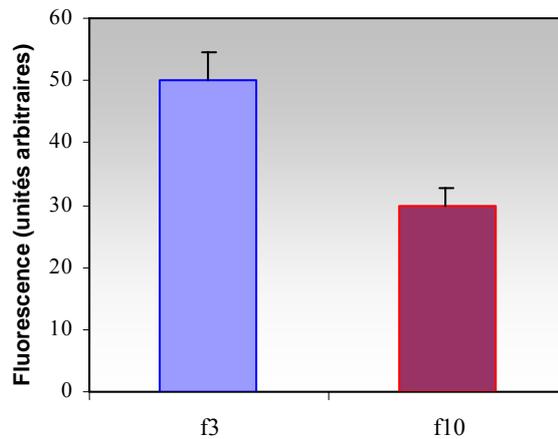
- la première et plus ancienne technique permet de mesurer une activité calpaïne résiduelle du fait de la présence de son inhibiteur endogène.

- la deuxième appelée "zymogramme" permet de séparer la calpastatine des calpaïnes lors de la migration électrophorétique. La comparaison des résultats obtenus par ces deux méthodes apparaît donc instructive.

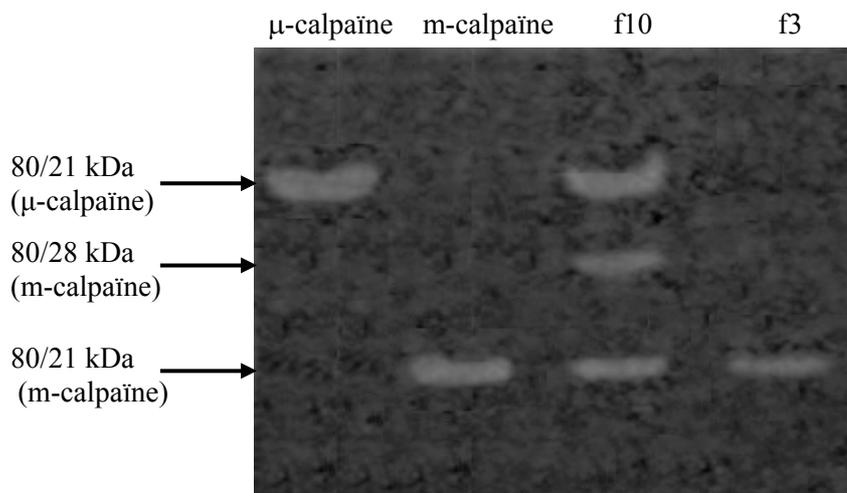
Les résultats présentés figure 37 A montrent que par la première approche, une activité est présente aussi bien dans la fraction 3 que dans la fraction 10. Cependant, l'intensité dans la fraction cavéolaire est supérieure de 40 % comparée à celle du culot. Par la seconde approche (figure 37 B), l'activité spécifique de la m-calpaïne est supérieure dans la fraction 10. Ces résultats confirment la présence de la calpastatine et de la  $\mu$ -calpaïne dans la fraction 10, comme cela est montré dans la première partie. En outre, dans la fraction 10, l'activité calpaïne se présente sous deux formes, à savoir les hétérodimeres 80-28 kDa et 80-21 kDa, comme cela a été mis en évidence par Arthur et Mykles en 2000.

*In vitro, la m-calpaïne présente au niveau des caveolae est donc active en présence de calcium et n'est pas régulée par son inhibiteur endogène, la calpastatine.*

**A.**



**B.**



**Figure 37 : Mesure des activités calpaïnes dans les fractions 3 et 10 après ultracentrifugation sur gradient de saccharose**

**A.** La quantification des activités calpaïne est exprimée en unité arbitraire de fluorescence en utilisant la caséine-FITC comme substrat (pH 7,2) en présence de calcium (5 mM). Les contrôles sont réalisés dans les mêmes conditions mais le calcium est remplacé par de l' EGTA (2 mM).

**B.** La visualisation des activités calpaïne est réalisée par la technique "caséine zymographie" comme décrit dans la section "Matériel et Méthodes". Les flèches indiquent les positions des enzymes : 80 kDa/21 kDa  $\mu$ -calpaïne ; 80 kDa/28 kDa m-calpaïne ; 80 kDa/21 kDa m-calpaïne.

## **II – LES PROTEINES PKC $\alpha$ ET MARCKS SONT-ELLES DES SUBSTRATS POTENTIELS DE LA M-CALPAÏNE AU NIVEAU DES CAVEOLAE ?**

### **II - 1) La PKC $\alpha$ , contrairement à MARCKS, est un substrat de la m-calpaïne au niveau des *caveolae***

Une des approches de l'étude de l'implication d'un système enzymatique sur un autre consiste à induire une dérégulation du premier et de suivre les effets sur le second. Pour cela, les cellules ont été traitées en culture par le ionophore à calcium A23187 et l'inhibiteur spécifique des calpaïnes, le CS peptide. Nous nous sommes ensuite attachés à vérifier l'incidence de ces traitements sur la PKC $\alpha$  et MARCKS colocalisées au niveau des *caveolae*.

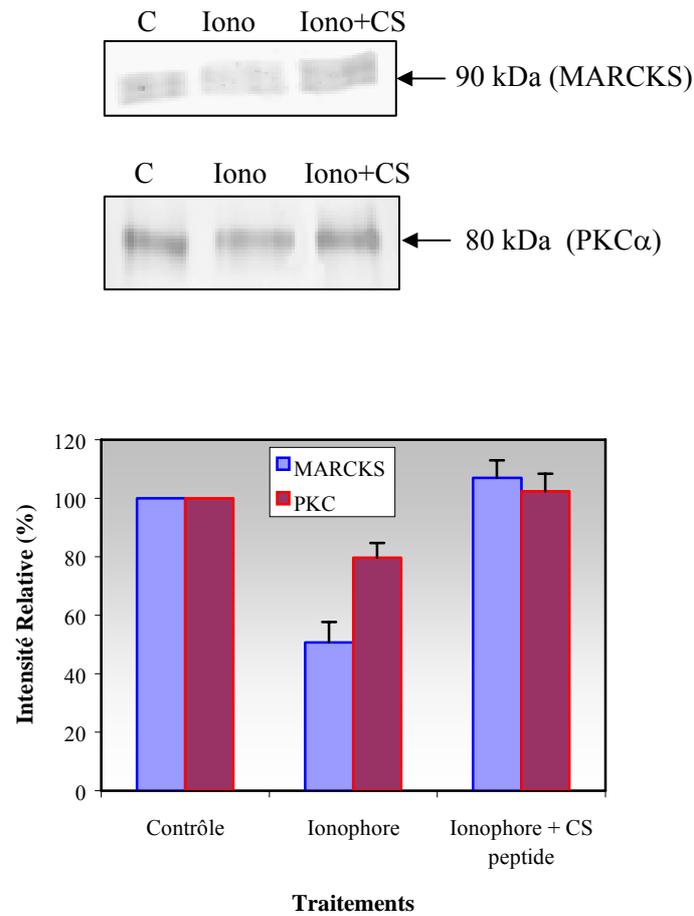
#### **a) Protéolyse calcium-dépendante au niveau des *caveolae***

##### ***Action du ionophore à calcium A23187***

Le ionophore A23187 favorise la pénétration des ions calcium à l'intérieur de la cellule et a donc pour conséquence d'activer tous les systèmes calcium-dépendants, parmi eux les calpaïnes. Cette activation se traduit par une diminution parallèle du taux de PKC $\alpha$  (20 %) et de MARCKS (50 %) comme le montrent les résultats présentés figure 38.

##### ***Action de l'inhibiteur spécifique des calpaïnes***

Afin de confirmer l'implication des calpaïnes, nous avons combiné l'ajout du ionophore et de l'inhibiteur. L'addition de cet inhibiteur, avant l'application du ionophore permet de contrecarrer l'effet observé précédemment, les valeurs obtenues dans ces conditions redevenant identiques à celles observées pour les témoins.



**Figure 38 : Protéolyse neutre calcium-dépendante au niveau des caveolae dans la cellule musculaire en cours de différenciation**

Après six jours de différenciation, les cellules sont traitées par le ionophore A23187 (1  $\mu$ M, 1heure) et par le CS peptide (10  $\mu$ M), les *caveolae* sont purifiées par ultracentrifugation et culottage. Les protéines sont ensuite immunorévélées.

**A** : Immunorévélation des protéines PKC $\alpha$ , MARCKS.

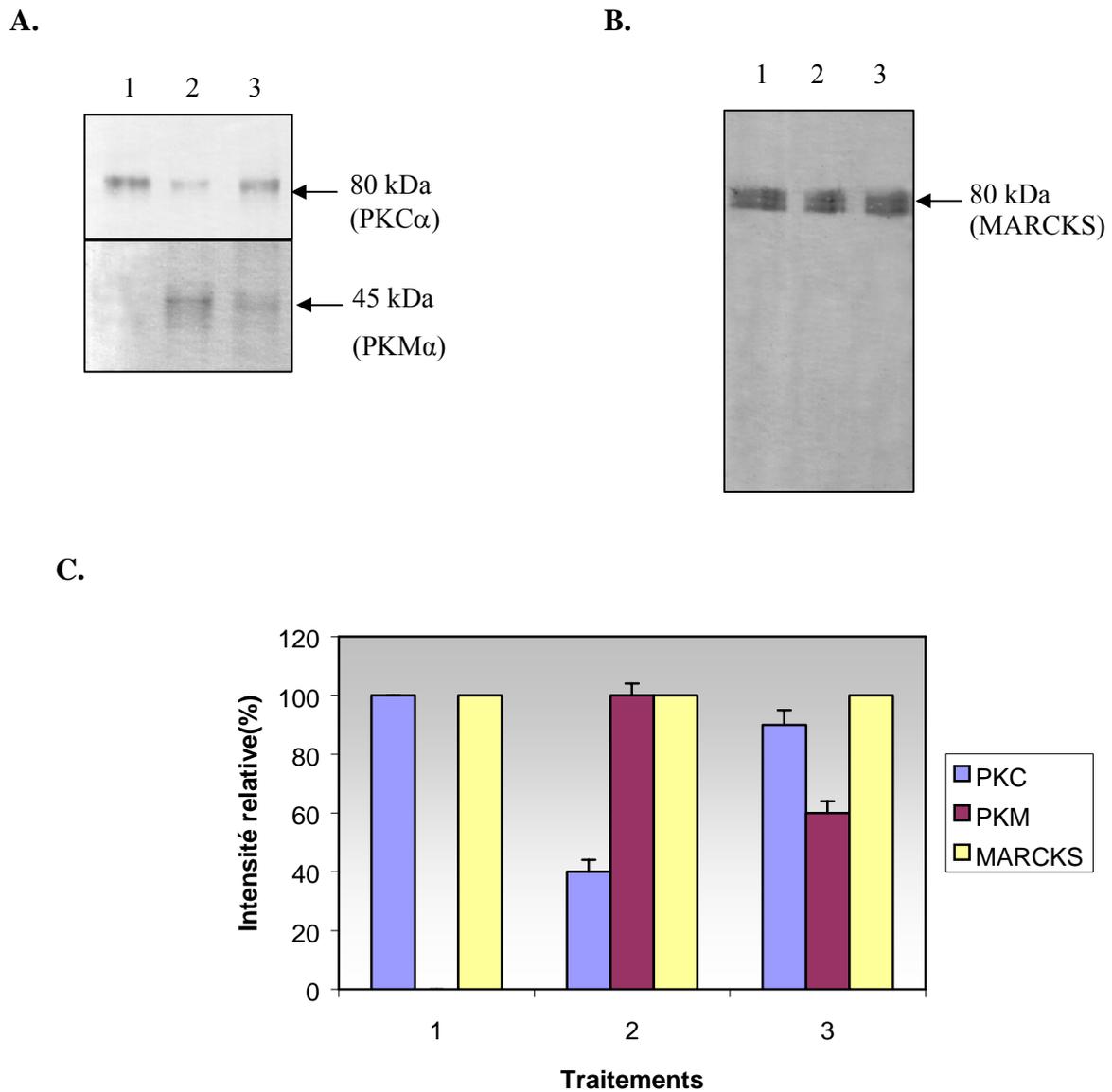
**B** : Quantification (n=3).

**b) Protéolyse *in vitro* de la PKC $\alpha$  et de MARCKS au niveau des *caveolae***

Afin de mettre en évidence que les protéines MARCKS et PKC $\alpha$  de la fraction cavéolaire sont bien des substrats de la m-calpaïne, des expériences de protéolyse *in vitro* ont été réalisées en présence de m-calpaïne purifiée, et de calcium. Les résultats présentés figure 39 A montrent le clivage de la PKC $\alpha$  et l'apparition simultanée de son fragment de dégradation PKM. La protéolyse de la PKC $\alpha$  est *quasi* totalement inexistante en présence de l'inhibiteur spécifique des calpaïnes, le CS peptide. L'absence du fragment PKM, lors des traitements cellulaires est à noter, ceci est sans doute dû au fait que la PKM est relarguée dans le compartiment cytosolique.

Concernant la protéine MARCKS de la fraction cavéolaire, la m-calpaïne purifiée n'a aucun effet (figure 39 B), alors que sa dégradation a déjà été mise en évidence sur un extrait cellulaire total (Dulong et *al.*, 2004). Ces résultats suggèrent que la diminution de MARCKS observée dans la fraction cavéolaire (figure 38) n'est pas due à sa protéolyse par la m-calpaïne.

*In vitro*, la PKC $\alpha$  au niveau des *caveolae* est accessible aux calpaïnes et est un de ses substrats. La protéine MARCKS de la fraction cavéolaire n'est pas dégradée *in vitro*. La dégradation de la PKC $\alpha$  est bien l'œuvre de la m-calpaïne.



**Figure 39 : Mise en évidence de la protéolyse calcium-dépendante de la PKC $\alpha$  associée aux caveolae**

La fraction 3 obtenue après ultracentrifugation (100  $\mu$ g de protéine) est incubée pendant 15 minutes dans différentes conditions (1 : témoin ; 2 : ajout de m-calpaïne purifiée (10  $\mu$ L) et de Ca<sup>2+</sup> (150 mM) ; 3 : ajout de calpaïne (10  $\mu$ L) et de CS peptide (10  $\mu$ M)).

