Thèse n° 3948

THÈSE

PRESENTÈE À

L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

SPÉCIALITÉ : NUTRITION

Par Mademoiselle Hélène ROUMES

Pour obtenir le grade de
Docteur

ÉTUDE DE L'IMPLICATION DU SYSTEME PROTEOLYTIQUE NEUTRE CALCIUM-DEPENDANT DANS LA MIGRATION DES CELLULES MUSCULAIRES TUMORALES

Thèse dirigée par le Professeur Patrick COTTIN
Soutenue le 07 décembre 2009

Après avis de :
Mme C. Gauthier Rouvière, Directeur de Recherche (CNRS, Montpellier)
M G. Cabello, Directeur de Recherche (INRA, Montpellier)

Devant la commission d'examen formée de Mmes et MM
H.S. Alameddine, Chargé de Recherche (INSERM 582, Paris VI)
G. Cabello, Directeur de Recherche (INRA, Montpellier)
P. Cottin, Professeur (Université Bordeaux 1, Bordeaux)
C. Gauthier Rouvière, Directeur de Recherche (CNRS, Montpellier)
M. Moenner, Professeur (INSERM E0113, Bordeaux 1)
V. Moreau, Chargé de Recherche (INSERM 889, Bordeaux 2)

-2009-

À ceux que j'aime :
Jean-Philippe
Lou
Jules
Maman et Papa

On résiste à l'invasion des armées,
on ne résiste pas à l'invasion des idées.

Victor Hugo

REMERCIEMENTS

Je souhaite, en premier lieu remercier mes deux rapporteurs de thèse, madame Cécile Gauthier Rouvière ainsi que monsieur Gérard Cabello, pour le temps qu'ils ont accordé à l'évaluation de mon travail. Merci madame Cécile Gauthier Rouvière de m'avoir éclairée sur les cadhérines ainsi que pour vos conseils avisés.
Je remercie également madame le Docteur Hala S. Alameddine d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.
Je remercie monsieur le Professeur Michel Moenner ainsi que madame Violaine Moreau, Chargé de Recherce, pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse. Monsieur Moenner, merci pour votre soutien et votre bonne humeur. Violaine, je te remercie pour ton aide scientifique, ta gentillesse et ton écoute.
Veuillez chacun accepter le témoignage de ma profonde gratitude.

Je tiens à remercier mon directeur de thèse et directeur du laboratoire, monsieur le Professeur Patrick Cottin pour m'avoir accueillie au sein de son unité de recherche, pour son soutien et ses multiples conseils.
J'y associe le Docteur Laetitia Daury pour son encadrement scientifique, pour sa compréhension et sa sympathie. Merci d'avoir partagé tous ces moments, les bons comme les mauvais.
Un grand merci au Professeur Jean-Jacques Brustis pour tout d'abord m'avoir permis de faire une thèse mais aussi pour son soutien. Je vous remercie monsieur pour votre aide tant sur le plan professionnel que personnel. Merci pour votre gentillesse.

Je tiens également à remercier madame le Docteur Élise Dargelos ainsi que madame Sylvie Poussard, Ingénieur de Recherche, pour leur bonne humeur et leur soutien moral.
Merci à Amélie Pires-Alves pour son aide lors des manipulations de protéomique ainsi que pour la vision positive dont elle a fait preuve à de maintes reprises.
Merci à madame le professeur Sophie Javerzat ainsi qu'à monsieur le Docteur Martin Hogedorn pour leur disponibilité ainsi que pour leur aide lors des implantations de cellules sur la CAM.
Je remercie monsieur Pierre Lochet pour m'avoir fait rire si souvent.

J’adresse ma reconnaissance à monsieur le Docteur Ludovic Leloup pour m’avoir aidée lors de ma première année de thèse et pour m’avoir accordé son amitié. Je remercie aussi Cédric Brulé et Pascal Stuelsatz pour avoir égaillé mes journées et m’avoir écouté grommeler.

J’adresse aussi, de tout mon cœur des remerciements à ma famille :
Je remercie madame le Professeur Corinne Roumes pour avoir cru en moi, pour m’avoir soutenue tout au long de ma thèse, pour ses conseils ainsi que pour les « relectures ». Merci papa et maman pour le cocon affectif qui a adouci les vicissitudes de ma thèse.
Un grand merci à mon amour, Jean-Philippe, qui a su au long de ces années rester réconfortant et disponible. Merci d’avoir cru en moi et merci aussi pour avoir coloré ma thèse.
Enfin, je remercie mes enfants, Lou et Jules, pour avoir joué gentiment dans leur chambre et m’avoir laissé rédiger tranquille.

SOMMAIRE

AVANT-PROPOS ---------- 1

INTRODUCTION ---------- 3

ANALYSE DE LA LITTÉRATURE ---------- 5

CHAPITRE 1 : LA PROTEOLYSE CALCIUM-DEPENDANTE ---------- 5

1. Rappel sur les différents systèmes protéolytiques ---------- 6

1.1. Le système lysosomal ---------- 6

1.2. Le système ubiquitine-protéasome ---------- 8

1.3. Les caspases ---------- 10

1.4. Le système protéolytique neutre calcium-dépendant ---------- 11

2. Les calpaïnes ---------- 12

2.1. Caractéristiques structurales ---------- 12

2.1.1. Les calpaïnes chez les vertébrés ---------- 12

2.1.1.1. Les calpaïnes ubiquitaires ---------- 14

2.1.1.1.1. µ- et m-calpaïne ---------- 14

2.1.1.1.2. La calpaïne 5 ---------- 15

2.1.1.1.3. La calpaïne 7 ---------- 16

2.1.1.1.4. La calpaïne 10 ---------- 16

2.1.1.1.5. La calpaïne 12 ---------- 17

2.1.1.1.6. La calpaïne 14 ---------- 17

2.1.1.1.7. La calpaïne 15 ---------- 17

2.1.1.2. les calpaïnes tissu-spécifiques ---------- 17

2.1.1.2.1. La calpaïne 3 ---------- 17

2.1.1.2.2. La calpaïne 6 ---------- 20

2.1.1.2.3. La calpaïne 8 ---------- 20

2.1.1.2.4. La calpaïne 9 ---------- 22

2.1.1.2.5. La calpaïne 11----------22
2.1.1.2.6. La calpaïne 13----------23
2.1.2. Les calpaïnes chez les invertébrés----------24
2.1.2.1. Calpaïnes chez Schistosoma mansoni----------24
2.1.2.2. Calpaïnes chez Drosophilia----------24
2.1.2.3. Calpaïnes chez C. elegans----------25
2.2. Activation et régulation des calpaïnes ubiquitaires----------26
2.2.1. Le calcium : activation des calpaïnes----------26
2.2.2. Régulation par les phosphorylations----------28
2.2.3. La calpastatine : inhibiteur endogène des calpaïnes ubiquitaires ----------29
2.3. Rôles des calpaïnes ----------31
2.3.1. Substrats des calpaïnes----------31
2.3.2. Implications physiologiques des calpaïnes----------32
2.3.2.1. Implication des calpaïnes dans le cycle cellulaire ----------32
2.3.2.2. Implication des calpaïnes dans la régulation de l'expression des gènes----------32
2.3.2.3. Implication des calpaïnes dans l'apoptose----------33
2.3.2.4. Implication des calpaïnes dans la fusion des myoblastes----34
2.3.3. Pathologies impliquant les calpaïnes ----------34
2.3.3.1. Implication des calpaïnes dans la maladie d'Alzheimer ------35
2.3.3.2. Implication des calpaïnes dans la cataracte----------36
2.3.3.3. Implication des calpaïnes dans les ischémies cérébrales et cardiaques----------37
2.3.3.4. Implication de la calpaïne 10 dans le diabète de type II-----37
2.3.3.5. Implication de la calpaïne 3a dans la dystrophie musculaire des ceintures de type 2A----------38
2.3.3.6. Implication des calpaïnes dans le cancer et la dissémination métastatique----------39