**A.** Immunorévélation de la protéine PKC $\alpha$  **B.** Immunorévélation de la protéine MARCKS **C.** Quantification (n=3).

## II - 2) La PKC $\alpha$ activée par la m-calpaïne est impliquée dans la translocation de MARCKS des *caveolae* vers le cytosol

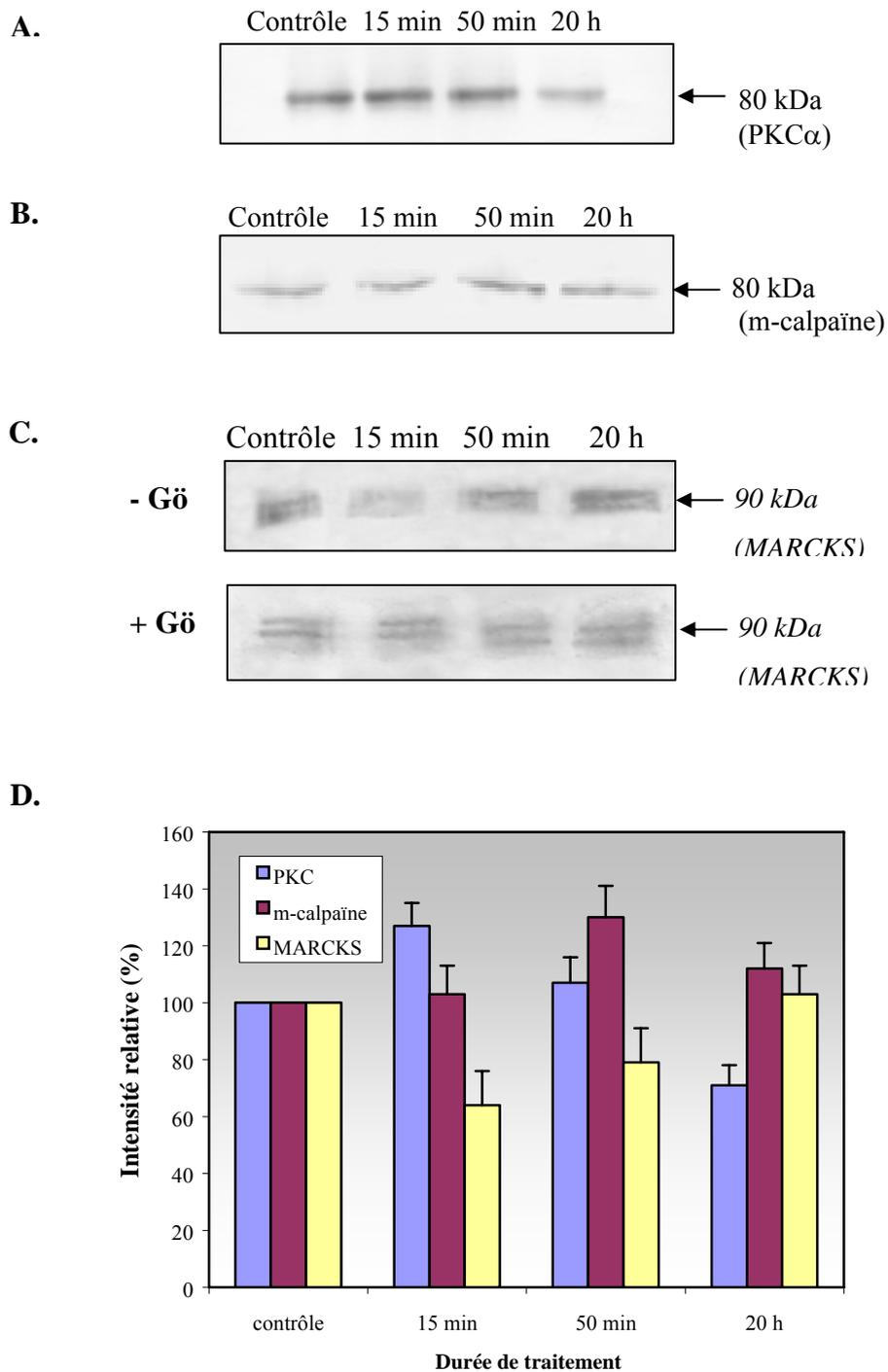
### *Traitement par le PMA et par un inhibiteur d'activation des PKC $\alpha$ , le Gö 6976*

Afin de vérifier si la phosphorylation de la protéine MARCKS *via* la PKC $\alpha$  permet d'expliquer le résultat précédent, un activateur de PKC $\alpha$ , le PMA et un inhibiteur spécifique, le Gö 6976, ont été utilisés.

Ainsi quand le PMA est ajouté au milieu de culture (figure 40), une augmentation de 27 % de l'expression de la PKC $\alpha$  est observée après 15 min de traitement. Après 20 heures de traitement la quantité de PKC $\alpha$  diminue fortement (27 % par rapport au témoin 0 min). Concernant la protéine MARCKS les résultats observés semblent inversement corrélés, en effet après 15 min de traitement la quantité de MARCKS diminue significativement (37 %), alors qu'après 20 heures de traitement le niveau d'expression redevient identique à celui du témoin (0 min).

Afin de confirmer l'implication de la kinase sur la translocation de la protéine MARCKS, l'ajout de l'inhibiteur spécifique de PKC $\alpha$ , le Gö 6976 a été réalisé. Celui ci permet de contrecarrer l'effet observé sur la protéine MARCKS, en effet après l'ajout de cet inhibiteur, son taux d'expression protéique reste constant. La PKC $\alpha$  active serait donc impliquée dans la translocation de la protéine MARCKS des *caveolae* vers le cytosol.

En ce qui concerne la m-calpaïne, celle-ci transloque également vers les *caveolae* (augmentation de 30 %) mais après 50 min de traitement. Dans ces conditions la m-calpaïne pourrait être impliquée dans la "down-régulation" de la PKC $\alpha$  comme cela a précédemment été décrit (Aragon et *al.*, 2002).



**Figure 40 : Induction de la translocation puis de la "down-regulation" de la PKC $\alpha$  en présence de PMA : incidence sur la protéine MARCKS**

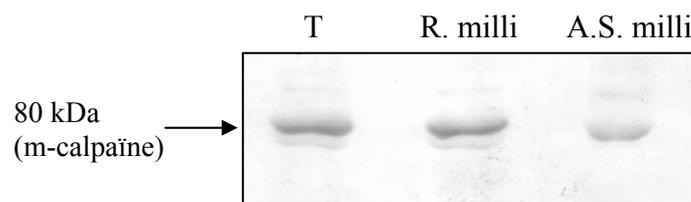
Le PMA est ajouté dans le milieu de culture à la concentration de 150 nM aux jours 6 et 7 de différenciation. Après différents temps 15 min, 50 min et 20 heures, les extraits cellulaires sont soumis à un fractionnement sur gradient de saccharose. Le Gö 6976 est dilué dans du DMSO et ajouté au milieu de culture à une concentration finale de 100 nM. Le traitement est arrêté après une heure d'incubation. Une analyse par Western-blot est alors réalisée. **A.** Immunorévélation de la protéine PKC $\alpha$  **B.** Immunorévélation de la protéine m-calpaïne **C.** Immunorévélation de la protéine MARCKS **D.** Quantification (n=3).

### III – MISE EN EVIDENCE D'AUTRES SUBSTRATS DE LA M-CALPAÏNE AU NIVEAU DES *CAVEOLAE* PAR ANALYSE PROTEOMIQUE DIFFERENTIELLE

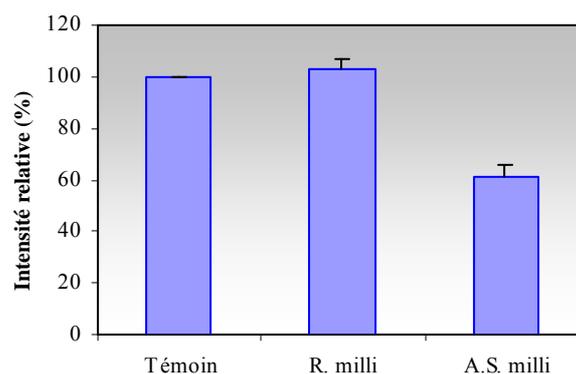
#### III - 1) Inhibition de l'expression de la m-calpaïne par traitement antisens

Afin d'obtenir une diminution du taux d'expression de la m-calpaïne nous avons utilisé un traitement antisens dirigé contre cette protéase. Les résultats présentés figure 41 mettent en évidence que l'expression de la protéine m-calpaïne est identique pour le témoin et après traitement par une séquence aléatoire (Random). Lors de l'utilisation de la séquence antisens de l'ARNm de la m-calpaïne, une diminution de 40 % de l'expression de cette protéine a été obtenue.

**A.**



**B.**



**Figure 41 : Immunorévélation de la m-calpaïne après traitements des cellules par des antisens dirigés contre la m-calpaïne**

Les traitements sont réalisés à 4 jours et demi après la mise en différenciation des cellules. 100 µg de protéines, extraits 36 heures plus tard, sont soumis à un "SDS-PAGE" et transférés sur membrane. L'immunorévélation est réalisée en utilisant des anticorps dirigés contre la m-calpaïne.

**A.** Immunorévélation **B.** Quantification (n=4).

### III - 2) Identification des substrats de la m-calpaïne au niveau des *caveolae* et/ou implication de la protéase dans certaines voies de régulation

Afin d'identifier de nouveaux substrats de la m-calpaïne, nous avons combiné un traitement antisens, afin d'inhiber la synthèse protéique de l'enzyme et un traitement par le ionophore A23187. Comme nous l'avons mentionné précédemment, le ionophore A23187 utilisé seul favorise la pénétration des ions calcium à l'intérieur de la cellule et a pour conséquence d'activer tous les systèmes calcium-dépendants, dont les calpaïnes. La combinaison avec le traitement antisens bloque la "voie" de la m-calpaïne. La comparaison des profils bidimensionnels permet donc d'identifier les protéines cibles de la m-calpaïne.

L'analyse a été menée sur six échantillons : trois "Antisens" et trois "Random". Quinze spots présents sur les gels "Antisens" et absents sur les gels "Random" et deux spots augmentant de manière significative sur les gels "Antisens" ont été sélectionnés et identifiés avec certitude (figure 42). L'analyse par spectrométrie de masse a permis d'identifier les protéines présentes dans le tableau IV. Seules les protéines dont les poids moléculaires et points isoélectriques sont conformes aux données bibliographiques ont été retenues (17 sur 18). L'ensemble de ces protéines avait déjà été identifié lors de l'analyse 1 D, après immunoprécipitation en présence des anticorps anti-cavéoline-3, ou ont déjà été localisé au niveau des *caveolae*.

Parmi les protéines reconnues, certaines ont déjà été identifiées comme substrats des calpaïnes : **vinculine, vimentine, desmine, actine et tubuline**.

La **vimentine** et la **desmine** sont des constituants des filaments intermédiaires, elles sont essentielles dans la réorganisation du cytosquelette et l'assemblage des myofibrilles lors du développement musculaire. Elles jouent par ailleurs un rôle important dans l'ancrage des divers organites cellulaires ainsi que dans la forme et la structure de la cellule. Il est à noter que la vimentine se présente sous plusieurs formes phosphorylées, ce qui corrobore la présence de la protéine au niveau des spots 8, 9 et 10 lesquels sont tous affectés par une dérégulation de la m-calpaïne.

Moyen et *al.* (2004) ont montré qu'une surexpression de la  $\mu$ -calpaïne dans les myoblastes C2C12 avait pour conséquence une profonde désorganisation du cytosquelette. Ces désordres structuraux seraient la conséquence directe d'une chute simultanée du niveau d'expression de la vimentine (64 %) et de la cavéoline-3 (76 %). Robertson et *al.* (2005) ont par ailleurs montré que la dégradation de la vimentine par les calpaïnes (associée à une élévation de calcium) serait responsable d'une aggravation de la cataracte.

Concernant la desmine, Nelson et Traub (1983) ont montré que cette protéine cytosquelettique est un très bon substrat *in vitro* des calpaïnes. Dourdin et al. (1997) ont également montré à partir d'un extrait brut de myoblastes que la desmine est protéolysée par la m-calpaïne.

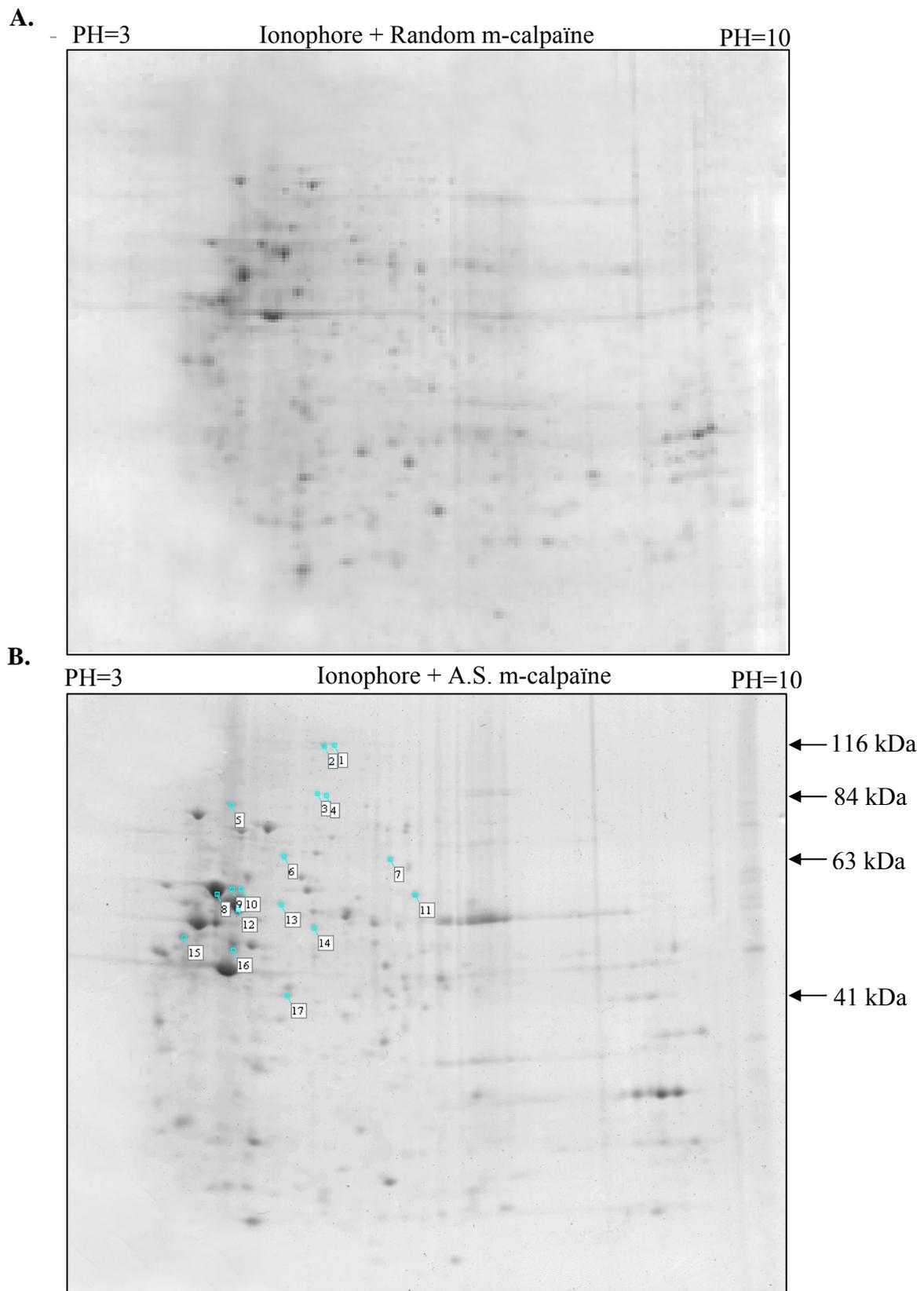
L'**actine** est une protéine globulaire de 42 kDa qui a pour propriété principale le fait de s'auto-associer pour former un filament (actine F). Outre son rôle dans la contraction musculaire, celle-ci intervient aussi dans la motilité cellulaire ou dans la structuration de la matrice cytoplasmique. La **vinculine**, protéine intracellulaire, intermédiaire, permet la liaison entre les filaments d'actine et les intégrines au niveau des plaques d'adhésion. La vinculine, (Serrano et Devine, 2004) et l'actine (Villa et al, 1998), ont toutes deux été identifiées comme substrats des calpaines.

Nos résultats expérimentaux associés à l'ensemble de ces données bibliographiques vont dans le sens d'une protéolyse de ces protéines cytosquelettiques et contractiles par la m-calpaïne au niveau des *caveolae*.

Au même titre que les microfilaments d'actine et que les filaments intermédiaires, les microtubules sont des fibres constitutives du cytosquelette, responsables du maintien de la forme de la cellule. Il s'agit de tube dont la paroi est constituée de plusieurs protofilaments de **tubuline**. Ils sont impliqués dans le trafic intracellulaire en formant de véritables « rails » le long desquels des protéines motrices se déplacent et transportent divers organites. Santella et al. (2000) ont montré le rôle des calpaïnes dans la dégradation de la tubuline. Par ailleurs, deux protéines impliquées dans le trafic vésiculaire ont également été identifiées ("vacuole ATP synthase", "PKC and casein kinase II substrate protein 3"), nous pouvons penser que la m-calpaïne pourrait jouer un rôle dans le trafic vésiculaire *via* ces protéines.

Parmi les cibles identifiées, on trouve également cinq protéines mitochondriales, ces résultats sont conformes à ceux de Mc Mahon et al. (2006) qui suggèrent une interaction des *caveolae* avec les mitochondries.

Un nombre significatif de ces protéines serait impliqué dans l'apoptose ou le stress oxydatif (mitofilin, Hsp60, NADH-Ubiquinone oxydo-réductase). Enfin deux autres protéines potentiellement intéressantes de par leurs fonctions dans le stress (Stress-induced-phosphoprotein1) et la transduction du signal (SH3 domain GRB2-like protein B1) ont pu être identifiées. En outre, cette dernière intervient dans l'activation des caspases, la régulation des facteurs d'échanges des nucléotides mais aussi dans l'endocytose de l'EGF.



**Figure 42 : Analyse protéomique différentielle**

Après traitement par le ionophore A23187 pendant 1 heure (J6) ou par le ionophore et l'antisens m-calpaïne (36 heures avant l'application du ionophore), la fraction 3 obtenue après ultracentrifugation (150  $\mu$ g de protéine) est soniquée 3 fois 5 secondes dans du tampon de lyse. Après une incubation de 30 min dans de la glace, le tampon de réhydratation est ajouté et 250  $\mu$ L sont déposés dans le sarcophage (strip de 13 cm).

**Tableau IV : Identification des protéines potentiellement substrat de la m-calpaïne**

Type de protéines	Numéro d'accèsion	Identification de la protéine	Substrats des calpaïnes (déjà identifiés)	Nombre de peptides	N° des spots
<b>Protéines du cytosquelette et contractiles</b>	Q64727	Métavinculine (vinculine)	<b>OUI</b>	18, 13	1, 2
	P20152	Vimentine	<b>OUI</b>	23, 17, 15, 7	8, 9, 10, 12
	P31001	Desmine	<b>OUI</b>	13, 14, 23, 23	9, 10, 12, 13
	P68373 P05213 P68369	Tubulines	<b>OUI</b>	2	9
	P63260 P60710 P62737 P68033 P68134 P63268	Actines	<b>OUI</b>	4	16
<b>Protéines en relation avec les mitochondries</b>	Q8CAQ8	Mitochondrial inner membrane protein (mitofilin)	NON	8	4
	Q91VD9	NADH-Ubiquinone oxidoreductase (75 kDa subunit) mitochondrial precursor	NON	12	5
	O08749	Dihydropoyl dehydrogenase, mitochondrial	NON	5	11
	P63038	60 kDa heat shock protein, mitochondrial precursor (Hsp60) (60 kDa chaperonin)	NON	9	13
	Q9D2G2	Dihydropoyllysine residue succinyltransferase component of 2 oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial	NON	3	14
<b>Divers</b>	Q60864	Stress-induced-phosphoprotein 1 (STI 1) (Hsc70/Hsp90-organizing protein)	NON	7	7
	Q9JK48	SH3 domain GRB2-like protein B1	NON	6	17
<b>Trafic vésiculaire</b>	P62814	Vacuole ATP synthase	NON	6	13
	Q99JB8	PKC and caseine kinase II substrate protein 3	NON	3	14

## IV – DISCUSSION

Dans cette seconde partie, nous avons suivi l'activité protéolytique neutre calcium-dépendante au niveau des *caveolae*. Les études préliminaires montrent que *in vitro*, la m-calpaïne présente au niveau des *caveolae* est active en présence de calcium et n'est pas régulée par son inhibiteur endogène, la calpastatine. Du fait de l'absence de cette protéine, l'activation et la régulation de la m-calpaïne se feraient donc par l'intermédiaire de signaux externes à ce jour non identifiés.

L'étude de la protéolyse calcium-dépendante a été menée en deux temps : nous nous sommes tout d'abord focalisés sur les protéines étudiées précédemment au laboratoire (PKC $\alpha$ , MARCKS), ensuite, l'analyse protéomique différentielle nous a permis d'élargir notre champ d'investigation et d'identifier un certain nombre d'autres voies d'actions possibles de la m-calpaïne.

Nous montrons qu'en présence de calcium, la m-calpaïne présente dans les *caveolae* est capable de réguler la PKC $\alpha$ . Celle-ci est clivée par la m-calpaïne entre les domaines régulateurs et catalytiques au niveau de la région charnière V3, produisant un fragment actif appelé PKM $\alpha$  (Verret et *al.*, 1999). En effet, l'utilisation d'un ionophore à calcium A23187 et d'un inhibiteur spécifique des calpaïnes (CS peptide) révèle que la m-calpaïne protéolyse la PKC $\alpha$  présente dans les *caveolae*. L'utilisation de m-calpaïne purifiée sur un extrait cavéolaire induit l'apparition de PKM $\alpha$  (fragment catalytique de la PKC $\alpha$ ) alors que la protéase n'a aucun effet sur la protéine MARCKS. Nous mettons en évidence pour la première fois une activité protéolytique de la m-calpaïne sur la PKC $\alpha$  au niveau des *caveolae*. En outre, l'addition d'un activateur de PKC $\alpha$ , le PMA, induit la translocation de celle-ci vers les *caveolae* et la réduction simultanée du taux de la protéine MARCKS. Ce phénomène n'est pas observé lorsqu'un inhibiteur de PKC $\alpha$  est ajouté au même moment.

En présence d'une forte concentration en calcium, la m-calpaïne active est donc capable de réguler l'activité de la PKC $\alpha$  et indirectement de moduler la translocation de la protéine MARCKS des *caveolae* vers le cytosol. Ces résultats semblent logiques dans la mesure où MARCKS ainsi régulée par la PKC $\alpha$  et la m-calpaïne serait un possible lien entre les signaux extracellulaires, la dynamique du cytosquelette d'actine et la différenciation des myoblastes.

MARCKS est un substrat privilégié de la PKC $\alpha$  ou de la PKM $\alpha$ , sa phosphorylation intervient dans la déstabilisation du cytosquelette en relation avec les molécules d'adhésion, la croissance cellulaire ou bien le trafic vésiculaire (Disatnik et *al.*, 2002 ; Arbuzova et *al.*, 2002). Nous montrons ici que la diminution de MARCKS n'est pas due à une protéolyse par les calpaïnes. Le détachement de la MARCKS des *caveolae* serait donc la conséquence de sa phosphorylation par la PKM $\alpha$  en présence de calcium, ou par la PKC $\alpha$  en présence de PMA. Le fait que la protéine MARCKS, associée aux *caveolae*, soit résistante aux calpaïnes est en accord avec des résultats précédents obtenus dans le laboratoire (Dulong et *al.*, 2004). En effet nous avons alors montré que seule la forme cytosolique de MARCKS était réellement dégradée. Cette résistance à la protéolyse par la m-calpaïne pourrait être due à l'inaccessibilité de la protéine due aux multiples interactions avec la membrane (myristoylation en N terminal et PSD (Arbuzova et *al.*, 2002)). Ceci semble être corroboré par les résultats obtenus dans la première partie qui montrent une interaction forte de la protéine MARCKS avec la membrane cavéolaire. Cependant une autre possibilité serait la différence de conformation entre les deux formes : phosphorylée et non phosphorylée.

Il est important de souligner que le "Caevolin Scaffolding Domain (CSD)" des cavéolines est un élément capable d'entraîner l'inhibition de l'activité de la PKC $\alpha$  (Oka et *al.*, 1997). Ainsi, l'activation de la PKC $\alpha$  associée aux *caveolae* est donc hautement régulée, en effet l'activation par les calpaïnes permettrait de lever cette inhibition *via* la libération du fragment PKM.

Par ailleurs, les calpaïnes associées aux membranes, et actives peuvent entraîner la protéolyse de nombreuses autres enzymes transductrices, présentes au niveau des *caveolae*, parmi lesquelles Src ou RhoA (Glading et *al.*, 2002). Les *caveolae* apparaissent donc être un excellent système intégré pour l'identification de régulations temporelles médiées par l'activation de la m-calpaïne. Les résultats obtenus en protéomique différentielle l'ont bien démontré et vont nous permettre d'envisager à court terme d'autres études concernant l'implication de la m-calpaïne dans la différenciation et le développement musculaire.

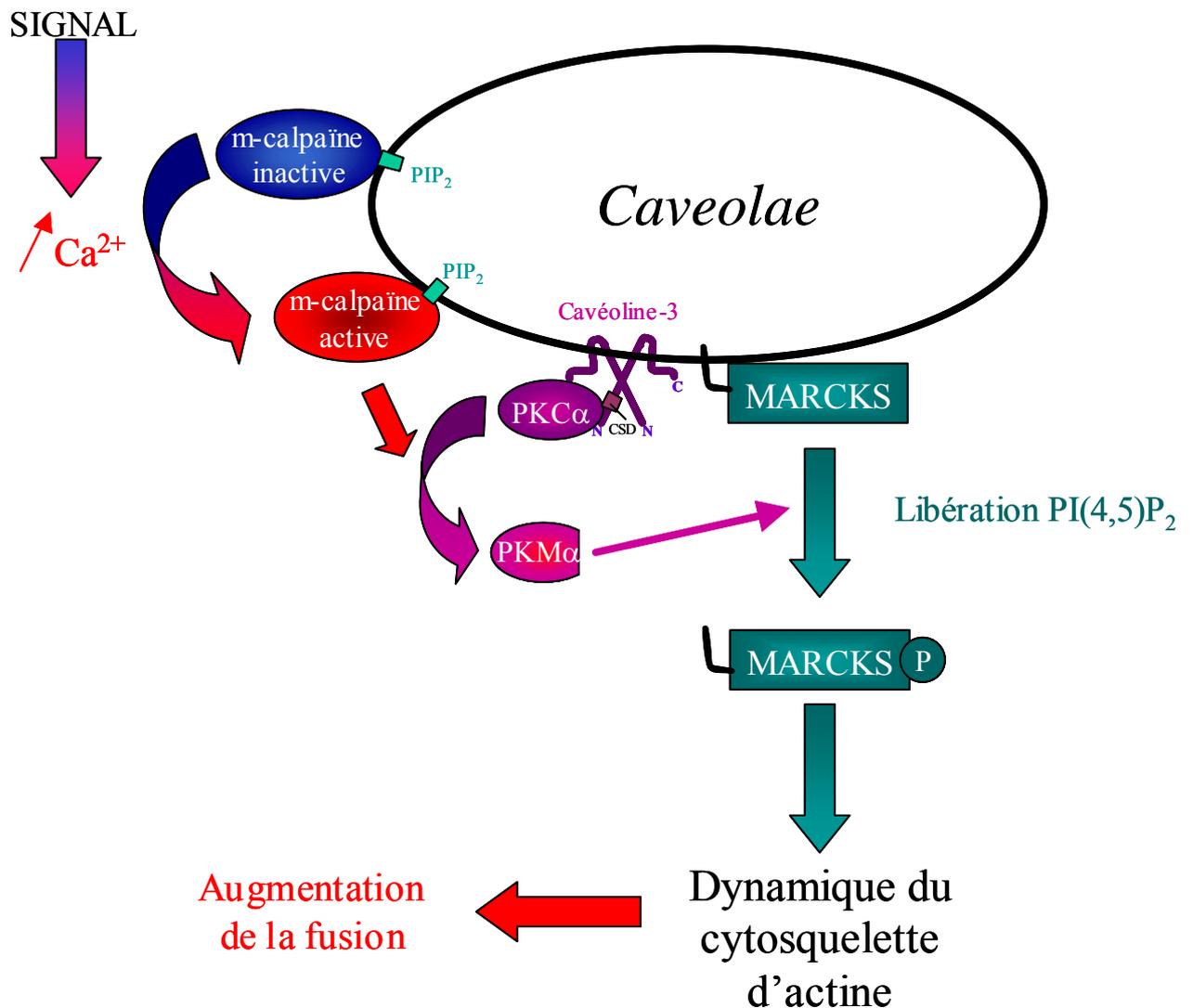


Figure 43 : Hypothèse d'une voie de régulation modulée par la m-calpaïne au niveau des *caveolae*

## Conclusion & Perspectives

Les travaux qui sont présentés dans ce manuscrit s'inscrivent dans la thématique "Protéolyse, Croissance et Développement Musculaire" développée depuis plusieurs années au sein du laboratoire "Biosciences de l'Aliment". Comme nous l'avons largement développé en introduction, on peut rappeler que l'étude du rôle biologique du système protéolytique neutre calcium-dépendant au cours de la différenciation musculaire constitue un enjeu majeur pour la connaissance de la physiologie du tissu musculaire. Cette thématique a notamment montré l'importance de la protéolyse calcium-dépendante dans la différenciation des cellules musculaires (Cottin *et al.*, 1994, Balcerzak *et al.*, 1995, Dargelos *et al.*, 2002,...). Des travaux publiés plus récemment par Dedieu *et al.* (2002, 2003, 2004) ainsi que par Mazères *et al.* (2006) ont mis en évidence l'activation de la m-calpaïne au cours de la différenciation musculaire mais aussi l'intervention de différents facteurs myogéniques régulant ce phénomène. Les calpaïnes interviendraient dans l'adhésion, la migration et la fusion des myoblastes, directement *via* leurs substrats et indirectement *via* le cytosquelette d'actine.