CHAPITRE 2 : LE PROCESSUS DE MIGRATION CELLULAIRE----------41

1. Les différentes composantes de la migration ----------42

1.1. La matrice extracellulaire----------43

1.1.1. Les composants de la matrice extracellulaire ----------44

1.1.1.1. Le collagène----------44

1.1.1.2. Les glycosaminoglycanes----------45

1.1.1.3. Les glycoprotéines adhésives----------45

1.1.2. La membrane basale, une matrice extracellulaire particulière ----46

1.2. Les récepteurs de la matrice extracellulaire, à la face ventrale de la cellule----------47

1.2.1. Les récepteurs de type non-intégrine ----------47

1.2.2. Les intégrines----------48

1.3. Les adhésions focales, composition----------49

1.3.1. Les protéines associées directement aux intégrines ----------50

1.3.1.1. Les protéines liées à la chaîne α de l'intégrine ----------50

1.3.1.2. Les protéines liées à la chaîne β de l'intégrine ----------51

1.3.2. Les protéines associées indirectement aux intégrines----------52

1.3.2.1. La vinculine, protéine de structure ----------52

1.3.2.2. Les protéines régulatrices----------53

1.4. Le cytosquelette d'actine----------58

1.4.1. Les constituants de l'actine filamenteuse----------58

1.4.2. La polymérisation de l'actine----------59

1.4.3. Les protéines associées à l'actine----------60

1.4.3.1. Les protéines de réticulation----------60

1.4.3.2. Les protéines de stabilisation----------62

1.4.3.3. Les protéines de séquestration----------63

1.4.3.4. Les protéines de la coiffe----------65

1.4.3.5. Les protéines de fragmentation----------66

1.4.3.6. Les protéines motrices----------67

2. La migration cellulaire----------69

2.1. Assemblage et désassemblage des adhésions focales---------71

2.1.1. Assemblage des adhésions focales ----------71

2.1.1.1. Le regroupement des intégrines ----------71

2.1.1.2. L'association séquentielle des protéines de l'adhésion focale----------71

2.1.1.3. Le rôle des Rho-GTPases dans la formation des adhésions focales----------73

2.1.2. Désassemblage des adhésions focales----------74

2.2. Le dynamisme de l'actine ----------75

2.2.1. Les lamellipodes ----------75

2.2.2. Les filopodes----------76

3. Implication des calpaïnes ubiquitaires dans la migration cellulaire ----------78

3.1. Implication des calpaïnes dans la formation des adhésions focales----------79

3.2. Implication des calpaïnes dans l'étalement cellulaire ---------79

3.3. Implication des calpaïnes dans la formation des protrusions membranaires----------80

3.4. Implication des calpaïnes dans la dissociation des adhésions focales----------80

CHAPITRE 3 : L'INVASION TUMORALE ET LA DISSEMINATION METASTATIQUE ---------- 83

1. Les structures impliquées dans l'invasion et la dissémination métastatique ---------- 84

1.1. Les podosomes ---------- 85

1.2. Les invadopodes ---------- 89

1.2.1. Structure des invadopodes ---------- 89

1.2.2. Régulation des invadopodes ---------- 90

1.2.2.1. Implication des intégrines dans la régulation des invadopodes ---------- 90

1.2.2.2. Implication des protéines kinases dans la régulation des invadopodes ---------- 91

1.2.2.3. Implication des petites GTPases dans la régulation des invadopodes ---------- 91

1.2.2.4. Implication de la cortactine dans la régulation des invadopodes ---------- 92

2. Les acteurs protéiques de l'invasion et de la dissémination métastatique ---------- 93

2.1. Les métalloprotéases ---------- 93

2.2. Les sérine-protéases ---------- 95

2.3. La protéine FAK ---------- 96

2.4. Les calpaïnes ---------- 98

2.4.1. FAK et la m-calpaïne ---------- 98

2.4.2. Caspase-8 et la m-calpaïne ---------- 100

2.4.3. Implication de Capn4 dans l'invasion ---------- 101

2.4.4. Implication des calpaïnes dans l'invasion tumorale via l'inhibition de facteurs suppresseurs de tumeur ---------- 101

2.4.5. Implication des calpaïnes dans la perte d'adhérence intercellulaire : stimulation de l'invasion et de la formation de métastases ---------- 102

3. La dissémination métastatique ----------103

3.1. Implication des adhésions intercellulaires dans la transition épithélio-mésenchymale ----------105

3.2. Implication des intégrines dans la transition épithélio-mésenchymale ----------106

3.3. Implication des Rho-GTPases dans la transition épithélio-mésenchymale ----------107

3.4. Les différents modes de déplacement des cellules tumorales lors de la dissémination métastatique ----------108

3.5. Implication des calpaïnes dans les différentes stratégies de migration et invasion, lors de la dissémination métastatique ----------110

4. Un cas particulier de cancer : les Rhabdomyosarcomes ----------110

4.1. Généralités ----------110

4.2. Les altérations génétiques caractéristiques des Rhabdomyosarcomes ----------111

4.3. Développement métastatique des Rhabdomyosarcomes -----115

MATÉRIELS ET MÉTHODES ---------- 117

1. Culture cellulaire ---------- 117

1.1. Cellules ---------- 117

1.2. Milieux de culture ---------- 117

1.3. Conditions de culture ---------- 118

2. Activité des calpaïnes (t-Boc, calpain 1 substrate) ---------- 118

3.1. Activité globale des calpaïnes ubiquitaires ---------- 118

3.2. Activité de la µ-calpaïne ---------- 119

3. Inhibition des calpaïnes ---------- 119

3.1. Calpeptine ---------- 120

3.2. Calpain-inhibitor III ---------- 120

3.3. Oligonucléotides antisens ---------- 120

4. Tests d'adhésion ---------- 121

5. Tests de migration ---------- 121

6. Tests d'invasion ---------- 122

7. Marquage du cytosquelette d'actine ---------- 123

8. Immuno-localisation cellulaire ---------- 124

9. Transfection de la tropomyosine ---------- 126

10. RT QPCR----------127

10.1. Tanscription inverse----------127

10.2. QPCR ----------127

11. Western-Blot ----------128

12. Analyse Protéomique ----------130

12.1. Extraction et dosage des protéines ----------130

12.2. Première dimension----------130

12.3. Deuxième dimension ----------131

12.4. Révélation----------131

12.5. Traitement des données----------132

12.6. Identification des spots ----------132

13. Analyses statistiques----------132

RÉSULTATS ----------133

CHAPITRE 1 : ACTIVITE DES CALPAÏNES DANS LES RHABDOMYOSARCOMES ----------135

1. **Mise en évidence de la dérégulation de l'activité du système protéolytique neutre calcium-dépendant dans les RMS** ----------135

2. **Quantification de l'expression des différents composants du système neutre protéolytique calcium-dépendant** ----------137

3. **Localisation des composants du système protéolytique neutre calcium-dépendant** ----------141

CHAPITRE 2 : IMPLICATION DES CALPAÏNES DANS L'ADHESION----------143

1. **Les RMS présentent un défaut d'adhésion** ----------143

2. **Les calpaïnes sont impliquées dans l'adhésion cellulaire** ----------144

3. **Localisation de la vinculine, marqueur des plaques d'adhésion**-----146

4. **Expression de la vinculine** ----------148

CHAPITRE 3 : IMPLICATION DES CALPAÏNES DANS LA MORPHOLOGIE ET LE CYTOSQUELETTE D'ACTINE----------151

1. **Implication des calpaïnes dans la morphologie des cellules** ----------151

2. **Désorganisation du cytosquelette dans les cellules tumorales** ------154

3. Implication des calpaïnes dans l'agencement du cytosquelette -----155

4. Régulation du cytosquelette d'actine par les calpaïnes ----------156

5. Cytosquelette d'actine et calpaïnes : nouvelle piste----------162

CHAPITRE 4 : IMPLICATION DES CALPAÏNES DANS LA MIGRATION -------163

1. Caractéristiques cinétiques des RMS comparées aux cellules non-tumorales ----------163

2. Implication des calpaïnes ----------166

CHAPITRE 5 : IMPLICATION DES CALPAÏNES DANS LA CAPACITE INVASIVE DES RMS ----------171

CHAPITRE 6 : ANALYSE PROTEOMIQUE ET SPECTROMETRIE DE MASSE --173

RESULTATS – RESUME ----------178

DISCUSSION ---------- 181

CONCLUSION ET PERSPECTIVES ---------- 197

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES ---------- 203

ANNEXES ---------- 239

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Analyse de la littérature :

Figure 1 : Dégradation lysosomale ---------- 8
Figure 2 : Représentation schématique de la voie ubiquitine/protéasome------ 10
Figure 3 : Structure de la μ- et de la m-calpaïne---------- 15
Figure 4 : Structure de la calpaïne 3a---------- 19
Figure 5 : Structure tridimensionnelle de la calpaïne 8 ---------- 21
Figure 6 : Structure tridimensionnelle de la calpaïne 9 ---------- 22
Figure 7 : Structure tridimensionnelle de la calpaïne 13 ---------- 23
Figure 8 : Schéma de structure des calpaïnes chez la drosophile ---------- 25
Figure 9 : Modèle d'activation des calpaïnes---------- 27
Figure 10 : Schématisation de la localisation des sites de phosphorylation de la μ- et de la m-calpaïne ---------- 29
Figure 11 : Structure schématique de la calpastatine ---------- 30
Figure 12 : Schématisation des mécanismes impliqués dans la maladie d'Alzheimer---------- 35
Figure 13 : Schéma de l'œil situant le cristallin ---------- 37
Figure 14 : Représentation schématique des mutations décrites dans le cadre de la LGMD2A sur le gène codant pour la calpaïne 3a ---------- 39
Figure 15 : Représentation schématique des interactions des composantes de la migration ---------- 43
Figure 16 : Représentation schématique de la triple hélice d'une molécule de procollagène ---------- 45
Figure 17 : Représentation schématique de la structure de la laminine--------- 46
Figure 18 : Représentation schématique de la structure d'une intégrine ------- 49
Figure 19 : Représentation schématique du modèle de recrutement de Shc--- 51
Figure 20 : Modèle de recrutement de la vinculine par PIP2 au niveau de l'adhésion focale ---------- 53
Figure 21 : Représentation schématique de la structure de la protéine kinase FAK ---------- 56

Figure 22 : Représentation schématique de la structure de la protéine kinase Src ---------- 57
Figure 23 : Structure tridimensionnelle du monomère d'actine ---------- 59
Figure 24 : Représentation schématique de la polymérisation en trois phases de la F-actine ---------- 59
Figure 25 : Représentation schématique de la structure de l'homodimère d'α-actinine ---------- 61
Figure 26 : Représentation schématique du rôle de l'α-actinine et de la filamine dans l'établissement, respectivement, de faisceau et de réseau d'actine ---------- 62
Figure 27 : Représentation schématique de la régulation par la tropomyosine de la formation de réseaux d'actine stimulée par Arp2/3 ---------- 63
Figure 28 : Modèle hypothétique de l'interaction entre le monomère d'actine et la thymosine β4 ---------- 64
Figure 29 : Représentation schématique des interactions entre les monomères d'ATP-actine ou ADP-actine et de la thymosine β4 ou la profiline ---------- 65
Figure 30 : Représentation schématique de la molécule de myosine II ---------- 68
Figure 31 : Représentation schématique de l'association de la myosine II et des filaments d'actine F ---------- 68
Figure 32 : Modèle d'action de la myosine ---------- 69
Figure 33 : Représentation schématique des différentes étapes de la migration cellulaire ---------- 70
Figure 34 : Modèle hiérarchique de la séquence de recrutement des protéines au niveau des adhésions focales ---------- 72
Figure 35 : Représentation schématique du rôle de Rho dans l'assemblage des fibres de stress et des adhésions focales ---------- 74
Figure 36 : Représentation schématique du rôle du complexe Arp2/3, des facteurs stimulant la nucléation, de la famille des Rho GTPases et de la cofiline dans la nucléation et l'organisation des filaments d'actine F lors de la formation d'un lamellipode ---------- 76