Savart *et al.* avaient mis en évidence en 1995 un complexe  $\mu$ -calpaïne/ PKC $\alpha$  au niveau du muscle squelettique. Le rôle protéolytique des calpaïnes sur la PKC $\alpha$  a été montré au cours de la fusion des myoblastes (Aragon *et al.*, 2002). La protéine MARCKS qui est impliquée dans la stabilisation du cytosquelette, lors de la différenciation cellulaire, a été identifiée comme substrat des calpaïnes, sa protéolyse serait dépendante de sa phosphorylation préalable par la PKC $\alpha$ . De plus, la diminution de son taux d'expression engendre une augmentation très significative de la fusion. Au contraire, une augmentation de l'expression de cette protéine induit une inhibition du processus. En conséquence, la protéolyse de MARCKS serait nécessaire à la fusion des myoblastes (Dulong *et al.*, 2004).

Les *caveolae* dont le rôle biologique n'est pas encore connu avec précision semblent pouvoir intervenir dans les mêmes phénomènes. Ainsi, Galbiati et *al.* (1999) ont montré la forte induction de l'expression de la cavéoline-3 au moment de la fusion des myoblastes et de la différenciation en myotubes.

Un autre argument en faveur de cette corrélation est la forte teneur en calcium de ces vésicules (Isshiki et *al.*, 1999), le calcium étant nécessaire à l'activation des calpaïnes. Enfin le fait que ces deux protagonistes interviennent dans les mêmes maladies (Alzheimer, diabète, dystrophie musculaire) conforte notre hypothèse.

Les résultats présentés permettent de mieux préciser le rôle, au niveau des *caveolae*, des calpaïnes, de la PKC $\alpha$  et de la protéine MARCKS dans les phénomènes intervenant au moment de la différenciation des cellules musculaires.

Le travail rapporté dans ce manuscrit est constitué de deux grandes parties.

Dans un premier temps, nous avons montré pour la première fois une association de la m-calpaïne avec les *caveolae* dans les myoblastes C2C12. Au contraire, la  $\mu$ -calpaïne et la calpastatine ne sont pas représentées dans ces vésicules. Poussard et *al.* (1996) avaient montré une apparition séquentielle des ARNm, des protéines et des activités des  $\mu$ - et m-calpaïnes en culture primaire de myoblastes de rat. Cette présence alternée d'expression et d'activité des deux protéases, ainsi que les différences dans leurs distributions subcellulaires (Kumamoto et *al.*, 1992 ; Moraczewski et *al.*, 1996) nous laissent penser que ces enzymes peuvent avoir des rôles distincts et spécifiques au cours de la myogenèse et par extrapolation dans les pathologies musculaires où elles se trouvent dérégulées (Hussain et *al.*, 1998). Nos résultats

sont en accord avec ces affirmations, en effet, seule la m-calpaïne est impliquée dans la voie de régulation en rapport avec les *caveolae*. La présence de deux de ses substrats, PKC $\alpha$  et MARCKS au niveau des *caveolae* a également été mise en évidence. En effet la m-calpaïne co-immunoprécipite avec la cavéoline-3 en présence de la PKC $\alpha$  et de MARCKS. Une étude biochimique a permis de préciser l'orientation de ces protéines par rapport à la membrane cavéolaire. L'utilisation d'un inhibiteur de la biosynthèse du cholestérol, dont la finalité est de détruire les *caveolae*, a permis de montrer la forte diminution de la fusion associée à une diminution des activités calpaïnes. L'étude protéomique a permis d'avoir une vue moins restrictive des protéines associées. Parmi celles-ci, nombreuses sont celles qui ont déjà été répertoriées comme substrats des calpaïnes.

**Dans une optique opposé, nous envisageons de sur-exprimer la cavéoline et d'observer les effets sur la fusion, sur les protéines associées ainsi que sur les activités calpaïnes.**

Dans un second temps nous avons étudié les phénomènes de protéolyse calcium-dépendante au niveau des *caveolae*. En présence de calcium, la m-calpaïne est capable de réguler l'activité de la PKC $\alpha$  et indirectement de moduler la translocation de MARCKS depuis les *caveolae*.

**Pour la suite de ces travaux, il serait très intéressant de séparer les constituants cellulaires et d'observer vers quel compartiment cellulaire se fait la translocation.** On peut toutefois supposer que la translocation de MARCKS se ferait vers le cytosol comme dans le cas d'une membrane cellulaire classique (Dulong et al., 2004). Il en va de même pour le fragment de dégradation "PKM" qui apparaît lors de la protéolyse *in vitro* de la PKC $\alpha$ . Celui-ci n'a en effet pas pu être mis en évidence *ex vivo* au niveau des *caveolae* lors de l'activation de la PKC $\alpha$  par le PMA.

Notons que la translocation de MARCKS doit vraisemblablement contribuer à rendre localement le PIP2 plus disponible puisque celui-ci n'est plus lié à la MARCKS. Ceci pourrait favoriser, entre autre, l'activation de la m-calpaïne en diminuant la concentration en calcium nécessaire à son activation. En outre, Tapp et *al.* (2005) ont récemment démontré que la protéolyse de MARCKS par les calpaïnes activerait sa fixation à l'actine. La signification de la régulation de MARCKS par les calpaïnes pourrait entraîner une modulation de la dynamique du réseau d'actine. Une telle hypothèse reste cependant à confirmer.

**Concernant l'étude de la "down-regulation" de la PKC $\alpha$  au niveau des *caveolae*, la confirmation de l'implication de la m-calpaïne pourra être réalisée, soit par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques (inhibant totalement l'activité de la m-calpaïne), soit d'antisens dirigés spécifiquement contre la m-calpaïne.**

Toujours dans l'étude de la protéolyse calcium-dépendante au niveau des *caveolae*, nous avons réalisé une analyse protéomique différentielle. Pour cela nous avons combiné un traitement ionophore, dans le but d'activer les systèmes calcium-dépendant à un traitement antisens, et ce afin d'inhiber l'expression des calpaïnes. L'analyse comparative nous a permis d'identifier plusieurs autres substrats. On trouve essentiellement des protéines cytosquelettiques et contractiles, leurs présences au niveau des *caveolae* et leurs protéolyses par les calpaïnes pourraient être un élément clef de régulation lors de la différenciation des myoblastes. **Pour la continuité de ce travail, il apparaît évident de se focaliser sur le rôle de ces protéines associées aux *caveolae*, et ceci en relation directe avec la m-calpaïne.**

Un autre type de protéines a été identifié, en effet on trouve un grand nombre de protéines mitochondriales. Il a récemment été mis en évidence une association de protéines mitochondriales avec les *caveolae* (MacMahon et *al.*, 2006), cependant la signification exacte

de la présence de ces protéines à ce niveau reste à élucider. **Le mode d'action de la m-calpaïne sur ces protéines et les voies qu'elle régule pourra constituer une approche ultérieure. Enfin le rôle des calpaines dans le trafic vésiculaire pourra être abordé.**

**Une autre voie de recherche pourrait aborder l'étude de l'extériorisation de la m-calpaïne.** En effet, cette enzyme a été localisée à l'extérieur de la cellule (Adachi et *al.* 1990, Suzuki et *al.*, 1990). Des travaux effectués au laboratoire, ont montré également qu'au cours des stades précoces de la myogenèse l'activité m-calpaïne serait nécessaire à la fusion des myoblastes (Brustis et *al.*, 1994). Par ailleurs, au moment de la fusion, des modifications majeures sont observées au niveau de la matrice extracellulaire, ces modifications seraient associées à une diminution du taux de fibronectine. Cette protéine intervient dans les interactions entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette par l'intermédiaire des intégrines. Dourdin et *al.* (1997) ont montré que, dans certaines conditions, la m-calpaïne ainsi extériorisée contribuerait à la fusion des myoblastes de par la protéolyse de la matrice extracellulaire et notamment de la fibronectine. Par ailleurs, Nishihara et *al.* ont mis en évidence que l'extériorisation se ferait par l'intermédiaire de vésicules non identifiées. En outre, il vient d'être montré que les *caveolae* sont responsables de l'extériorisation de la cathepsine D au cours de la fusion des myoblastes (Jane et *al.*, 2006). **Les *caveolae* pourraient-elles donc être à l'origine de l'extériorisation de la m-calpaïne ? Afin de vérifier ces dires, l'étude pourrait se faire en deux temps, d'une part observer l'extériorisation de la m-calpaïne par microscopie électronique et d'autre part bloquer la voie de biosynthèse du cholestérol et ainsi constater les conséquences sur l'extériorisation de la m-calpaïne.**

**Les études déjà réalisées sur le modèle C2C12 pourraient également être entreprises sur du tissu musculaire. Par ailleurs, la comparaison avec un modèle de cellules myogéniques tumorales (rhabdomyosarcomes), se caractérisant par l'absence de caveolae, apparaît vraiment intéressante. L'induction ectopique d'une expression de la cavéoline dans ces cellules cancéreuses pourrait être également très instructive.**

Dans les cellules musculaires, les *caveolae* sont connues pour être impliquées dans de nombreux désordres comme la résistance à l'insuline, les dystrophies ou le processus de fusion. Ces structures, ainsi que les calpaïnes interagissent avec les intégrines ou les cadhérines (Boyd et *al.*, 2003 ; Philippova et *al.*, 1998) et sont associées au cytosquelette et aux protéines transductrices impliquées dans la fusion des myoblastes. En réponse à des agonistes spécifiques, l'activation des calpaïnes pourraient être responsable de nombreux effets nécessaires à la myogenèse. **Il faudra donc identifier précisément la (ou les) voie(s) de signalisation responsable de l'activation de la m-calpaïne. Ainsi l'utilisation d'activateurs spécifiques comme les facteurs de croissance (EGF, IGF, TGF,...) combinés à des inhibiteurs spécifiques devrait permettre cette identification.** La voie des MAP Kinase *via* l'EGF pourrait bien être l'une d'elles : en effet ce facteur de croissance est fortement régulé au niveau des *caveolae* ; en outre l'activité protéolytique est stimulée par ERK *via* la phosphorylation de la m-calpaïne (Glading et *al.*, 2004). Un autre argument est la présence des protéines Ras et Src au niveau des *caveolae*, protéines impliquées par ailleurs dans le processus de fusion (Mitin et *al.*, 2001).

*Pour conclure et comme nous avons pu le souligner tout au long de ce manuscrit, la m-calpaïne est présente au niveau des caveolae et intervient dans la transduction du signal au niveau de ces structures. Toutefois, la signification exacte de la présence et du rôle de ces protéases reste tout de même à préciser.*

**N.B. :**

**Les recherches futures menées dans l'équipe devraient concerner plus particulièrement le vieillissement musculaire et ceci en relation directe avec les calpaïnes et les *caveolae*.** Chez le sujet âgé, le processus de régénération, faisant intervenir les cellules satellites, est très ralenti et le muscle est le siège d'une accumulation de radicaux libres issus d'un stress oxydatif incontrôlé. De plus, le taux de cholestérol libre augmente lors du vieillissement, induisant une altération et une modification des *caveolae* (Nakamura et *al.*, 2003). Il s'ensuivrait une anomalie du "turn-over" de certains récepteurs associés (tyrosine kinases et protéine G) (Cho et Park, 2005) et une dérégulation de certaines cascades de signalisation. Plus spécifiquement, la cavéoline-1 (ubiquitaire) serait impliquée dans ces phénomènes de par sa "down-regulation" induisant une activation de ERK dans les cellules satellites.

Dans les cellules sénescents, l'augmentation d'expression de la cavéoline-1 a été montrée (Volonte et *al.*, 2002) et pourrait expliquer la diminution de la capacité de prolifération des cellules satellites lors du vieillissement. Par ailleurs, les calpaïnes joueraient un rôle dans la régulation des processus apoptotiques et prolifératifs des cellules satellites. Les calpaïnes, qui interagissent avec les caspases (protéases clefs du mécanisme apoptotique), pourraient réduire la prolifération des cellules satellites chez l'individu âgé en modulant des protéines régulatrices du cycle cellulaire (cyclines, p27) (Delmas et *al.*, 2003). Elles seraient donc des acteurs clefs du vieillissement des cellules satellites.

***Quoiqu'il en soit, les relations entre la m-calpaïne, les caveolae, le stress oxydatif et l'apoptose (établies dans la littérature comme dans notre analyse protéomique) nous confortent à continuer dans cette voie d'investigation.***

## A

**ABRAHAMSON M, ALVAREZ-FERNANDEZ M, NATHANSON CM.** 20030

Cystatins. *Biochem. Soc. Symp.* ; (70):179-99. Review.

**ADACHI E, MUKAIYAMA T, SASAI K, HAYASHI T, KAWASHIMA S, KASAI Y, HAYASHI M, HASHIMOTO PH.** 1990

Immunohistochemical evidence of the extracellular localization of calcium-activated neutral protease (CANP) in rabbit skeletal muscle, lung and aorta. *Arch. Histol. Cytol.* ; 53(4):413-22.

**ANDERMARCHER E, BOSSIS G, FARRAS R, JARIEL-ENCONTRE I, PIECHACZYK M.** 2005

Proteasomal degradation: from addressing of substrates to therapeutical perspectives. *Med. Sci. (Paris)* ; 21(2):141-9. Review. French.

**ANDERSON RG, KAMEN BA, ROTHBERG KG, LACEY SW.** 1992

Potocytosis: sequestration and transport of small molecules by caveolae. *Science* ; 24;255(5043):410-1. Review.

**ANDERSSON M., SJOSTRAND J., ANDERSSON A.K., ANDERSEN B. AND KARLSSON J.O.** 1994

Calpains in lens epithelium from patients with cataract. *Exp. Eye. Res.* 1994 ; 59(3) :359-364.

**ARAGON B, POUSSARD S, DULONG S, TOUYAROT K, DARGELOS E, BRUSTIS JJ, LEVIEUX D, DUCASTAING A, COTTIN P.** 2002

Protein kinase Calpha is a calpain target in cultured embryonic muscle cells. *Mol. Cell. Biochem.* ; 231(1-2):97-106.

**ARBUZOVA A, SCHMITZ AA, VERGERES G.** 2002

Cross-talk unfolded: MARCKS proteins. *Biochem. J.* 15;362(Pt 1):1-12. Review.

**ARTHUR JS, MYKLES DL.** 2000

Calpain zymography with casein or fluorescein isothiocyanate casein. *Methods Mol. Biol.* ; 144:109-16.

**ATTAIX D, VENTADOUR S, CODRAN A, BECHET D, TAILLANDIER D, COMBARET L.** 2005

The ubiquitin-proteasome system and skeletal muscle wasting. *Essays Biochem.* ; 41:173-86. Review.

**AVERNA M, DE TULLIO R, SALAMINO F, MELLONI E, PONTREMOLI S.** 1999

Phosphorylation of rat brain calpastatins by protein kinase C. *FEBS Lett.* ; 30;450(1-2):13-6.

## B

**BALCERZAK D., POUSSARD S., BRUSTIS J.J., SORIANO M., COTTIN P. AND DUCASTAING A.** 1995

An antisense oligodeoxyribonucleotide to m-calpain mRNA inhibits myoblast fusion. *J. Cell. Biol.* ; 108 : 2077-2082.

- BALCERZAK D, COTTIN P, POUSSARD S, CUCURON A, BRUSTIS JJ, DUCASTAING A.** 1998  
Calpastatin-modulation of m-calpain activity is required for myoblast fusion. *Eur. J. Cell. Biol.* ; 75(3):247-53.
- BARNARD RJ, MORGAN A, BURGOYNE RD.** 1997  
Stimulation of NSF ATPase activity by alpha-SNAP is required for SNARE complex disassembly and exocytosis. *J. Cell. Biol.* ; 17;139(4):875-83.
- BARNOY S., GLASER T. AND KOSOWER N.S.** 1998  
The calpain-calpastatin system and protein degradation in fusing myoblasts. *Biochim. Biophys. Acta.* ; 1402(1) :52-60.
- BARNOY S, KOSOWER NS.** 2003  
Caspase-1-induced calpastatin degradation in myoblast differentiation and fusion: cross-talk between the caspase and calpain systems. *FEBS Lett.* ; 10;546(2-3):213-7.
- BARRET A.J.** 1987  
Introduction to the history and classification of tissue proteinases. *Proteinases in mammalian cells and tissues.* North Holland. ; 1-19.
- BARTOLI M, RICHARD I.** 2005  
Calpains in muscle wasting. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* ; 37(10):2115-33. Review.
- BAUD L, FOUQUERAY B, BELLOCQ A, PELTIER J.** 2003  
Calpains participate in inflammatory reaction development. *Med. Sci. (Paris)* ; 19(1):71-6. Review.
- BECHET D.M., FERRARA M.J., MORDIER S.B., ROUX M.P., DEVAL C.D. AND 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.
- BLACKSHEAR PJ.** 1993  
The MARCKS family of cellular protein kinase C substrates. *J. Biol. Chem.*; 268(3):1501-4. Review.
- BLAU H.M., CHIU C.P. AND WEBSTER C.** 1983  
Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterocaryons. *Cell.* ; 32 : 1171-1180
- BLOMGREN K., ZHU C., WANG X., KARLSSON J.O., LEVERIN A.L., BAHR B.A., MALLARD C. AND HAGBERG H.** 2001  
Synergistic activation of caspase-3 by m-calpain after neonatal hypoxia-ischemia: a mechanism of "pathological apoptosis"? *J. Biol. Chem.* ; 276(13) : 10191-10198.
- BOYD ND, CHAN BM, PETERSEN NO.** 2003  
Beta1 integrins are distributed in adhesion structures with fibronectin and caveolin and in coated pits. *Biochem. Cell. Biol.*; 81(5):335-48
- BRUMELL JH, CRAIG KL, FERGUSON D, TYERS M, GRINSTEIN S.** 1997  
Phosphorylation and subcellular redistribution of pleckstrin in human neutrophils. *J. Immunol.* ; 158(10):4862-71.
- 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):320-7

## C

- CAMPBELL L, GUMBLETON M, RITCHIE K.** 2001  
Caveolae and the caveolins in human disease. *Adv. Drug Deliv.* ; 28;49(3):325-35. Review.
- CARRAGHER N.O., FINCHAM V.J., RILEY D. AND FRAME M.C.** 2001  
Cleavage of Focal Adhesion Kinase by Different Proteases during Src-regulated Transformation and Apoptosis. Distinct roles for calpain and caspases. *J. Biol. Chem.* ; 276(6) :4270-4275.
- CARILLO S., PARIAT M., STEFF A.M., JARIEL-ENCONTRE I., POULAT F., BERTA P. AND PIECHACZYK M.** 1996  
PEST motifs are not required for rapid calpain-mediated proteolysis of c-fos protein. *Biochem. J.* ; 313 :245-251.
- CASTAGNA M, TAKAI Y, KAIBUCHI K, SANO K, KIKKAWA U, NISHIZUKA Y.** 1982  
Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J. Biol. Chem.* ; 257(13):7847-51.
- CHAKRABARTI AK, DASGUPTA S, GADSDEN RH SR, HOGAN EL, BANIK NL.** 1996  
Regulation of brain m calpain Ca<sup>2+</sup> sensitivity by mixtures of membrane lipids: activation at intracellular Ca<sup>2+</sup> level. *J. Neurosci. Res.*; 44(4):374-80.
- CHAMBERLAIN LH, BURGOYNE RD, GOULD GW.** 2001  
SNARE proteins are highly enriched in lipid rafts in PC12 cells: implications for the spatial control of exocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* ; 98(10):5619-24.
- CHIANG H.L. AND DICE J.F.** 1988  
Peptide sequences that target proteins for enhanced degradation during serum withdrawal. *J. Biol. Chem.*; 263 :6797-6805.
- CHO KA, PARK SC.** 2005  
Caveolin-1 as a prime modulator of aging: a new modality for phenotypic restoration? *Mech. Ageing. Dev.* ; 126(1):105-10.
- CIECHANOVER A.** 1994  
The ubiquitin-mediated proteolytic pathway : mechanisms of action and cellular physiology. *Biol. Chem.* ; 375 (a) : 565-581.
- CONG J., GOLL D.E., PETERSON A.M. AND KAPPRELL H.P.** 1989  
The role of autolysis in activity of the Ca<sup>2+</sup>-dependent proteinases (mu-calpain and m-calpain). *J. Biol.Chem.* ; 264(17) :10096-10103
- COOLICAN SA, HATHAWAY DR.** 1984  
Effect of L-alpha-phosphatidylinositol on a vascular smooth muscle Ca<sup>2+</sup>-dependent protease. Reduction of the Ca<sup>2+</sup> requirement for autolysis. *J. Biol. Chem.*; 259(19):11627-30.
- COTTIN P., VIDALENC P.L., MERDACI N. AND DUCASTAING A.** 1983  
Evidence for non-competitive inhibition between two calcium-activated neutral proteinase and its specific inhibitor. *Biochem. Biophys. Acta.* ; 743 :299-302.
- COTTIN P., BRUSTIS J.J., POUSSARD S., ELAMRANI N., BRONCARD S. AND DUCASTAING A.** 1994  
Ca<sup>2+</sup>-dependent protease (calpains) and muscle cell differentiation. *Biochim. Biophys. Acta.*; 1223 :170-178.

**COTTIN P, POUSSARD S, DARGELOS E, BALCERZAK D, ARAGON B, BRUSTIS JJ, DUCASTAING A.** 2000

Calpains and myogenesis. *Methods Mol. Biol.* ; 144:173-80.

**COTTIN P, THOMPSON VF, SATHE SK, SZPACENKO A, GOLL DE.** 2001

Autolysis of mu- and m-calpain from bovine skeletal muscle. *Biol. Chem.* ; 382(5):767-76.

**COUET J., BELANGER M.M., ROUSSEL E., DROLET M.C.** 2001

Cell biology of caveolae and caveolin. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* ; 28, 223-235.

**COUX O, TANAKA K, GOLDBERG AL.** 1996

Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu. Rev. Biochem.* ;65:801-47. Review.

**CROALL D.E. AND DEMARTINO G.N.** 1991

Calcium-activated neutral protease (calpain) system: structure, function, and regulation. *Physiol. Rev.* ; 71(3) :813-847.

**CRYNS V. AND YUAN J.** 1998

Proteases to die for. *Genes. Dev.* ; 12(11):1551-1570.

**CSUKAI M, CHEN CH, DE MATTEIS MA, MOCHLY-ROSEN D.** 1997

The coatomer protein beta'-COP, a selective binding protein (RACK) for protein kinase Cepsilon. *J. Biol. Chem.* ; 272(46):29200-6.

## D

**DAHLMANN B.** 2005

Proteasomes. *Essays Biochem.* ; 41:31-48. Review.

**DARGELOS E., DEDIEU S., MOYEN C., POUSSARD S., VESCHAMBRE P., BRUSTIS J.J. AND COTTIN P.** 2002

Characterization of the calcium-dependent proteolytic system in a mouse muscle cell line. *Mol. Cell. Biochem.* ; 231(1-2) :147-154.

**DAVID JD, SEE WM, HIGGINBOTHAM CA.** 1981

Fusion of chick embryo skeletal myoblasts : role of calcium influx preceding membrane union. *Dev. Biol.* ;82(2):297-307

**DAVID L.L., SHEARER T.R. AND SHIH M.** 1993

Sequence analysis of lens beta-crystallins suggests involvement of calpain in cataract formation. *J. Biol. Chem.* ; 268(3) :1937-1940.

**DEAR N., MATENA K., VIGRON M. AND BOEHM T.** 1997

A new subfamily of vertebrates calpains lacking a calmodulin-like domain : implications for calpain regulation and evolution. *Genomics* ; 45 :175-184.

**DEAR TN, MOLLER A, BOEHM T.** 1999

CAPN11: A calpain with high mRNA levels in testis and located on chromosome 6. *Genomics.* ; 59(2):243-7.

**DEAR TN, BOEHM T.** 2001

Identification and characterization of two novel calpain large subunit genes. *Gene.* ;274(1-2):245-52.

**DEDIEU S., DOURDIN N., DARGELOS E., POUSSARD S., VESCHAMBRE P., COTTIN P. AND BRUSTIS J.J.** 2002

Calpain and myogenesis: development of a convenient cell culture model. *Biol. Cell.* ; 94(2) :65-76.

**DEDIEU S, MAZERES G, POUSSARD S, BRUSTIS JJ, COTTIN P.** 2003

Myoblast migration is prevented by a calpain-dependent accumulation of MARCKS. *Biol. Cell.* ; 95(9):615-23.

**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.

**DELMAS C, ARAGOU N, POUSSARD S, COTTIN P, DARBON JM, MANENTI S.** 2003

MAP kinase-dependent degradation of p27Kip1 by calpains in choroidal melanoma cells. Requirement of p27Kip1 nuclear export. *J. Biol. Chem.* ; 278(14):12443-51.

**DIETZEN DJ, HASTINGS WR, LUBLIN DM.** 1995

Caveolin is palmitoylated on multiple cysteine residues. Palmitoylation is not necessary for localization of caveolin to caveolae. *J. Biol. Chem.* ; 270(12):6838-42.

**DI LISA F., DE TULLIO R., SALAMINO F., BARBATO R., MELLONI E., SILIPRANDI N., SCHIAFFINO S. AND PONTREMOLI S.** 1995

Specific degradation of troponin T and I by mu-calpain and its modulation by substrate phosphorylation. *Biochem.*; 308 ( Pt 1) :57-61.

**DISATNIK MH, BOUTET SC, LEE CH, MOCHLY-ROSEN D, RANDO TA.** 2002

Sequential activation of individual PKC isozymes in integrin-mediated muscle cell spreading : a role for MARCKS in an integrin signaling pathway. *J. Cell. Sci.* ; 115(Pt 10):2151-63.

**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):385-94.

**DOURDIN N, BALCERZAK D, BRUSTIS JJ, POUSSARD S, COTTIN P, DUCASTAING A.** 1999

Potential m-calpain substrates during myoblast fusion. *Exp. Cell. Res.* ; 246(2):433-42.

**DULONG S, GOUDENEGE S, VUILLIER-DEVILLERS K, MANENTI S, POUSSARD S, COTTIN** 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(Pt 3):1015-23.

**DUNN W.A.** 1990

Studies on the mechanism of autophagy : formation of the autophagic vacuole. *J. Cell. Biol.* ; 110 : 1923-1933.