Figure 37 : Représentation schématique de la naissance d'un filopode à l'extrémité d'un lamellipode---------- 77
Figure 38 : Implication des calpaïnes ubiquitaires dans les différentes étapes du processus de migration ---------- 78
Figure 39 : Représentation schématique des différentes étapes de la dissémination métastatique---------- 84
Figure 40 : Représentation schématique des différentes structures d'adhésion entre la cellule et la matrice extracellulaire ---------- 85
Figure 41 : Modèle de la structure d'un podosome ---------- 88
Figure 42 : Représentation schématique de la dégradation de la matrice extracellulaire au niveau d'un podosome et d'un invadopode ---------- 89
Figure 43 : Représentation schématique de l'implication de la FAK dans la promotion du phénotype invasif---------- 97
Figure 44 : Représentation schématique du rôle de FAK dans la progression de tumeur maligne ---------- 98
Figure 45 : Implication de la m-calpaïne dans la voie de signalisation induite par la liaison des intégrines avec la fibronectine ---------- 99
Figure 46 : Représentation schématique de l'implication de la m-calpaïne dans la migration et la capacité métastatique induite par la caspase-8 --------- 101
Figure 47 : Implication des calpaïnes dans la dissociation des adhésions focales, entraînant une stimulation de la migration, de l'invasion et de la formation des métastases---------- 103
Figure 48 : Vue d'ensemble des interactions moléculaires impliquées dans la régulation de la transition épithélio-mésenchymale ---------- 104
Figure 49 : Représentation schématique de l'adhésion intercellulaire ---------- 106
Figure 50 : Distribution des différents sarcomes de l'enfant ---------- 111

Tableau 1 : Composants de la famille des calpaïnes ---------- 13
Tableau 2 : Molécules présentes au niveau des podosomes et leur localisation---------- 86

Matériels et Méthodes :

Figure 51 : Étapes du marquage du cytosquelette d'actine dans les différentes lignées cellulaires ---------- 124
Figure 52 : Étapes de la transfection de la tropomyosine dans les différentes lignées cellulaires ---------- 126

Tableau 3 : Composition des oligonucléotides ---------- 121
Tableau 4 : Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés pour l'immuno-localisation de la µ-calpaïne, de la m-calpaïne, de la calpastatine et de la vinculine, dans les différentes lignées cellulaires ---------- 125
Tableau 5 : Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés pour l'étude de l'expression de la vinculine, de la µ-calpaïne, de la m-calpaïne, de l'α-actine et de la β-actine, dans les différentes lignées cellulaires ---------- 129

Résultats :

Figure 53 : Observation et quantification de l'activité des calpaïnes ubiquitaires et de la µ-calpaïne dans les LHCN-M2, le C2C12, les ARMS et les ERMS ---------- 136
Figure 54 : Expression de la µ-calpaïne, de la m-calpaïne et de la calpastatine dans les LHCN-M2, les ARMS et les ERMS, en migration ---------- 139
Figure 55 : Niveau d'expression des ARNm de la µ-calpaïne et de la m-calpaïne dans les LHCN-M2, les ARMS et les ERMS, en migration ---------- 140
Figure 56 : Localisation des composants du système protéolytique neutre calcium-dépendant dans les différents types cellulaires ---------- 142
Figure 57 : Cinétique d'adhésion des LHCN-M2, C2C12, ARMS et ERMS, de 0 à 8 heures après ensemencement ---------- 143
Figure 58 : Cinétique d'adhésion des LHCN-M2, C2C12, ARMS et ERMS, en fonction de la concentration en calpeptine, de 0 à 8 heures après ensemencement ---------- 145

Figure 59 Localisation de la vinculine, marqueur des plaques d'adhésion, dans les différentes lignées cellulaires (LHCN-M2, C2C12 et ERMS), traitées ou non avec de la calpeptine (50 µM) ---------- 147
Figure 60: Expression de la vinculine dans les LHCN-M2 et les ARMS en présence ou non de calpeptine et après traitement avec des antisens oligonucléotides dirigés contre la µ-calpaïne ou le m-calpaïne ---------- 149
Figure 61: Morphologie des différents types cellulaires en migration, sur verre ou gélatine ---------- 152
Figure 62: Morphologie des différents types cellulaires en migration---------- 153
Figure 63: Observation du cytosquelette d'actine des différentes lignées cellulaires en migration ---------- 154
Figure 64: Observation du cytosquelette d'actine des différentes lignées cellulaires en migration, après traitement avec de la calpeptine ---------- 155
Figure 65: Quantité d'actine F dans les différents types cellulaires, après traitement ou non avec de la calpeptine ---------- 158
Figure 66: Quantité d'actine F dans les ARMS, après traitement ou non avec l'inhibiteur III ---------- 159
Figure 67: Colocalisation de la µ-calpaïne avec l'actine F dans les LHCN-M2 et les ARMS, après traitement ou non avec la calpeptine ---------- 160
Figure 68: Effet de l'inhibition des calpaïnes sur l'expression de l'α-actine et de la β-actine dans les LHCN-M2, les C2C12 et les ARMS ---------- 161
Figure 69 : Observation des modifications du cytosquelette d'actine des ARMS, après transfection de la tropomyosine α ---------- 162
Figure 70 : Vitesse de migration des différents types cellulaires sur verre et gélatine ---------- 164
Figure 71 : Caractéristiques cinétiques des différents types cellulaires sur verre et gélatine ---------- 165
Figure 72 : Vitesse de migration des différents types cellulaires traités ou non par la calpeptine, sur verre et gélatine ---------- 167
Figure 73 : Représentation des vitesses des différents types cellulaires traités ou non avec de la calpeptine sur verre et gélatine ---------- 168

Figure 74 : Caractéristiques cinétiques des différents types cellulaires traités ou non avec de la calpeptine sur verre et gélatine ---------- 169
Figure 75 : Corrélation positive linéaire entre l'activité calpaïne et la vitesse de migration des différentes lignées cellulaires ---------- 170
Figure 76 : Taux et indice d'invasion des différentes lignées cellulaires en présence ou non de calpeptine---------- 172
Figure 77 : Gel 2D protéomique des ARMS non-traités et traités avec de la calpeptine ou de l'inhibiteur III ---------- 174
Figure 78 : Quantification des variations des cinq spots retens par analyse protéomique entre les cellulesnon-traitées et les cellules tratées avec de la calpeptine ou de l'inhibiteur III ---------- 176

Tableau 22 : Liste des protéines identifiées par spectrométrie de masse------- 175

Annexes :

Tableau 6 : Activité calpaïne globale dans les différentes lignées cellulaires--- 239
Tableau 7 : Activité µ-calpaïne dans les différentes lignées cellulaires---------- 239
Tableau 8 : Expression de la µ-calpaïne, de la m-calpaïne et de la calpastatine dans les ARMS et les ERMS en migration---------- 239
Tableau 9 : Niveau d'expression des ARNm de la µ-calpaïne et de la m-calpaïne dans les ARMS et les ERMS en migration---------- 240
Tableau 10 : Taux d'adhésion des différents types cellulaires, 0, 1, 2, 4, 6 et 8 heures après ensemencement---------- 240
Tableau 11 : Taux d'adhésion des différents types cellulaires, 0, 1, 2, 4, 6 et 8 heures après ensemencement, en présence de 40 µM de calpeptine--------- 241
Tableau 12 : Taux d'adhésion des différents types cellulaires, 0, 1, 2, 4, 6 et 8 heures après ensemencement, en présence de 60 µM de calpeptine---------- 242
Tableau 13 : Expression de la vinculine dans les LHCN-M2 et les ARMS, en présence ou non de calpeptine---------- 242

Tableau 14 : Expression de la vinculine dans les LHCN-M2 et les ARMS, après transfection d'oligonucléotides antisens dirigés contre la μ-calpaïne ou la m-calpaïne ---------- 243
Tableau 15 : Quantification de l'actine F dans les différentes lignées cellulaires, après traitement ou non avec de la calpeptine ---------- 243
Tableau 16 : Expression de l'α-actine et de la β-actine dans les LHCN-M2, C2C12 et ARMS, après traitement ou non avec de la calpeptine ---------- 244
Tableau 17 : Expression de l'α-actine et de la β-actine dans les LHCN-M2 et les ARMS, après transfection d'oligonucléotides dirigés contre la μ-calpaïne ou la m-calpaïne ---------- 245
Tableau 18 : Vitesse de migration des différents types cellulaires sur verre et gélatine ---------- 246
Tableau 19 : Vitesse de migration des différents types cellulaires sur verre et gélatine, en présence et en absence de calpeptine ---------- 247
Tableau 20 : Taux d'invasion des différentes lignées cellulaires ---------- 237
Tableau 21 : Indice d'invasion des différentes lignées cellulaires ---------- 248
Tableau 23 : Quantification des variations des spots retenus par analyse protéomique entre les cellules non-traitées et les cellules traitées avec de la calpeptine ou de l'inhibiteur III ---------- 249

Table des abréviations

ADF : *Actin depolymerising factor*
ARMS : *Alveolar rhabdomyosarcoma*
ATP : *Adenosine triphosphate*
CAM : *chorioallantoic membrane*
Cas : *Crk-associated substrat*
CD44 : *cluster of differenciation*
CDK5 : protéine kinase cycline-dépendante
css1 et **2** : *calpain small unit 1* et *2*
DMEM : *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
EGF : *epidermal growth factor*
ERMS : *embryonic rhabdomyosarcoma*
ERK/MAPK : *extracellular signal-regulated kinase/mitogen activated protein kinase*
e.s.m. : *erreur standard à la moyenne*
FAK : *focal adhesion kinase*
FAT : *focal adhesion targeting*
FBS : *fœtal bovine serum*
FGF : *fibroblastic growth factor*
FGFR : *FGF receptor*
GAPs : *GTPase-activating proteins*
GDI : *guanine dissociation inhibitor*
GDP : *guanosine di-phosphate*
GEF : *guanine nucleotide exchange factor*
GTP : *guanosine tri-phosphate*
HB-EGF : *heparin-binding epidermal growth factor*
HGF : *hepatocyte growth factor*
IGF : *insulin growth factor*
ILK : *Integrin-linked kinase*
IRA : *insulin recepteur isoform A*
IS 1 et **2 :** *insertion sequence 1 et 2*
JNK : *c-Jun N-terminal kinase*
kDa : kilodaltons
LAMP : *lysosome-associated membrane protein*
LGMD2A : *Linb Grigle Muscular Dystrophy type 2A*
MARCKS : *Myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate*
MBS : *myosin-binding subunit of myosin phosphatase*
MLC : *myosin light chain*
MLCK : *myosin light-chain kinase*
MMP : métalloprotéases
MRFs : *Myogenic regulatory factors*
NS : *N-terminal sequence*
PAF : paraformaldéhyde
PAK : *p21 GTPase-activated kinase*
PBS : *phosphate buffered saline*
PI3K : *phosphatidylinositol 3-kinase*
PIP2 : *phosphatidylinositol-4,5-biphosphate*

PIP5-K : *phosphatidylinosotol 4-phosphate 5-kinase*
PIX : *PAK-interacting exchande factor*
PKA : protéine kinase A
PKCi : protéine kinase C iota
PKD : protéine kinase D
PP2A : *protein phosphatase 2A*
PPAR : *peroxisome proliferators-activated receptor*
PRX IV : *peroxiredoxin 4*
Rack1 : *récepteur de la protéine kinase C*
RASSF1A : *Ras-associated domain familly 1A*
RMS : Rhabdomyosarcomes
SDS-PAGE : *sodium dodecyl sufate-polyacrilamide gel electrophoresis*
SH2 : *growth factor receptor-bound protein 2*
SOL : *small orbit lobes*
SOLH : *small optic lobes H*
TBS : *Tris buffer saline*
TIMP : *tissue inhibitors of matrix metalloproteinases*
VASP : *vasodiloator-stimulated phosphoprotein*

AVANT-PROPOS

La thématique de recherche du laboratoire cible l'implication du système protéolytique neutre calcium-dépendant au cours de la croissance et du développement musculaire. Ce système protéolytique, composé de la famille des calpaïnes et de leur inhibiteur endogène, la calpastatine intervient dans de nombreux phénomènes physiologiques tels que l'apoptose, la régulation du cycle cellulaire, la fusion des myoblastes ou encore la migration cellulaire. Les dérégulations de la μ-calpaïne et de la m-calpaïne sont associées dans de nombreuses pathologies telles que la cataracte, les dystrophies musculaires, les maladies de Parkinson et d'Alzheimer et différents types de cancer.

Les précédents travaux de cette équipe de recherche ont permis de mettre en évidence l'intervention de la μ- et de la m-calpaïne dans la fusion des myoblastes de rat, étape importante de la myogenèse [Balcerzak *et al.*, 1995]. De plus, des traitements inhibiteurs (calpeptine, leupeptine, inhibiteur II, oligonucléotides antisens) ainsi que la surexpression de la calpastatine ont démontré qu'une inhibition de l'activité calpaïne induit une diminution des capacités adhésives et migratoires, accompagnée d'un réarrangement du cytosquelette, dans les myoblastes de souris [Dedieu *et al.*, 2004 ; Mazères *et al.*, 2006].

Les travaux présentés dans ce manuscrit s'articulent autour de deux axes de recherche. Le premier a pour objectif de confirmer et compléter les données acquises, dans les myoblastes de souris, dans une toute nouvelle lignée de myoblastes humains. Cette étape sur modèle biologique humain est un préalable à toute perspective thérapeutique, notamment en oncologie tant l'altération des capacités migratoires des cellules cancéreuses reste un enjeu. Des études de vidéo-microscopie, d'immuno-localisation, d'inhibition (calpeptine, inhibiteur III et oligonucléotides antisens) ainsi que des tests d'adhésion et d'invasion ont permis de montrer que les calpaïnes étaient impliquées tant dans l'adhésion et la migration que dans la capacité invasive des myoblastes humains. L'étude plus approfondie de l'organisation du cytosquelette a permis de mettre en évidence un rôle distinct de la

μ- et la m-calpaïne dans cet agencement. Le deuxième axe analyse l'opportunité de faire évoluer la thématique de recherche ciblée sur l'implication des calpaïnes au niveau physiologique vers un aspect plus pathologique. Ainsi, l'étude du rôle des calpaïnes dans différentes étapes de la dissémination métastatique a été réalisée dans deux lignées de rhabdomyosarcomes (ARMS et ERMS). Les études menées sur les cellules non-tumorales ont été réitérées sur les rhabdomyosarcomes (RMS). Elles ont permis de mettre en évidence une forte activité calpaïne dans les RMS, associée à une faible capacité adhésive, une vitesse de migration et un pouvoir invasif élevés ; de plus, l'inhibition de cette activité dérégulée entraîne une diminution tant de la vitesse de migration que de l'adhésion. Enfin, une étude de protéomique associée à la spectrométrie de masse a permis la détection de cibles potentielles des calpaïnes impliquées dans différentes étapes de la dissémination métastatique.

Le but de ces travaux est *in fine* de caractériser le rôle de chaque calpaïne ubiquitaire dans l'adhésion, la migration et l'invasion des cellules tumorales –ici dans le cas de RMS- afin de permettre, ultérieurement, la détermination de cibles thérapeutiques potentielles.

INTRODUCTION

Son livre s'appelait le livre de sable, parce que ni ce livre ni le sable n'ont de commencement ni de fin. Jorge Luis Borges.

Les différents cancers touchent plus de 10 millions de personnes dans le monde. Au stade avancé, le cancer peut devenir métastatique : certaines cellules de la tumeur primaire se détachent de leurs voisines, traversent la membrane basale et migrent par voie sanguine ou lymphatique afin de s'implanter dans un site distant et créer une tumeur secondaire.

Parmi les nombreuses protéases impliquées dans la dissémination métastatique, la μ-calpaïne ainsi que la m-calpaïne présentent une activité dérégulée. Ce sont des endoprotéases calcium-dépendantes présentant une triade catalytique cystéine-histidine-asparagine. Elles ont été impliquées dans la migration et l'invasion, notamment dans le cancer de la prostate ou celui du poumon [Mamoune *et al.*, 2003 ; Xu et Deng, 2004, 2006a, 2006b]. De plus, elles ont été impliquées dans la perte d'adhésion intercellulaire, caractéristique des cellules métastatiques, des cellules épithéliales et des fibroblastes [Hordijk *et al.*, 1997 ; Sander *et al.*, 1999].
À l'heure actuelle, aucune étude du rôle de la μ-calpaïne et de la m-calpaïne dans la dissémination métastatique n'a encore été réalisée. Parce que les rhabdomyosarcomes représentent 33% des sarcomes de l'enfant et que l'activité dérégulée des calpaïnes a été associée à plusieurs types de cancer, l'étude de leur implication dans l'adhésion, la migration et l'invasion (trois étapes clefs de la dissémination métastatique) a été réalisée dans ces cellules tumorales. L'acquisition de la capacité métastatique réduit très fortement le taux de guérison. Identifier les mécanismes de dérégulation des calpaïnes pourrait ouvrir de nouvelles voies thérapeutiques pour enrayer le processus métastatique.

Les développements expérimentaux de cette thèse s'appuient sur une synthèse des travaux scientifiques qui sera présentée dans une première partie. Cette revue de la littérature est organisée en trois chapitres. Le premier chapitre présente les différents systèmes protéolytiques et plus particulièrement le système neutre protéolytique calcium-dépendant, constitué de la μ-calpaïne, la m-calpaïne ainsi que de leur inhibiteur endogène, la calpastatine. Dans le deuxième chapitre, après une description des différentes protéines impliquées dans la migration, leurs interactions lors des étapes d'adhésion et de dé-adhésion sont détaillées en précisant l'implication de la μ-calpaïne et de la m-calpaïne dans ce processus. Enfin, le troisième chapitre de l'analyse littéraire s'attache à la description de l'invasion tumorale et de la dissémination métastatique.

La deuxième partie présente la méthodologie utilisée pour la réalisation de l'étude. Les résultats obtenus sont présentés dans une troisième partie. Ils sont ensuite discutés, soulevant de nouvelles problématiques menant à l'établissement de nouvelles perspectives de recherche.

ANALYSE DE LA LITTÉRATURE

L'invention scientifique réside dans la création d'une hypothèse heureuse et féconde ; elle est donnée par le génie même du savant qui l'a créée. Claude Bernard.

CHAPITRE 1 : LA PROTEOLYSE NEUTRE CALCIUM-DEPENDANTE

La dégradation des protéines intracellulaires est un processus essentiel non seulement à la physiologie de la cellule mais aussi à l'organisme entier. La protéolyse ou catabolisme protéique est un processus biochimique conduisant à l'hydrolyse de liaisons peptidiques soit aux extrémités des chaînes peptidiques par des exoprotéases soit à l'intérieur même de la protéine par des endoprotéases.

La protéolyse intracellulaire intervient dans de nombreux processus :

- le ménage cellulaire qui permet de dégrader les protéines de configuration et de conformation anormale ainsi que les protéines en excès,
- le recyclage afin de produire des acides aminés (75% des acides aminés proviennent de cette dégradation, contre 25% pour les apports exogènes) et de l'énergie,
- la défense de l'organisme *via* la production d'antigènes,
- la régulation de l'expression des gènes par le biais de la maturation protéolytique de précurseurs, le clivage de peptide signal,
- l'apoptose.

La protéolyse intracellulaire intervient donc dans des étapes fondamentales du développement de l'organisme telles que l'organogenèse, la morphogenèse ou encore l'angiogenèse. Cette protéolyse fait intervenir différents systèmes : les lysosomes, le système protéolytique ubiquitine-protéasome-dépendant, les caspases et enfin, le système neutre protéolytique calcium-dépendant, ou calpaïnes, objet de notre étude.