**DUTSON T.R. AND LAWRIE R.A.** 1974

Release of lysosomal enzymes during post-mortem conditioning and their relationship to tenderness. *Food Technol.* ; 9 : 43-50.

## E

**EBISUI C., TSUJINAKA T., MORIMOTO T., FUJITA J., OGAWA A., ISHIDO K., KOMINAMI E., TANAKA K. AND MONDEN M.** 1995

Changes of proteasomes and cathepsins activities and their expression during differentiation of the C2C12 myoblasts. *J. Biochem.*; 117 :1088-1094

**ELCE J.S., DAVIES P.L., HEGADORN C., MAURICE D.H. AND ARTHUR JS.** 1997

The effects of truncations of the small subunit on m-calpain activity and heterodimer formation. *Biochem. J.* ; 326 ( Pt1) :31-38.

**ELCE J.S., HEGADORN C. AND ARTHUR J.S.C.** 1997

Autolysis, Ca<sup>2+</sup> requirement, and heterodimer stability in m-calpain. *J. Biol. Chem.* ; 272 :11268-11275.

**EMORI Y. AND SAIGO K.** 1994

Calpain localization changes in coordination with actin-related cytoskeletal changes during embryonic development of drosophila. *J. Biol. Chem.* ; 269 :25137-25142.

**ENGELMAN J.A., ZHANG X., GALBIATI F., VOLONTE D., SOTGIA F., PESTELL R.G., MINETTI C., SCHERER P.E., OKAMOTO T., LISANTI M.P.** 1998

Molecular genetics of the caveolin gene family: implications for human cancers, diabetes, Alzheimer disease, and muscular dystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* 63,1578-1587.

**ETO A, AKITA Y, SAIDO TC, SUZUKI K, KAWASHIMA S.** 1995

The role of the calpain-calpastatin system in thyrotropin-releasing hormone-induced selective down-regulation of a protein kinase C isozyme, nPKC epsilon, in rat pituitary GH4C1 cells. *J. Biol. Chem.* ; 270(42):25115-20

## F

**FAN TJ, HAN LH, CONG RS, LIANG J.** 2005

Caspase family proteases and apoptosis. *Acta. Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai).*; 37(11):719-27. Review.

**FIELDING PE, FIELDING CJ.** 1996

Intracellular transport of low density lipoprotein derived free cholesterol begins at clathrin-coated pits and terminates at cell surface caveolae. *Biochemistry.* ; 35(47):14932-8.

**FIELDING CJ, FIELDING PE.** 1997

Intracellular cholesterol transport. *J. Lipid Res.* ; 38(8):1503-21. Review.

**FRA AM, MASSERINI M, PALESTINI P, SONNINO S, SIMONS K.** 1995

A photo-reactive derivative of ganglioside GM1 specifically cross-links VIP21-caveolin on the cell surface. *FEBS Lett.* ; 375(1-2):11-4.

**FUKAMI K, FURUHASHI K, INAGAKI M, ENDO T, HATANO S, TAKENAWA T.** 1992

Requirement of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate for alpha-actinin function. *Nature* ; 359(6391):150-2.

## G

- GALBIATI F., VOLONTE D., ENGELMAN J.A., SCHERER P.E., LISANTI M.P.** 1999  
Targeted down-regulation of caveolin-3 is sufficient to inhibit myotube formation in differentiating C2C12 myoblasts. Transient activation of p38 mitogen-activated protein kinase is required for induction of caveolin-3 expression and subsequent myotube formation. *J. Biol. Chem.* ; 274, 30315-30321.
- GALBIATI F, VOLONTE D, MINETTI C, CHU JB, LISANTI MP.** 1999  
Phenotypic behavior of caveolin-3 mutations that cause autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy (LGMD-1C). Retention of LGMD-1C caveolin-3 mutants within the golgi complex. *J. Biol. Chem.*; 274(36):25632-41.
- GALBIATI F, VOLONTE D, CHU JB, LI M, FINE SW, FU M, BERMUDEZ J, PEDEMONTE M, WEIDENHEIM KM, PESTELL RG, MINETTI C, LISANTI MP.** 2000  
Transgenic overexpression of caveolin-3 in skeletal muscle fibers induces a Duchenne-like muscular dystrophy phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci.* ; 97(17):9689-94.
- GALBIATI F., RAZANI B., LISANTI M.P.** 2001  
Caveolae and caveolin-3 in muscular dystrophy. *Trends Mol. Med.* ; 7, 435-441.
- GAMBHIR A, HANGYAS-MIHALYNE G, ZAITSEVA I, CAFISO DS, WANG J, MURRAY D, PENTYALA SN, SMITH SO, MCLAUGHLIN** 2004  
Electrostatic sequestration of PIP2 on phospholipid membranes by basic/aromatic regions of proteins. *Biophys.* ; 86(4):2188-207.
- GARRET C., COTTIN P., DUFOURCQ J. AND DUCASTAING A.** 1988  
Evidence for a Ca<sup>2+</sup>-independent association between calpain II and phospholipid vesicles. *F.E.B.S. Lett.* ; 227(2) :209-214.
- 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):2390-8.
- GLADING A, UBERALL F, KEYSE SM, LAUFFENBURGER DA, WELLS A.** 2001  
Membrane proximal ERK signaling is required for M-calpain activation downstream of epidermal growth factor receptor signaling. *J. Biol. Chem.* ; 276(26):23341-8.
- GLADING A., LAUFFENBURGER D.A., WELLS A.** 2002  
Cutting to the chase: calpain proteases in cell motility. *Trends Cell Biol.* ; 12, 46-54.
- GLENNEY JR JR, SOPPET D.** 1992  
Sequence and expression of caveolin, a protein component of caveolae plasma membrane domains phosphorylated on tyrosine in Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* ; 89(21):10517-21.
- GLENNEY JR JR.** 1992  
The sequence of human caveolin reveals identity with VIP21, a component of transport vesicles. *FEBS Lett.* ; 314(1):45-8.
- GODSON C, MASLIAH E, BALBOA MA, ELLISMAN MH, INSEL PA.** 1996  
Isoform-specific redistribution of protein kinase C in living cells. *Biochim. Biophys. Acta.* ; 1313(1):63-71

**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 DE, THOMPSON VF, LI H, WEI W, CONG J.** 2003

The calpain system. *Physiol. Rev.* ; 83(3):731-801. Review.

**GRAFF JM, GORDON JI, BLACKSHEAR PJ.** 1989

Myristoylated and nonmyristoylated forms of a protein are phosphorylated by protein kinase C. *Science.* ; 246(4929):503-6.

## H

**HAILSTONES D, SLEER LS, PARTON RG, STANLEY KK.** 1998

Regulation of caveolin and caveolae by cholesterol in MDCK cells. *J. Lipid Res.* ; 39(2):369-79.

**HARRIS A.S., CROALL D.E. AND MORROW J.S.** 1989

Calmodulin regulates fodrin susceptibility to cleavage by calcium-dependent protease I. *J. Biol. Chem.* ; 264 :17401-17408.

**HOLTZMAN E.** 1989

Lysosomes. *New York Plenum Press.*

**HOOD JL, BROOKS WH, ROSZMAN TL.** 2004

Differential compartmentalization of the calpain/calpastatin network with the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *J. Biol. Chem.* ; 279(41):43126-35.

**HUSSAIN T., DEVI N.G., KUMARI C.K. AND ANANDARAJ M.P.** 1998

Deletion analysis & calpain status for carrier detection in a family with Duchenne muscular dystrophy. *Indian J. Med.. Res.* ; 108:93-97.

## I

**IMAJOH S., KAWASAKI H. AND SUZUKI K.** 1986

The amino-terminal hydrophobic region of the small subunit of calcium-activated neutral protease (CANP) is essential for its activation by phosphatidylinositol. *J. Biochem. (Tokyo).* ; 99(4) :1281-1284.

**INOMATA M, SAITO Y, KON K, KAWASHIMA S.** 1990

Binding sites for calcium-activated neutral protease on erythrocyte membranes are not membrane phospholipids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* ; 171(2):625-32.

**INOMATA M, KAWASHIMA S.** 1995

The possible self-down-regulation of calpain triggered by cell membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* ; 1235(1):107-14.

**ISSHIKI M., ANDERSON R.G.** 1999

Calcium signal transduction from caveolae. *Cell Calcium.* ; 26, 201-208.

## J

**JAKEN S., PARKER P.J.** 2000

Protein kinase C binding partners. *Bioessays.* ; 22, 245-254.

**JANE DT, MORVAY L, DASILVA L, CAVALLO-MEDVED D, SLOANE BF, DUFRESNE MJ.** 2006

Cathepsin B localizes to plasma membrane caveolae of differentiating myoblasts and is secreted in an active form at physiological pH. *Biol. Chem.* ; 387(2):223-34.

**JOHANNES FJ, PRESTLE J, EIS S, OBERHAGEMANN P, PFIZENMAIER K.** 1994

PKC $\alpha$  is a novel, atypical member of the protein kinase C family. *J. Biol. Chem.* ; 269(8):6140-8.

## K

**KAMPFL A., POSMANTUR R., NIXON R., GRYNSPAN F., ZHAO X., LIU S.J., NEWCOMB J.K., CLIFTON G.L. AND HAYES R.L.** 1996

m-calpain activation and calpain-mediated cytoskeletal proteolysis following traumatic brain injury. *J. Neurochem.* ; 67(4) :1575-1583.

**KAPPRELL H.P. AND GOLL D.E.** 1989

Effect of Ca<sup>2+</sup> on binding of the calpains to calpastatin. *J. Biol. Chem.* ; 264(30) :17888-17896.

**KEENAN C., KELLEHER D.** 1998

Protein kinase C and the cytoskeleton. *Cell Signal.* ; 10, 225-232.

**KIFOR O, KIFOR I, MOORE FD JR, BUTTERS RR JR, BROWN EM.** 2003

m-Calpain colocalizes with the calcium-sensing receptor (CaR) in caveolae in parathyroid cells and participates in degradation of the CaR. *J. Biol. Chem.* ; 278(33):31167-76.

**KISHIMOTO A, TAKAI Y, MORI T, KIKKAWA U, NISHIZUKA Y.** 1980

Activation of calcium and phospholipid-dependent protein kinase by diacylglycerol, its possible relation to phosphatidylinositol turnover. *J. Biol. Chem.*

**KISHIMOTO A, MIKAWA K, HASHIMOTO K, YASUDA I, TANAKA S, TOMINAGA M, KURODA T, NISHIZUKA Y.** 1989

Limited proteolysis of protein kinase C subspecies by calcium-dependent neutral protease (calpain). *J. Biol. Chem.* ; 264(7):4088-92

**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(2):129-36.

**KRAJEWSKA WM, MASLOWSKA I.** 2004

Caveolins : structure and function in signal transduction. *Cell. Mol. Biol. Lett.* ; 9(2):195-220. Review.

**KROEMER G, JAATTELA M.** 2005

Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat. Rev. Cancer.* ; 5(11):886-97. Review.

**KUBOKI M, ISHII H, KAZAMA M.** 1987

Procalpain is activated on the plasma membrane and the calpain acts on the membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* ; 929(2):164-72.

**KUMAMOTO T., KLEESE W.C., CONG J.Y., GOLL D.E., PIERCE P.R. AND ALLEN R.E.** 1992

Localization of the Ca<sup>2+</sup>-dependent proteinases and their inhibitor in normal, fasted, and denervated rat skeletal muscle. *Anat. Rec.* ; 232(1) :60-77.

**KUSUMI A, SUZUKI K.** 2005

Toward understanding the dynamics of membrane-raft-based molecular interactions. *Biochim. Biophys. Acta.* ; 1746(3):234-51. Review.

## L

**LAEMMLI U.K.** 1970

Cleavage of structure protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* ; 227, 680-685.

**LAUX T, FUKAMI K, THELEN M, GOLUB T, FREY D, CARONI P.** 2000

GAP43, MARCKS, and CAP23 modulate PI(4,5)P(2) at plasmalemmal rafts, and regulate cell cortex actin dynamics through a common mechanism. *J. Cell. Biol.* ; 149(7):1455-72.

**LEE W.J., MA H., TAKANO E., YANG H.Q., HATANAKA M. AND MAKI M.** 1992

Molecular diversity in amino-terminal domains of human calpastatin by exon skipping. *J. Biol. Chem.* ; 267 :8437-8442.

**LEE HJ, SORIMACHI H, JEONG SY, ISHIURA S, SUZUKI K.** 1998

Molecular cloning and characterization of a novel tissue-specific calpain predominantly expressed in the digestive tract. *Biol. Chem.* ; 379(2):175-83.

**LI S., OKAMOTO T., CHUN M., SARGIACOMO M., CASANOVA J.E., HANSEN S.H., NISHIMOTO I., LISANTI M.P.** 1995

Evidence for a regulated interaction between heterotrimeric G proteins and caveolin. *J. Biol. Chem.* ; 270, 15693-15701.

**LU Z., LIU D., HORNIA A., DEVONISH W., PAGANO M., FOSTER D.A.** 1998

Activation of protein kinase C triggers its ubiquitination and degradation. *Mol. Cell Biol.* ; 18, 839-845.

**LUDOLPH D.C. AND KONIECZNY S.F.** 1995

Transcription factor families: muscling in on the myogenic program. *F.A.S.E.B. J.* ; 9(15) : 1595-1604

## M

**MAKI M., HATANAKA M., TAKANO E. AND MURACHI T.** 1990

Structure-function relationship of the calpastatins. Intracellular calcium-dependent proteolysis. *CRC Press. Inc. Boca Raton, Florida.* ; 32-51

**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):95-8.

**MARTINY-BARON G, KAZANIETZ MG, MISCHAK H, BLUMBERG PM, KOCHS G, HUG H, MARME D, SCHACHTELE C.** 1993

Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Go 6976. *J. Biol. Chem.* ; 268(13):9194-7

**MARUYAMA K., USAMI M., KAMETANI F., TOMITA T., IWATSUBO T., SAIDO T.C., MORI H. AND ISHIURA S.** 2000

Molecular interactions between presenilin and calpain: inhibition of m-calpain protease activity by presenilin-1, 2 and cleavage of presenilin-1 by m-, mu-calpain.; 5(3) :269-273.