1. Rappel sur les différents systèmes protéolytiques

1.1. Le système lysosomal

Le système lysosomal fait intervenir des protéases actives en milieu acide dont le pH est compris entre 3,5 et 5, maintenu constant par des pompes à protons et des canaux spécifiques aux ions chlorures. Ces enzymes sont les cathepsines. Elles forment une famille d'au moins onze membres et sont dénommées en fonction de l'acide aminé de leur site actif. Dans leur portion glucidique, elles portent toutes un mannose-6-phosphate, « glucide-étiquette » des enzymes lysosomales. Elles sont retrouvées dans le cytosol sous forme de pro-enzyme. La forme active de ces protéases est localisée à l'intérieur des lysosomes, vésicules d'origine golgienne de 0,2 à 0,5 µm, présentes uniquement dans le cytosol des cellules eucaryotes animales. Les lysosomes furent décrits pour la première fois en 1955 par Christian de Duve. La membrane des lysosomes, joue en premier lieu un rôle physique en isolant les hydrolases acides des autres composants cytoplasmiques. Par ailleurs, elle serait impliquée dans le maintien de l'environnement acide intralysosomal, dans le transport des produits de dégradation vers le cytoplasme et dans des interactions avec les membranes des autres organites intracellulaires. Elle présente à la face luminale une couche de protection glucidique. On retrouve au niveau de la membrane lysosomale des molécules particulières : LAMP-1 et LAMP-2 (respectivement *lysosome-associated membrane protein-1* et *2*) [Fukuda, 1991]. Ces glycoprotéines sont composées d'un grand domaine situé dans la lumière du lysosome, d'une portion transmembranaire et d'une courte queue cytoplasmique. Elles sont codées par des gènes différents, localisés respectivement en 13q34 et Xq24-25. Elles constituent 50% des protéines membranaires lysosomales et forment un manteau continu à la surface interne de la membrane lysosomale. Les vésicules lysosomales incorporent par endocytose les protéines à dégrader. Les molécules concernées par cette voie de dégradation sont principalement des protéines intracellulaires dont la demi-vie est longue [Ahlberg *et al.*, 1985 ; Mortimore et Poso, 1984], les protéines membranaires et les protéines extracellulaires. Le système lysosomal peut aussi dégrader un fragment d'organite ou même un organite entier.

Les produits de dégradation de la voie lysosomale sont des peptides et des acides aminés qui sont ensuite libérés dans le cytosol.

Les lysosomes interviennent dans différents modes de dégradation (Figure 1) notamment dans l'hétérophagie, digestion de molécules provenant de l'extérieur de la cellule *via* la phagocytose, la pinocytose ou l'endocytose. Ce rôle est important notamment pour la présentation des antigènes. L'hétérophagie permet l'internalisation de protéines extracellulaires dans des vésicules. Les hétérophagosomes ainsi formés fusionnent avec les lysosomes pour créer un hétérophagosome, lieu de dégradation.

Les lysosomes sont aussi responsables de processus d'autophagie, c'est-à-dire de l'hydrolyse de matériel propre à la cellule. L'autophagie peut être dirigée. En effet, certaines protéines du cytosquelette présentent des régions riches en séquences d'acides aminés KFERQ (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln) [Chiang and Dice, 1988]. Ces protéines sont reconnues par un complexe de protéines du stress dont la principale actrice est la protéine hsc 73 qui en se liant à KFERQ crée un complexe qui migre vers la membrane lysosomale et qui est reconnu par la protéine membranaire lgp96. Le complexe est ensuite dissocié et la protéine substrat traverse la membrane avec l'aide de protéines chaperones.

- La macroautophagie reste le système d'autophagie par défaut. Elle se déroule en trois étapes. Tout d'abord, elle fait intervenir un phénomène de séquestration *via* la génération d'une double membrane qui vient séquestrer le substrat dans une portion entière de cytoplasme pour former un autophagosome, puis la fusion de cette membrane avec un lysosome donne lieu à la formation d'un autolysosome où la dégradation pourra se faire.
- La microautophagie correspond à l'invagination d'un corps multivésiculaire ayant une origine endosomique qui permet l'internalisation de protéines ou d'agrégats protéiques intracellulaires. Lorsque le nombre de vésicules est suffisant, la fusion avec un lysosome permet la dégradation de l'ensemble.

La voie lysosomale peut être inhibée par la leupeptine [Neff *et al.*, 1979] ainsi que par la pepstatine [Dean, 1975] ou par un excès d'acides aminés [Neely *et al.*, 1977 ; Seglen *et al.*, 1980].

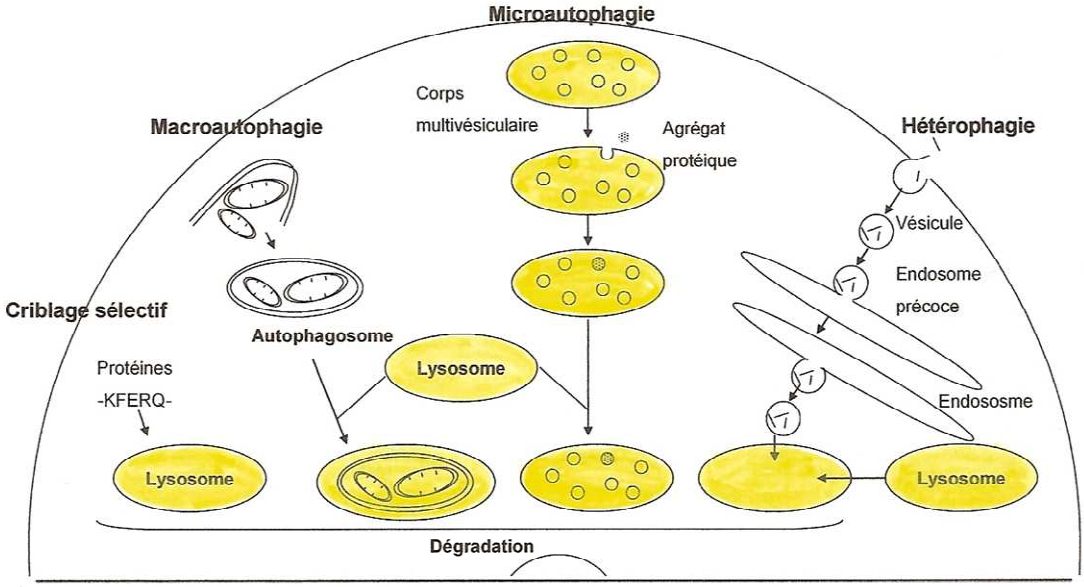

Figure 1 : Dégradation lysosomale d'après S. Carillo *et al.* *(1996).*

1.2. Le système ubiquitine-protéasome

Cette voie est non-lysosomale, ATP-dépendante, à la fois cytoplasmique et nucléaire [Coux *et al.*, 1996 ; Voges *et al.,* 1999]. Elle est essentielle à la dégradation des protéines intracellulaires : dégradation des protéines conformes et non-conformes [Rechsteiner, 1991], production des antigènes de classe 1 présentés aux cellules immunitaires, régulation des protéines [Rock et Goldberg, 1999], contrôle du cycle cellulaire, de la transcription, de la transduction des signaux [Attaix et Combaret, 2001 ; Peters *et al.*, 1998], production d'énergie par dégradation de protéines musculaires dans des états pathologiques. La destruction des protéines se déroule en deux étapes : les protéines substrats sont dans un premier temps marquées par l'addition covalente de chaînes d'ubiquitines (petite protéine de 76 acides aminés stable et très conservée) (Figure 2A) ; ces protéines sont ensuite reconnues par le protéasome 26S par l'intermédiaire des chaînes d'ubiquitines et hydrolysées (Figure 2B). L'ubiquitination des protéines nécessite l'intervention de plusieurs enzymes pour aboutir à la formation d'un complexe multiubiquitiné [Pickart, 2001].

En présence d'ATP, l'enzyme E1 (*ubiquitin-activating-enzyme* ; deux isoformes du point moléculaire de 110 et 117 kDa) active l'ubiquitine par un mécanisme

conduisant à la formation d'une liaison thiol ester riche en énergie entre un résidu cystéine de son site catalytique et l'ubiquitine. L'ubiquitine est ensuite transférée sur une enzyme E2 (*ubiquitin-conjugating* ; ayant une masse moléculaire comprise entre 14 et 35 kDa). Les enzymes E3 (*ubiquitin-protein ligase*) assurent la spécificité de l'ubiquitination du substrat et permettent la conjugaison de l'ubiquitine par deux mécanismes : (i) elles fixent elles-mêmes l'ubiquitine provenant de E2 puis le transfèrent sur un substrat spécifique [Figure 2Aa] ou (ii) jouent le rôle d'adaptateur moléculaire entre E2 et le substrat [Figure 2Ab]. Il est cependant important de noter que l'ubiquitination des substrats n'est pas uniquement un signal de dégradation. Il s'agit d'une modification post-traductionnelle dirigeant les protéines vers de multiples fonctions ; ainsi, les protéines mono-, di- ou tri-ubiquitinées sont généralement des protéines stables qui ne sont pas dégradées. De ce fait, seules les protéines conjuguées avec au moins quatre molécules d'ubiquitine sont reconnues par le protéasome 26S et dégradées.

Le protéasome 26S (masse moléculaire : 2000 kDa) qui dégrade des protéines de 4 à 20 acides aminés, est formé d'un cœur protéolytique, le protéasome 20S (mase moléculaire : 700 kDa) et de deux complexes régulateurs 19S [Attaix *et al.*, 2001 ; Voges *et al.*, 1999]. Le sous-domaine 20S est constitué de quatre anneaux identiques deux à deux et comprenant chacun sept sous-unités [Rivett *et al.*, 1991]. Les activités protéolytiques sont portées par les sous-unités β et sont situées à l'intérieur de la structure cylindrique creuse du 20S. Les sous-unités α n'ont pas d'activité enzymatique et interviennent entre autres, dans l'interaction avec les complexes régulateurs. Le complexe 19S, activateur ATP-dépendant du protéasome 20S est formé de 18 sous-unités [Voges *et al.*, 1999]. Au moins l'une de ces sous-unités interagit avec les polymères d'ubiquitine fixés au substrat. Six ATPases ont également été identifiées, et sont impliquées dans la dénaturation des substrats permettant ainsi son entrée dans la chambre interne de protéolyse [Braun *et al.*, 1999a]. Une activité isopeptidase (*ubiquitin hydrolase*) libère les molécules d'ubiquitine présentes sur le substrat permettant leur recyclage.