- MATVEEV.S., LI X., EVERSON W., SMART E.J.** 2001  
The role of caveolae and caveolin in vesicle-dependent and vesicle-independent trafficking. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 49, 237-250.
- MAZERES G, LELOUP L, DAURY L, COTTIN P, BRUSTIS JJ.** 2006  
Myoblast attachment and spreading are regulated by different patterns by ubiquitous calpains. *Cell. Motil. Cytoskeleton.* ; 63(4):193-207.
- MCHUGH K.P., SOLOMON K.R., HAUSCHKA P.V.** 2000  
New developments in the biology of osteoclasts and osteoblasts. *Harvard Orthopaedic Journal.*
- MCMAHON KA, ZHU M, KWON SW, LIU P, ZHAO Y, ANDERSON RG.** 2006  
Detergent-free caveolae proteome suggests an interaction with ER and mitochondria. *Proteomics.* ; 6(1):143-52.
- MEACCI E., DONATI C., CENCETTI F., ROMITI E., BRUNI P.** 2000  
Permissive role of protein kinase C alpha but not protein kinase C delta in sphingosine 1-phosphate-induced Rho A activation in C2C12 myoblasts. *FEBS Lett.* ; 482, 97-101.
- MELLGREN R.L.** 1980  
Canine cardiac calcium-dependent proteases: Resolution of two forms with different requirements for calcium. *FEBS Lett.* ; 109, 129-133.
- MELLGREN RL.** 1987  
Calcium-dependent proteases: an enzyme system active at cellular membranes? *FASEB J.* 1(2):110-5.  
Review.
- MELLGREN R.L.** 1991  
Proteolysis of nuclear proteins by mu-calpain and m-calpain. *J. Biol. Chem.* ; 266(21) :13920-13924.
- 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(1):82-6
- MINEO C, YING YS, CHAPLINE C, JAKEN S, ANDERSON RG.** 1998  
Targeting of protein kinase Calpha to caveolae. *J Cell Biol.* ; 141(3):601-10.
- MITIN N, RAMOCKI MB, KONIECZNY SF, TAPAROWSKY EJ.** 2001  
Ras regulation of skeletal muscle differentiation and gene expression. *Methods Enzymol.* ; 333:232-47.
- MOCHLY-ROSEN D., KHANER H., LOPEZ J., SMITH B.L.** 1991  
Intracellular receptors for activated protein kinase C. Identification of a binding site for the enzyme. *J. Biol. Chem.*; 266, 14866-14868.
- MOLDOVEANU T, JIA Z, DAVIES PL.** 2004  
Calpain activation by cooperative Ca<sup>2+</sup> binding at two non-EF-hand sites. *J. Biol. Chem.*; 279(7):6106-14.
- MOLINARI M., ANAGLI J. AND CARAFOLI E.** 1995  
PEST sequences do not influence substrate susceptibility to calpain proteolysis. *J. Biol. Chem* ; 270 :2032-2035.

**MONIA BP.** 1999

Anti-tumor activity of C-raf antisense--correction. *Nat. Med.* ; 5(2):127.

**MONIER S, PARTON RG, VOGEL F, BEHLKE J, HENSKE A, KURZCHALIA TV.** 1995

VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes in vivo and in vitro. *Mol. Biol. Cell.* ; 6(7):911-27.

**MONIER S, DIETZEN DJ, HASTINGS WR, LUBLIN DM, KURZCHALIA TV.** 1996

Oligomerization of VIP21-caveolin in vitro is stabilized by long chain fatty acylation or cholesterol. *FEBS Lett.* ; 388(2-3):143-9.

**MORACZEWSKI J, PIEKARSKA E., BONAUAUD S., WOSINSKA K., CHAZAUD B. AND BARLOVATZ-MEIMON G.** 1996

Differential intracellular distribution and activities of mu- and m-calpains during the differentiation of human myogenic cells in culture. *C. R. Acad. Sci. III.* ; 319(8) :681-686.

**MORASH S.C., BYERS D.M., COOK H.W.** 2000

Activation of phospholipase D by PKC and GTPgammaS in human neuroblastoma cells overexpressing MARCKS. *Biochim. Biophys. Acta.* ; 1487, 177-189.

**MORFORD LA, FORREST K, LOGAN B, OVERSTREET LK, GOEBEL J, BROOKS WH, ROSZMAN TL.** 2002

Calpain II colocalizes with detergent-insoluble rafts on human and Jurkat T-cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* ; 295(2):540-6.

**MOYEN C, GOUDENEGE S, POUSSARD S, SASSI AH, BRUSTIS JJ, COTTIN P.** 2004

Involvement of micro-calpain (CAPN-1) in muscle cell differentiation. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* ; 36(4):728-43.

**MUNICIO MM, LOZANO J, SANCHEZ P, MOSCAT J, DIAZ-MECO MT.** 1995

Identification of heterogeneous ribonucleoprotein A1 as a novel substrate for protein kinase C zeta. *J Biol Chem.*; 270(26):15884-91.

**MURATA M, PERANEN J, SCHREINER R, WIELAND F, KURZCHALIA TV, SIMONS K.** 1995

VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* ; 92(22):10339-43.

## N

**NABI IR, LE PU.** 2003

Caveolae/raft-dependent endocytosis. *J. Cell. Biol.* ; 161(4):673-7. Review.

**NAKAMURA M, KONDO H, SHIMADA Y, WAHEED AA, OHNO-IWASHITA Y.** 2003

Cellular aging-dependent decrease in cholesterol in membrane microdomains of human diploid fibroblasts. *Exp. Cell. Res.* ; 290(2):381-90.

**NELSON WJ, TRAUB P.** 1983

Proteolysis of vimentin and desmin by the Ca<sup>2+</sup>-activated proteinase specific for these intermediate filament proteins. *Mol. Cell. Biol.* ; 3(6):1146-56.

**NEUMAR R.W., HAGLE S.M., DEGRACIA D.J., KRAUSE G.S. AND WHITE B.C.** 1996

Brain mu-calpain autolysis during global cerebral ischemia. *J. Neurochem.* ; 66(1) :421-424.

**NICHOLSON D.W. AND THORNBERRY N.A.** 1997

Caspases: killer proteases. *Trends Biochem. Sci.*; 22(8):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(3):845-53.

## O

**OKA N., YAMAMOTO M., SCHWENCKE C., KAWABE J., EBINA T., OHNO S., COUET J., LISANTI M.P., ISHIKAWA Y.** 1997

Caveolin interaction with protein kinase C. Isoenzyme-dependent regulation of kinase activity by the caveolin scaffolding domain peptide. *J. Biol. Chem.* ; 272, 33416-33421.

**ORITO A, KUMANOGOH H, YASAKA K, SOKAWA J, HIDAKA H, SOKAWA Y, MAEKAWA S.** 2001

Calcium-dependent association of annexin VI, protein kinase C alpha, and neurocalcin alpha on the raft fraction derived from the synaptic plasma membrane of rat brain. *J. Neurosci. Res.* ; 64(3):235-41.

## P

**PETIT V., THIERY J.P.** 2000

Focal adhesions: structure and dynamics. *Biol. Cell.* ; 92, 477-494.

**PHILIPPOVA MP, BOCHKOV VN, STAMBOLSKY DV, TKACHUK VA, RESINK TJ.** 1998

T-cadherin and signal-transducing molecules co-localize in caveolin-rich membrane domains of vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* ; 429(2):207-10.

**PIKE B.R., ZHAO X., NEWCOMB J.K., WANG K.K., POSMANTUR R.M. AND HAYES R.L.** 1998

Temporal relationships between de novo protein synthesis, calpain and caspase 3-like protease activation, and DNA fragmentation during apoptosis in septo-hippocampal cultures. *J. Neurosci. Res.* ; 52(5) : 505-520.

**PONTREMOLI S, MELLONI E, SPARATORE B, SALAMINO F, MICHETTI M, SACCO O, HORECKER BL.** 1985

Role of phospholipids in the activation of the Ca<sup>2+</sup>-dependent neutral proteinase of human erythrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* ; 129(2):389-95.

**PONTREMOLI S., VIOTTI P.L., MICHETTI M., SPARATORE B., SALAMINO F. AND MELLONI E.** 1990

Identification of an endogenous activator of calpain in rat skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* ; 171 :569-574.

**POPESCU L.M.** 1974

Conceptual model of excitation-contraction coupling in smooth muscle : the possible role of the surface micro-vesicles. *Studia biophysica.* 44, 141-153.

**POUSSARD S., DUVERT M., BALCERZAK D., RAMASSAMY S., BRUSTIS J.J., COTTIN P. AND DUCASTAING A.** 1996

Evidence for implication of muscle-specific calpain (p94) in myofibrillar integrity. *Cell. Growth. Diff.* ; 7 :1461-1469.

**PRABHAKAR P., CHENG V., MICHEL T.** 2000

A chimeric transmembrane domain directs endothelial nitric-oxide synthase palmitoylation and targeting to plasmalemmal caveolae. *J. Biol. Chem.* 275, 19416-19421.

**PREDESCU SA, PREDESCU DN, PALADE GE. 1997**

Plasmalemmal vesicles function as transcytotic carriers for small proteins in the continuous endothelium. *Am. J. Physiol.* ; 272(2 Pt 2):H937-49

**PREDESCU D., PREDESCU S., MCQUISTAN T., PALADE G.E. 1998**

Transcytosis of alpha1-acidic glycoprotein in the continuous microvascular endothelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 95, 6175-6180.

**PREVOSTEL C., ALICE V., JOUBERT D., PARKER P.J. 2000**

Protein kinase C (alpha) actively downregulates through caveolae-dependent traffic to an endosomal compartment. *J. Cell. Sci.* 113, 2575-2584.

**Q ; R****QUEST AF, LEYTON L, PARRAGA M. 2004**

Caveolins, caveolae, and lipid rafts in cellular transport, signaling, and disease. *Biochem. Cell. Biol.* ; 82(1):129-44. Review.

**RATHMELL JC, THOMPSON CB. 1999**

The central effectors of cell death in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.*;17:781-828. Review.

**RAYNAUD F, BONNAL C, FERNANDEZ E, BREMAUD L, CERUTTI M, LEBART MC, ROUSTAN C, OUALI A, BENYAMIN Y. 2003**

The calpain 1-alpha-actinin interaction. Resting complex between the calcium-dependent protease and its target in cytoskeleton. *Eur. J. Biochem.* ; 270(23):4662-70.

**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.

**RAZANI B, SCHLEGEL A, LISANTI MP. 2000**

Caveolin proteins in signaling, oncogenic transformation and muscular dystrophy. *J. Cell. Sci.* ; 113 (Pt 12):2103-9.

**RAZANI B, LISANTI MP. 2001**

Caveolin-deficient mice: insights into caveolar function human disease. *J. Clin. Invest.* ;108(11):1553-61. Review.

**RIVETT A.J. 1993**

Proteasomes : multiple proteinase complexes. *Biochem. J.* ; 291 :1-10.

**ROBERTSON LJ, MORTON JD, YAMAGUCHI M, BICKERSTAFFE R, SHEARER TR, AZUMA M. 2005**

Calpain may contribute to hereditary cataract formation in sheep. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* ; 46(12):4634-40.

**ROSEN A., KEENAN K.F., THELEN M., NAIRN A.C., ADEREM A. 1990**

Activation of protein kinase C results in the displacement of its myristoylated, alanine-rich substrate from punctate structures in macrophage filopodia. *J. Exp. Med.* ; 172, 1211-1215.

**ROTHBERG KG, HEUSER JE, DONZELL WC, YING YS, GLENNEY JR, ANDERSON RG. 1992**

Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell.* ;68(4):673-82.

**ROTONDA J, NICHOLSON DW, FAZIL KM, GALLANT M, GAREAU Y, LABELLE M, PETERSON EP, RASPER DM, RUEL R, VAILLANCOURT JP, THORNBERRY NA, BECKER JW.** 1996

The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nat. Struct. Biol.* ; 3(7):619-25

**RUSSO-MARIE F.** 1999

Annexin V and phospholipid metabolism. *Clin. Chem. Lab. Med.* ; 37, 287-291.

**RYBIN V.O., XU X., STEINBERG S.F.** 1999

Activated protein kinase C isoforms target to cardiomyocyte caveolae : stimulation of local protein phosphorylation. *Circ. Res.* ; 84, 980-988.

## S

**SAIDO TC, SHIBATA M, TAKENAWA T, MUROFUSHI H, SUZUKI K.** 1992

Positive regulation of mu-calpain action by polyphosphoinositides. ; 267(34):24585-90.

**SAKAI K., AKANUMA H., IMAHORI K. AND KAWASHIMA S.** 1987

A unique specificity of a calcium activated neutral protease indicated in histone hydrolysis. *J. Biochem. (Tokyo).* ; 101(4) :911-918.

**SANTELLA L, KYOZUKA K, HOVING S, MUNCHBACH M, QUADRONI M, DAINESE P, ZAMPARELLI C, JAMES P, CARAFOLI E.** 2000

Breakdown of cytoskeletal proteins during meiosis of starfish oocytes and proteolysis induced by calpain. *Exp. Cell. Res.*; 259(1):117-26.

**SARGIACOMO M, SCHERER PE, TANG Z, KUBLER E, SONG KS, SANDERS MC, LISANTI MP.** 1995

Oligomeric structure of caveolin: implications for caveolae membrane organization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; 92(20):9407-11.

**SAVART M., VERRET C., DUTAUD D., TOUYAROT K., ELAMRANI N., DUCASTAING A.** 1995

Isolation and identification of a mu-calpain-protein kinase C alpha complex in skeletal muscle. *FEBS Lett.* 359, 60-64.

**SCHAD E, FARKAS A, JEKELY G, TOMPA P, FRIEDRICH P.** 2002

A novel human small subunit of calpains. *Biochem. J.* ; 362(Pt 2):383-8.

**SCHERER PE, LISANTI MP, BALDINI G, SARGIACOMO M, MASTICK CC, LODISH HF.** 1994

Induction of caveolin during adipogenesis and association of GLUT4 with caveolin-rich vesicles. *J. Cell. Biol.* ; 127(5):1233-43.

**SCHERER PE, OKAMOTO T, CHUN M, NISHIMOTO I, LODISH HF, LISANTI MP.** 1996

Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* ; 93(1):131-5.