La dégradation des protéines par le protéasome entraîne la formation de peptides de 20 acides aminés qui sont soit recyclés, soit peuvent servir de peptides antigéniques.

Il est à noter que le protéasome 26S dégrade plusieurs substrats non ubiquitinés comme l'ornithine décarboxylase et IκBα [Attaix *et al.*, 1998 ; Benaroudj *et al.*, 2001]

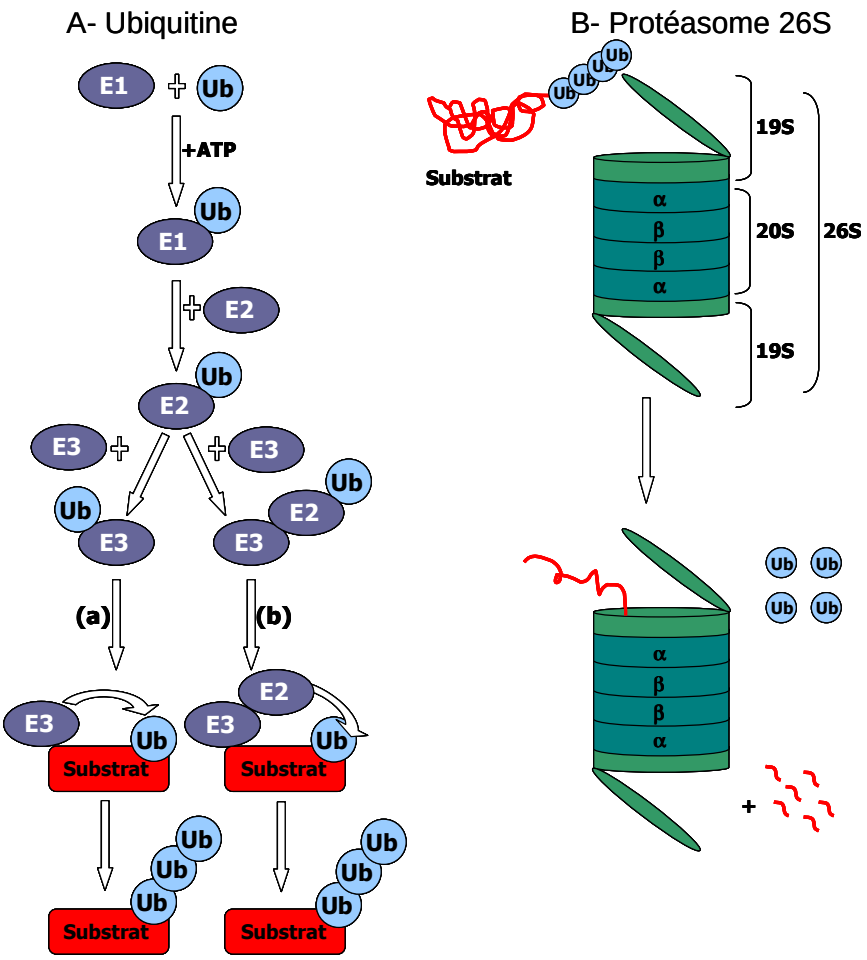

Figure 2 : Représentation schématique de la voie ubiquitine/protéasome d'après Ferrara *et al.* *(2001).* Schéma de l'ubiquitination (A). Schéma du protéasome 26S (B). E1 représente l'enzyme d'activation de l'ubiquitine, E2 représente l'enzyme de conjugaison de l'ubiquitine et E3, la ligase assurant la spécificité de l'ubiquitination du substrat et permettant la conjugaison de l'ubiquitine par la voie a ou b.

1.3. Les caspases

Les caspases sont des protéines impliquées dans le phénomène de mort cellulaire programmée ou apoptose. Quatorze caspases ont été identifiées chez les mammifères [Nicholson et Thornberry, 1997]. Le nom de ces protéases à cystéine vient de leur spécificité de clivage après l'acide aspartique (cystéines aspartases). Elles sont classées en trois groupes distincts selon leur activité et la taille de leur

pro-domaine [Stennicke et Salvesen, 2000]. Ainsi, les caspases 1, 2, 4, 5, 11, 12, 13 et 14 sont caractéristiques de caspases inflammatoires alors que les caspases apoptogènes correspondent aux caspases initiatrices (2, 8, 9 et 10) et aux caspases effectrices (3, 6 et 7). Toutes les caspases ont une structure très conservée comprenant, un domaine N-terminal de taille variable [Cryns et Yuan, 1998], un domaine qui deviendra après clivage la grande sous-unité (masse moléculaire : 17-21 kDa, portant le centre actif) et un domaine donnant après clivage la petite sous-unité (masse moléculaire : 10-14 kDa). Elles sont donc synthétisées sous forme de précurseur, à l'état de zymogène. La conversion de zymogène en enzyme mature nécessite au moins deux clivages au niveau de liaison Asp-X. Ces clivages successifs ont lieu de manière séquentielle : dans un premier temps une coupure entre la grande et la petite sous-unité puis la libération du prodomaine [Walker *et al.*, 1994 ; Wilson *et al.*, 1994 ; Rotonda *et al.*, 1996]. Il y a donc par autoprotéolyse production d'une grande sous-unité α et d'une petite β. La forme active est tétramèrique : $\alpha_2\beta_2$.
Les principaux substrats clivés par les caspases au cours de l'apoptose sont des protéines cytoplasmiques, nucléaires, des protéines impliquées dans le métabolisme et la réparation de l'ADN, des protéines kinases ainsi que des protéines impliquées dans la transduction du signal et dans l'expression des gènes, dans la régulation du cycle cellulaire, la prolifération, dans les maladies génétiques ou des protéines de régulation de l'apoptose.

1.4 Le système protéolytique neutre calcium-dépendant

Les calpaïnes ont été découvertes dans un large spectre d'organismes, de la levure à l'homme en passant par Aspergillus, le nématode ou le poulet [Cao *et al.*, 2001].
Les calpaïnes (pour <u>cal</u>cium et pa<u>païne</u>) sont des endoprotéases à cystéine de type papaïne découvertes dans le cerveau de rat par Guroff en 1964 [Guroff, 1964]. Leur activité est dépendante du calcium [Croall et De Martino, 1991], d'où leur description sous le terme de 'système neutre protéolytique calcium-dépendant'.
Compte tenu de l'importance de ces protéases dans les développements expérimentaux de cette thèse, leurs caractéristiques structurales et fonctionnelles sont détaillées.

2. Les calpaïnes

2.1. Caractéristiques structurales

2.1.1. Les calpaïnes chez les vertébrés

L'ensemble des membres de la famille des calpaïnes est codé par 14 gènes désignés par l'acronyme CAPN [Sorimachi et Suzuki, 2001 ; Glading et al., 2002 ; Sato et Kawashima, 2001] (Tableau 1). Ces protéases sont classées selon la présence dans leur structure de EF-hands ou « calmodulin-like » [Kretsinger, 1972] et l'on distingue alors les calpaïnes conventionnelles (calpaïnes 1, 2, 3, 8, 9, 11, 12 et 13) qui possèdent des EF-hands, des calpaïnes non conventionnelles (calpaïnes 5, 6, 7, 10, 14 et 15) qui en sont dépourvues. Ces structures particulières permettent de fixer le calcium avec une forte affinité (Kd de 10^{-4} à 10^{-9} [Ikura, 1996]). Un autre classement permet de discriminer ces protéases selon leur localisation. Ainsi, il existe des calpaïnes tissu-spécifiques (calpaïnes 3, 6, 8, 9, 11 et 13) localisées uniquement dans certains tissus (exemple : la calpaïne 3 est spécifique du muscle squelettique) et de calpaïnes ubiquitaires (calpaïnes 1, 2, 5, 7, 10, 12, 14 et 15) présentent dans tous les tissus.

Tableau 1 : Composants de la famille des calpaïnes, d'après Goll et al. *(2003)*.

Calpaïnes	**Gènes *capn***	**nomenclature**	**identification**	**EF-hand**	**Tissus**
Calpaïne 1	***capn1***	**CAPN1 ou µ-calpaïne**	**1964 (Guroff *et al.*)**	**+**	**ubiquitaire**
Calpaïne 2	***capn2***	**CAPN2 ou m-calpaïne**	**1964 (Guroff *et al.*)**	**+**	**ubiquitaire**
Calpaïne 3	*capn3*	nCL-1 ou p94	1989 (Sorimachi)	+	muscle squelettique, cristallin, rétine
Calpaïne 5	*capn5*	htra3, nCL-3	1997 (Mugita *et al.*)	-	ubiquitaire
Calpaïne 6	*capn6*	CAPNX, calpamoduline	1997 (Dear *et al.*)	-	placenta, utérus
Calpaïne 7	*capn7*	palBX	1999 (Franz *et al.*)	-	ubiquitaire
Calpaïne 8	*capn8*	nCL-2	1993 (Sorimachi *et al.*)	+	estomac
Calpaïne 9	*capn9*	nCL-4	1998 (Lee *et al.*)	+	appareil digestif
Calpaïne 10	*capn10*	CAPN10 ou CAPN8	2000 (Horikawa *et al.*)	-	ubiquitaire
Calpaïne 11	*capn11*	CAPN11	1999 (Dear *et al.*)	+	testicules
Calpaïne 12	*capn12*	CAPN12	2000 (Dear *et al.*)	+	ubiquitaire
Calpaïne 13	*capn13*	CAPN13	2001 (Dear et Boehm)	-	testicules, poumons
Calpaïne 14	*capn14*	CAPN14	2001 (Dear et Boehm)	+	ubiquitaire
Calpaïne 15	*capn15*	SolH	1991 (Delaney *et al.*)	-	ubiquitaire

Sous-unités régulatrices	**Gènes**	**nomenclature**	**identification**	**EF-Hand**	**Tissus**
Css1	capn-s1 ou cpns1	Css1 (anciennement CAPN4 ou calpaïne 4)	1964 (Guroff)	+	Ubiquitaire
Css2	capn-s2 ou cpns2	Css2	2002 (Schád et al.)	+	Tissu-spécifique

2.1.1.1. Les calpaïnes ubiquitaires

2.1.1.1.1. µ- et m-calpaïne

Les isoformes principales des calpaïnes ubiquitaires sont la calpaïne 1 ou µ-calpaïne et la calpaïne 2 ou m-calpaïne. Ce sont des hétérodimères composés d'une grande sous-unité catalytique et d'une petite sous-unité régulatrice. Chez l'homme, la sous-unité catalytique de la µ-calpaïne est codée par le gène CAPN1, situé sur le chromosome 11 (11q13) et celle de la m-calpaïne par le gène CAPN2, situé sur le chromosome 1 (1q41-42). Les sous-unités catalytiques présentent toutes deux une masse moléculaire de 80 kDa. La dénomination µ- et m- de ces protéases se justifie par une activation *in vitro* qui requiert respectivement des concentrations calciques de l'ordre du micro- et du milli-molaire [Suzuki, 1991].