**SCHLEGEL A., LISANTI M.P.** 2001

The caveolin triad: caveolae biogenesis, cholesterol trafficking, and signal transduction. *Cytokine Growth Factor Rev.* ; 12, 41-51.

**SCHMITZ AA, PLESCHKE JM, KLECZKOWSKA HE, ALTHAUS FR, VERGERES G.** 1998

Poly(ADP-ribose) modulates the properties of MARCKS proteins. *Biochemistry.* ; 37(26):9520-7.

- SCHNITZER JE, OH P, PINNEY E, ALLARD J.** 1994  
Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium : reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *J. Cell. Biol.* ; 127(5):1217-32.
- SCHOENHEIMER R.** 1942  
*The dynamic state of body constituents.* Cambridge : Harvard University Press.
- SEEMANN J., WEBER K., OSBORN M., PARTON R.G., GERKE V.** 1996  
The association of annexin I with early endosomes is regulated by Ca<sup>2+</sup> and requires an intact N-terminal domain. *Mol. Biol. Cell.* ; 7, 1359-1374.
- SEKI K, CHEN HC, HUANG KP.** 1995  
Dephosphorylation of protein kinase C substrates, neurogranin, neuromodulin, and MARCKS, by calcineurin and protein phosphatases 1 and 2A. *Arch Biochem Biophys.* ;316(2):673-9.
- 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):242-52.
- SHIN JS, GAO Z, ABRAHAM SN.** 2000  
Involvement of cellular caveolae in bacterial entry into mast cells. ; 289(5480):785-8.
- SIMONS K., IKONEN E.** 1997  
Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569-572.
- SIMONS K, IKONEN E.** 2000  
How cells handle cholesterol. *Science.* ; 290(5497):1721-6. Review.
- SIMONS K, TOOMRE D.** 2000  
Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* ; 1(1):31-9. Review.
- SIOMBOING XAVIER : THESE SOUTENUE A L'UNIVERSITE DE LILLE II  
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES 2003**  
Mise au point et exploitation de modèles permettant l'étude de molécules potentiellement inhibitrices de la protéine kinase C le granulocyte neutrophile et de molécules potentiellement inhibitrices spécifiques de la cyclooxygénase-2 versus cyclooxygénase-1 dans les lymphocytes et les monocytes.
- SMART E.J., GRAF G.A., MCNIVEN M.A., SESSA W.C., ENGELMAN J.A., SCHERER P.E., OKAMOTO T., LISANTI M.P.** 1999  
Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol. Cell Biol.* ; 19, 7289-7304.
- SOLOMON KR, ADOLPHSON LD, WANK DA, MCHUGH KP, HAUSCHKA PV.** 2000  
Caveolae in human and murine osteoblasts. *J. Bone. Miner. Res.* ; 15(12):2391-401.
- SONG KS, SARGIACOMO M, GALBIATI F, PARENTI M, LISANTI MP.** 1997  
Targeting of a G alpha subunit (G<sub>i1</sub> alpha) and c-Src tyrosine kinase to caveolae membranes: clarifying the role of N-myristoylation. *Cell. Mol. Biol.* ; 43(3):293-303.
- SORIMACHI H., IMAJOH-OHMI S., EMORI Y., KAWASAKI H., OHNO S., MINAMI Y. AND SUZUKI K.** 1989  
Molecular cloning of a novel mammalian calcium-dependent protease distinct from both m- and μ-types. Specific expression of the mRNA in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* ; 264 :20106-20111.
- SORIMACHI H.** 1993  
Tissue-specific calpain and ubiquitous calpain. *Seikagaku.* ; 65(9):1170-4. Review. Japanese.

**SORIMACHI H., ISHIURA S., SUZUKI K.** 1997

Structure and physiological function of calpains. *Biochem. J.* 328, 721-732.

**STENNICKE H.R. AND SALVESEN G.S.** 2000

Caspases - controlling intracellular signals by protease zymogen activation. *Biochim. Biophys. Acta.* ; 1477(1-2):299-306.

**SUNDARAM M, COOK HW, BYERS DM.** 2004

The MARCKS family of phospholipid binding proteins: regulation of phospholipase D and other cellular components. *Biochem. Cell. Biol.* ; 82(1):191-200. Review.

**SUZUKI K., ISHIURA S., TSUJI S., KATAMOTO T., SUGITA H. AND IMAHORI K.** 1979

Calcium activated neutral protease from human skeletal muscle. *F.E.B.S. Lett.* ; 104(2) :355-358.

**SUZUKI K, SHIMIZU K, HAMAMOTO T, NAKAGAWA Y, HAMAKUBO T, YAMAMURO T.** 1990

Biochemical demonstration of calpains and calpastatin in osteoarthritic synovial fluid. *Arthritis Rheum.* ; 33(5):728-32.

**SUZUKI K., SORIMACHI H., YOSHIZAWA T., KINBARA K. AND ISHIURA S.** 1995

Calpain : novel family members, activation and physiological function. *Biol. Chem.* ; 376 :523-529

## T

**TANG Z, SCHERER PE, OKAMOTO T, SONG K, CHU C, KOHTZ DS, NISHIMOTO I, LODISH HF, LISANTI MP.** 1996

Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J. Biol. Chem.* ; 271(4):2255-61.

**TAPP H, AL-NAGGAR IM, YARMOLA EG, HARRISON A, SHAW G, EDISON AS, BUBB MR.** 2005

MARCKS is a natively unfolded protein with an inaccessible actin-binding site: evidence for long-range intramolecular interactions. *J. Biol. Chem.* ; 280(11):9946-56.

**TEMM-GROVE C.J., WERT D., THOMPSON V.F., ALLEN R.E. AND GOLL D.E.** 1999

Microinjection of calpastatin inhibits fusion in myoblasts. *Exp. Cell. Res.* ; 247(1) :293-303.

**THIELE C, HANNAH MJ, FAHRENHOLZ F, HUTTNER WB.** 2000

Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles. *Nat. Cell. Biol.* ; 2(1):42-9

**TOKER A.** 1998

Signaling through protein kinase C. *Front. Biosci.* ; 3:D1134-47. Review.

**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):1333-9.

**TURNER MD, CASSELL PG, HITMAN GA.** 2005

Calpain-10: from genome search to function. *Diabetes Metab. Res. Rev.* ; 21(6):505-14. Review.

## U ; V

**UBERALL F, GISELBRECHT S, HELLBERT K, FRESSER F, BAUER B, GSCHWENDT M, GRUNICKE HH, BAIER G.** 1997

Conventional PKC-alpha, novel PKC-epsilon and PKC-theta, but not atypical PKC-lambda are MARCKS kinases in intact NIH 3T3 fibroblasts. *J. Biol.Chem.*; 272(7):4072-8.

**UNGERMANN C, LANGOSCH D.** 2005

Functions of SNAREs in intracellular membrane fusion and lipid bilayer mixing. *J. Cell. Sci.* ; 118(Pt 17):3819-28. Review.

**VAN DEURS B, ROEPSTORFF K, HOMMELGAARD AM, SANDVIG K.** 2003

Caveolae: anchored, multifunctional platforms in the lipid ocean. *Trends Cell. Biol.* ; 13(2):92-100. Review.

**VARGA LV, TOTH S, NOVAK I, FALUS A.** 1999

Antisense strategies : functions and applications in immunology. *Immunol. Lett.* ; 69(2):217-24. Review.

**VERRET C., POUSSARD S., TOUYAROT K., DONGER C., SAVART M., COTTIN P. AND DUCASTAING A.** 1999

Degradation of protein kinase M $\alpha$  by  $\mu$ -calpain in a  $\mu$ -calpain-protein kinase C $\alpha$  complex. *Biochim. Biophys. Acta.* ; 1430 : 141-148.

**VILLA P.G., HENZEL W.J., SENSENBRENNER M., HENDERSON C.E. AND PETTMANN B.** 1998

Calpain inhibitors, but not caspase inhibitors, prevent actin proteolysis and DNA fragmentation during apoptosis. *J. Cell. Sci.* ; 111 ( Pt 6) : 713-722.

**VOLONTE D, ZHANG K, LISANTI MP, GALBIATI F.** 2002

Expression of caveolin-1 induces premature cellular senescence in primary cultures of murine fibroblasts. *Mol. Biol. Cell.* ; 13(7):2502-17.

**VOLONTE D, PEOPLES AJ, GALBIATI F.** 2003

Modulation of myoblast fusion by caveolin-3 in dystrophic skeletal muscle cells: implications for Duchenne muscular dystrophy and limb-girdle muscular dystrophy-1C. *Mol. Biol. Cell.* ; 14(10):4075-88.

## W, Y, Z

**WADHAWAN V, KARIM ZA, MUKHOPADHYAY S, GUPTA R, DIKSHIT M, DASH D.** 2004

Platelet storage under in vitro condition is associated with calcium-dependent apoptosis-like lesions and novel reorganization in platelet cytoskeleton. *Arch. Biochem. Biophys.* ; 422(2):183-90.

**WENDT A, THOMPSON VF, GOLL DE.** 2004

Interaction of calpastatin with calpain: a review. *Biol. Chem.* ; 385(6):465-72. Review.

**WERNER E.D., BRODSKY J.L. AND MCCRACKEN A.A.** 1996

Proteasome-dependent endoplasmic reticulum-associated protein degradation : an unconventional route to a familiar fate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A.* ; 93(24) :13797-13801.

**WOLFE FH, SATHE SK, GOLL DE, KLEESE WC, EDMUNDS T, DUPERRET SM.** 1989  
Chicken skeletal muscle has three Ca<sup>2+</sup>-dependent proteinases. *Biochim Biophys Acta.* ; 998(3):236-50.

**YAFFE D., SAXEL O.** 1997  
Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature.* ; 270, 725-727.

**YOSHIKAWA Y, MUKAI H, HINO F, ASADA K, KATO I.** 2000  
Isolation of two novel genes, down-regulated in gastric cancer. *Jpn. J. Cancer Res.* ; 91(5):459-63.

**ZON G.** 1995  
Antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides: introductory concepts and possible molecular mechanisms of toxicity. *Toxicol. Lett.* ; 82-83:419-24. Review

## ***PUBLICATIONS DANS REVUES INTERNATIONALES A COMITE DE LECTURE***

**Goudenege Sébastien**, Poussard Sylvie, Dulong Sandrine, Cottin Patrick.

Biologically active milli-calpain associated with caveolae is involved in a spatially compartmentalised signalling involving protein kinase C alpha and myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS).

*The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* (2005 Sept) ; 37(9):1900-10.

Dulong Sandrine, **Goudenege Sébastien**, Vuillier-Devillers Karine, Manenti Stéphane, Poussard Sylvie, Cottin Patrick.

Myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) is involved in myoblast fusion through its regulation by protein kinase C alpha and calpain proteolytic cleavage.

*Biochemical Journal*. (2004) 15;382 : 1015-23.

Moyen Catherine, **Goudenege Sébastien**, Poussard Sylvie, Hadj Sassi Abdessatar, Brustis Jean-Jacques, Cottin Patrick.

Involvement of micro-calpain (CAPN 1) in muscle cell differentiation.

*The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. (2004) ;36(4):728-43.

Une publication supplémentaire sur les travaux présentés au cours de ce manuscrit est programmée (soumission 2006).

"Skeletal muscle *caveolae* proteome reveals interesting perspectives in the biological function of m-calpain."

## ***COMMUNICATIONS ORALES***

Calpaïnes, PKC alpha et MARCKS : mise en évidence d'une voie de transduction au niveau des *caveolae* au cours de la fusion des myoblastes.

Poussard Sylvie, **Goudenege Sébastien**, Cottin Patrick.

1<sup>ères</sup> Journées d'Animation Scientifique du Département PHASE, Tours (mars 2005).

Implication de la protéolyse Ca<sup>2+</sup>-dépendante au cours de la différenciation de la cellule musculaire : étude d'une voie de régulation impliquant la PKC alpha et les *caveolae*.

**Goudenege Sébastien**, Dulong Sandrine, Poussard Sylvie et Cottin Patrick.

3<sup>ème</sup> Congrès Protéolyse Cellulaire, Châtel Guyon (mars 2004).

## **COMMUNICATIONS ECRITES (POSTERS)**

Calpains/*caveolae* interactions during muscle cells differentiation.

**Goudenege Sébastien**, Poussard Sylvie et Cottin Patrick.  
*2<sup>ème</sup> Congrès International Myologie (A.F.M.), Nantes (mai 2005).*

Relations calpaïnes-cavéoles au cours de la différenciation de la cellule musculaire : une approche protéomique prometteuse.

**Goudenege Sébastien**, Poussard Sylvie et Cottin Patrick.  
*1<sup>ier</sup> Congrès International de la S.F.E.A.P., Bordeaux (novembre 2004).*

Implication de la protéolyse  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante au cours de la différenciation de la cellule musculaire : étude d'une voie de régulation impliquant la PKC alpha et les *caveolae*.

**Goudenege Sébastien**, Dulong Sandrine, Poussard Sylvie et Cottin Patrick.  
*3<sup>ème</sup> Congrès Protéolyse Cellulaire, Châtel Guyon (mars 2004).*

Convergence of Protein Kinase C and calpain network in muscular cells.

Dulong Sandrine, **Goudenege Sébastien**, Poussard Sylvie and Cottin Patrick  
*Congrès International Transduction du Signal, Kirchberg, Luxembourg (janvier 2004).*

## **DIVERS**

**ENCADREMENT D'ETUDIANTS Bac +4 et Bac +5 (MASTER première et deuxième année).**

J'ai eu le plaisir d'encadrer 2 étudiants au cours de mon doctorat.

## **ENSEIGNEMENT**

Attaché Temporaire à l'Education et à la Recherche 2005-2006

Cours en agroalimentaire, nutrition et techniques de traitement des aliments (licence professionnelle en agroalimentaire).

TP-TD Module Biochimie et Technologie des Aliments 1<sup>ière</sup> et 2<sup>ème</sup> année à l'Institut Science et Techniques des Aliments de Bordeaux (I.S.T.A.B.).

Vacations au sein de l'I.S.T.A.B. (TP-TD Module Biochimie et Technologie des Aliments 1<sup>ière</sup> année I.S.T.A.B.). 2005

## **CONSEIL SCIENTIFIQUE UNIVERSITAIRE**

Représentant des doctorants au sein du Conseil Scientifique de l'ISTAB 2002-2005