La molécule de calpaïne peut-être divisée en domaines distincts par leur structure et leur fonction (Figure 3).

- Dans la sous-unité catalytique, le domaine I, situé du côté N-terminal est clivé par autolyse. L'homologie de séquence codant pour ce domaine varie de 72 à 86% selon les espèces. Le domaine II est lui-même constitué de deux sous-domaines : IIa qui comporte une cystéine, et IIb possédant une histidine et une asparagine. Ces trois amino-acides spécifiques forment la clef catalytique de la protéase. Bien que dépourvu de structure EF-hand, chaque sous-domaine du domaine II est capable de fixer un atome de calcium [Khorchid et Ikura, 2002 Moldoveanu *et al.*, 2004]. Ce domaine présente une homologie de séquence variant de 85 à 93% selon les espèces. Le domaine III est un domaine de régulation qui contient des sites de phosphorylation et de liaison aux phospholipides membranaires [Ono *et al.* 1998a ; Tompa *et al.* 2001] ainsi qu'une structure EF-hand à proximité du domaine II permettant de lier le calcium [Andersen *et al.,* 1991]. Enfin, le domaine IV, ou domaine « calmodulin-like », possède cinq motifs EF-hands impliquées dans la liaison au calcium ainsi que dans la liaison à une sous-unité régulatrice.
- Cette sous-unité régulatrice peut-être soit codée par le gène *css1* (*calpain small unit 1*) ou par le gène *css2* (*calpain small unit 2*). Sa masse

moléculaire est de 30 kDa. Elle contient un domaine V impliqué dans l'autoprotéolyse et un domaine VI encore appelé IV' de par son homologie avec le domaine IV de la sous-unité catalytique. Le domaine VI possède cinq EF-hands permettant la fixation du calcium et serait impliqué dans l'hétérodimérisation de la sous-unité régulatrice et de la sous-unité catalytique.

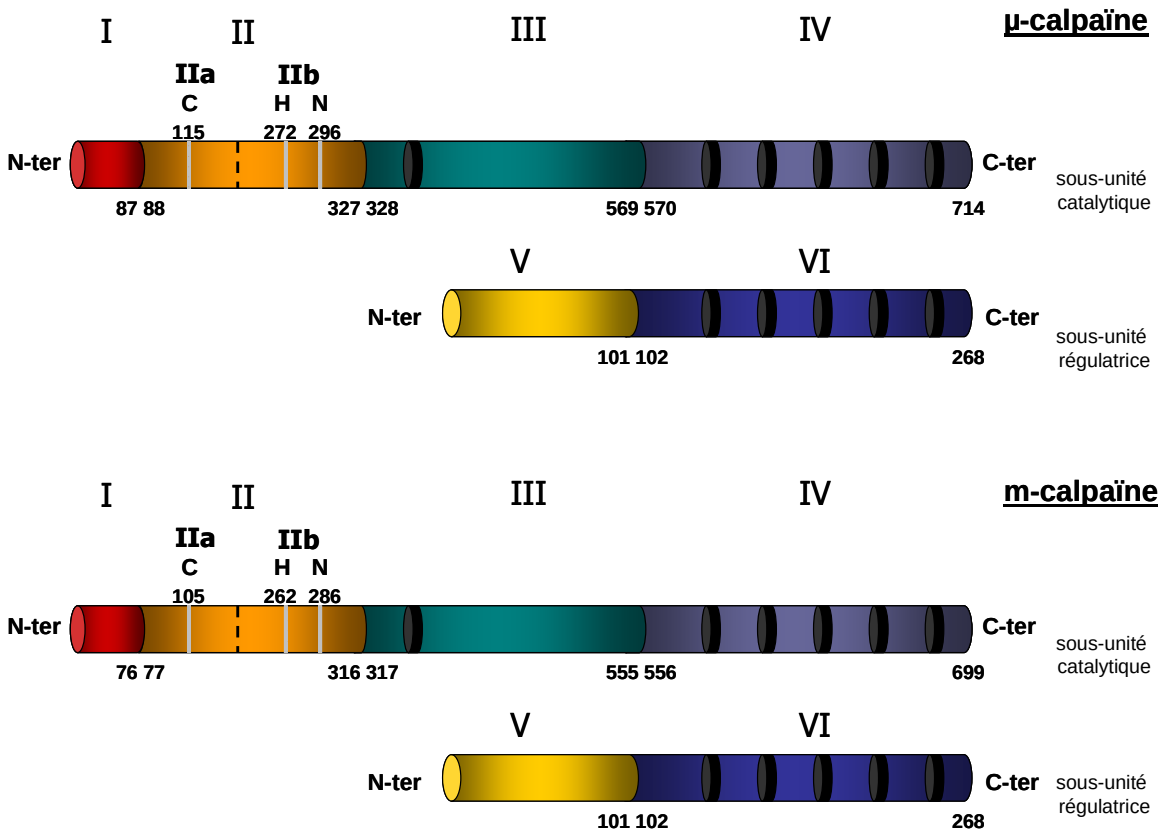

Figure 3 : Structure de la µ- et de la m-calpaïne d'après Goll et al. *(2003).* Les domaines EF-hands sont représentés en noir.

2.1.1.1.2 La calpaïne 5

La calpaïne 5 est un paralogue[1] de la calpaïne 10. Elle est codée par le gène *capn5*, localisé sur le chromosome 11 (11q14). C'est une calpaïne atypique, dépourvue de domaine IV. Cette absence du domaine IV ne permet pas une régulation par la sous-unité 30 kDa. La calpaïne 5 possède par contre un domaine appelé, domaine T, de par son homologie avec le gène *tra-3* chez *C. elegans*. Ce domaine serait impliqué dans la modulation de la protéase [Barnes *et al.*, 1996].

[1] Sont dits paralogues des gènes ayant pour origine la duplication d'un gène ancestral.

La calpaïne 5 est ubiquitaire mais est plus fortement exprimée dans le colon, les testicules et le cerveau [Waghray *et al.*, 2004]. Elle pourrait interagir avec les PPARδ (*peroxisome proliferator-activated receptor*) et ainsi, réduire les risques d'obésité [Saez *et al.*, 2008].

2.1.1.1.3. La calpaïne 7

La calpaïne 7 est ubiquitaire et atypique ; elle est dépourvue de domaine IV. Elle se caractérise par la présence d'un domaine N en position C-terminale, absent des autres calpaïnes. Elle est codée par le gène *capn7*, localisé sur le chromosome 3 (3p24-25) [Franz *et al.*, 1999]. L'homologie de séquence avec les autres membres de la famille des calpaïnes est très faible (30%). La calpaïne 7 est surexprimée dans la maladie de Huntington [Gafni *et al.*, 2004]. De plus, la calpaïne 7 interviendrait dans la voie endosomale [Yorikawa *et al.*, 2008].

2.1.1.1.4. La calpaïne 10

La calpaïne 10 est ubiquitaire, atypique et codée par le gène *capn10*, localisé sur le chromosome 2 (2q37) et constitué de 15 exons. Elle ne possède pas de domaine IV. Celui-ci est remplacé par un domaine T qui ne contient pas de EF-Hands. Le domaine T présente une forte homologie avec celui de TRA-3, une calpaïne atypique de *Caenorhabditis elegans* [Cf. Ch.1 *2.1.2.3*]. Malgrè l'absence de domaine IV, l'activité de TRA-3 est dépendante du calcium [Sokol et Kuwabara, 2000]. L'épissage alternatif de capn10 génère au moins huit isoformes de la calpaïne 10 (calpaïne 10a à 10h). Certaines isoformes seraient dépourvues du domaine catalytique. Des variations génétiques de *capn10* sont observées dans le diabète de type 2 (diabète non insulino-dépendant) dans certaines populations [Horikawa *et al.*, 2000] [Cf. Ch.1 *2.3.3.4*]. Une expression altérée, notamment au niveau de l'intron 3, dans les muscles, le pancréas ou encore dans les cellules adipeuses serait impliquée dans la perturbation du métabolisme du glucose, observée dans le cas de cette pathologie [Horikawa *et al.*, 2000 ; Ma *et al.*, 2001].

2.1.1.1.5. La calpaïne 12

La calpaïne 12 a été identifiée chez la souris par Dear et ses collaborateurs [Dear *et al.*, 2000]. Cette calpaïne conventionnelle est ubiquitairement exprimée. Elle est codée par le gène *capn12*, localisé sur le chromosome 19 (19q13). L'épissage alternatif de *capn12* génère 3 isoformes différentes de la calpaïne 12.

2.1.1.1.6 La calpaïne 14

La calpaïne 14 a été identifiée en 2001 par Dear et ses collaborateurs [Dear *et al.*, 2001]. Elle est codée par le gène *capn14*, localisé sur le chromosome 2 (2p23-21). Bien qu'étant ubiquitaire et conventionnelle, la calpaïne 14 est faiblement exprimée. Sa fonction biologique n'a pas été identifiée.

2.1.1.1.7 La calpaïne 15

La calpaïne 15, encore appelée Solh (*Small optic lobes H*), a été décrite en 1998 par Kamei et ses collaborateurs [Kamei *et al.*, 1998]. Cette calpaïne ubiquitaire et atypique est codée par le gène SOLH, localisé sur le chromosome 16 (16p13) qui est un homologue du gène *sol*, découvert chez *Drosophila melanogaster* [Delaney *et al.*, 1991].

2.1.1.2. Les calpaïnes tissu-spécifiques

2.1.1.2.1. La calpaïne 3

La calpaïne 3 existe sous deux isoformes : la calpaïne 3a et la calpaïne 3b

- La calpaïne 3a

La calpaïne 3a, encore appelée p94 (en raison de son poids moléculaire) ou nCL-1, pour nouvelle Large Calpaïne 1, a été découverte en 1989 par Sorimachi et ses collaborateurs [Sorimachi *et al.*, 1989]. Ils identifient un ADNc du muscle squelettique de l'homme et de rat, codant pour une protéine principalement exprimée dans le muscle squelettique et ayant une homologie importante (respectivement 54% et 51% [Sorimachi *et al.*, 1989]) avec la grande sous-unité de la μ- et m-calpaïne. Dans le muscle squelettique, le taux d'expression de son messager est dix fois plus important que celui des calpaïnes ubiquitaires. Bien que qualifiée de muscle-spécifique, une faible quantité d'ARNm de cette calpaïne est

également retrouvée au niveau de la langue, des yeux et du cerveau [Konig *et al.*, 2003]. Si ses ARNm sont fortement représentés dans le tissu musculaire squelettique, la calpaïne 3a dont la demi-vie est d'une dizaine de minutes [Sorimachi *et al.*, 1993a], n'a jamais été isolée sous sa forme native. Seuls les résidus de son autolyse rapide, des fragments de 60, 58, 55 et 31kDa ont pu être purifiés [Kinbara *et al.*, 1998].

La calpaïne 3a est monomérique, elle n'interagit pas avec les sous-unités régulatrices Css1 et Css2 des calpaïnes ubiquitaires. Elle est constituée de 821 acides aminés. Elle comporte quatre domaines (I à IV) et présente des séquences d'insertion (IS1, IS2, NS) qui ne sont pas retrouvées dans les séquences des calpaïnes ubiquitaires (Figure 4). IS1 (*Insertion Sequence 1* : 62 aa) se situe dans le domaine II, qui agirait comme un inhibiteur en bloquant l'accès au site actif [Diaz *et al.*, 2004] ; IS2 (Insertion Sequence 2 : 77 aa) est retrouvée entre le domaine III et le domaine IV, liant le calcium et NS (N-terminal Sequence : 20-30 aa), au niveau de la partie N-terminale de la protéine, riche en proline, qui inhiberait l'autoprotéolyse du domaine I [Sorimachi *et al.*, 1989 ; Anderson *et al.*, 1998]. IS2 contient une séquence PVKKKKNKP qui lui permettrait occasionnellement une localisation nucléaire et un site de liaison à la titine, protéine élastique s'étendant sur la moitié d'un sarcomère [Sorimachi *et al.*, 1995]. IS1 et IS2 seraient impliquées dans l'instabilité de la calpaïne 3a puisque la perte de ces séquences entraîne la formation d'une protéine stable [Herasse *et al.*, 1999]. La surexpression de la calpaïne 3a dans des souris transgéniques n'a pas d'effet morphologique sur le muscle. Cependant, la surexpression de l'isoforme de la calpaïne 3a ne contenant pas IS1 entraîne la formation de muscle immature. De même, la surexpression d'une calpaïne 3 dépourvue de IS2 affecte la morphologie du soleus [Spencer *et al.*, 2002]. Ces résultats suggèrent un rôle de la calpaïne 3 dans la maturation musculaire.

La présence dans la structure de la calpaïne 3a de 6 EF-hands suggère une régulation de cette dernière par le calcium [Ono *et al.*, 1998b]. La concentration calcique nécessaire à son activation serait de l'ordre du nanomolaire, justifiant son appellation parfois usitée de n-calpaïne [Mozdziak *et al.*, 2002].

La LGMD2A (*Limb Girdle Muscular Dystrophy type 2A*) ou calpaïnopathie est une dystrophie musculaire rare autosomale (chromosome 15 : 15q15.1-q21.1) récessive due à une mutation du gène de la calpaïne 3a [Cf. Ch.1 *2.3.3.5*].

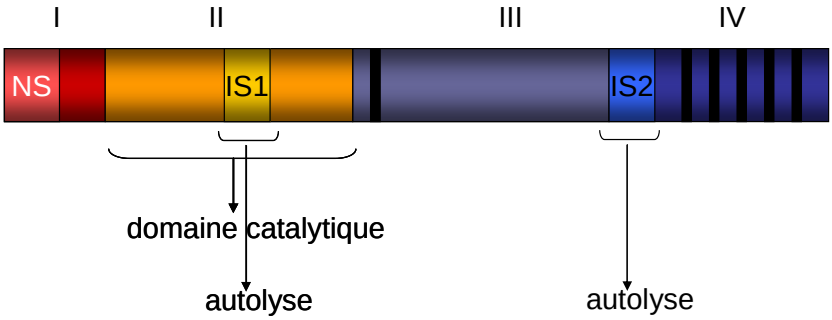

Figure 4 : Structure de la calpaïne 3a.

- La calpaïne 3b :

La calpaïne 3b est issue d'un épissage alternatif de son gène *capn3*. L'épissage consiste en une délétion des exons 6, 15 et 16 et en l'utilisation d'un exon 1 différent de celui utilisé pour la calpaïne 3a. Il conduit à un domaine N-terminal différent et à la suppression des séquences uniques de la calpaïne 3a, soit NS, IS1 et IS2, ce qui la rendrait plus stable. Cette isoforme de la calpaïne 3 est retrouvée uniquement au niveau des yeux chez différents animaux. Elle n'est pas retrouvée chez l'homme [Ma *et al.*, 1998a ; Nakamura *et al.*, 2000]. La calpaïne 3b a pu être isolée ; elle a été partiellement purifiée à l'aide d'une colonne échangeuse d'anions donnant une protéine de 82kDa sur SDS-PAGE. Cette protéine présente en présence de calcium une activité protéolytique envers la caséine [Ma *et al.*, 1998b]. Elle est peu inhibée par la calpastatine.

Chez le rat, la calpaïne 3b serait impliquée dans la cataracte, opacification partielle ou totale du cristallin [David *et al.,* 1993]. Chez les mammifères, une exposition aux rayons ultra-violets, ou un niveau de sucre élevé (diabète), l'hérédité, certaines maladies métaboliques, sont autant de facteurs favorisants l'apparition de cette maladie. Dans l'œil normal, les protéines du cristallin (α, β, γ) sont concentrées et organisées pour permettre le passage de la lumière. Au niveau du cristallin du jeune rat, le taux d'ARNm codant pour la calpaïne 3b est trois fois plus important

que le taux d'ARNm de la calpaïne 3a dans le muscle [Herasse *et al.*, 1999]. La calpaïne 3b serait impliquée dans la cataracte *via* le clivage de la protéine γ [Tang *et al.*, 2007]. En effet, une des causes de l'opacification du cristallin est l'agrégation de cette protéine après clivage par la calpaïne 3b.

2.1.1.2.2. La calpaïne 6

La structure du domaine C-terminal, suppléant le domaine IV, est définie comme le domaine T de par son homologie avec *Caenorhabditis elegans* TRA-3, un facteur de détermination sexuelle des nématodes [Dear *et al.*, 1997]. Bien qu'appartenant à la famille des calpaïnes, la calpaïne 6 présente une caractéristique particulière : son domaine catalytique est dépourvu du résidu cystéine, remplacé par une lysine. Cette particularité ne lui confèrerait donc pas d'activité enzymatique [Dear *et al.*, 1997]. La calpaïne 6 jouerait un rôle important dans l'embryogenèse. Son gène, *Capn6* est localisé sur le chromosome X (Xq23) et s'exprime durant l'embryogenèse [Dear *et al.*, 1997 ; Dear et Boehm, 1999a ; Matena *et al.*, 1998], au niveau de l'arc mandibulaire, des somites, du muscle squelettique, du cœur, des poumons et des reins mais aussi au niveau du placenta [Dear et Boehm, 1999a]. Après la naissance, *capn6* est régulé négativement. Il a été montré que lors de l'embryogenèse, la calpaïne 6 serait impliquée dans la régulation des microtubules et l'organisation du cytosquelette d'actine [Tonami *et al.*, 2007]. Une surexpression de la calpaïne 6 entraîne la formation de cellules polynuclées et l'utilisation d'ARN interférents dirigés contre la calpaïne 6 entraîne une instabilité des microtubules ainsi qu'une réorganisation du cytosquelette d'actine. De plus, la calpaïne 6 serait impliquée dans le développement et la progression du cancer de l'utérus [Lee *et al.*, 2008]. Dans le tissu sain, *capn6* n'est pas exprimé. Son expression augmente progressivement avec la progression tumorale.

2.1.1.2.3. La calpaïne 8

La calpaïne 8 ou nCL-2 a été découverte en 1993, au niveau de l'estomac par Sorimachi et ses collaborateurs [Sorimachi *et al.*, 1993b]. C'est une calpaïne typique, constituée de quatre domaines (Figure 5). Elle est codée par le gène *capn8*, localisé sur le chromosome 1 (1q41).

Dans l'estomac, nCL-2, tout comme nCL-4 (Cf. calpaïne 9), est exprimée dans les cellules gastriques à mucus ; elle serait impliquée dans la régulation du transport vésiculaire [Hata *et al.*, 2006]. Cette protéine présente des similitudes avec la m-calpaïne (61,5% d'identité d'acides aminés), son activité est dépendante du calcium, à des concentrations de l'ordre du milli-molaire. Des études de co-précipitation montrent que nCL-2 ne co-précipite ni avec css1, ni avec css2. De plus, nCL-2 possède une activité protéasique, même en absence de sous-unité 30 kDa. Des analyses de co-immuno-précipitation révèlent que nCL-2 existe sous forme monomérique et homo-oligomérique. Cette oligomérisation n'implique pas le domaine IV, mais le domaine III et régulerait l'activité de nCL-2 [Hata *et al.*, 2007]. En plus de son implication dans le trafic vésiculaire, cette calpaïne, détectée dès le stade 10, serait impliquée dans les mouvements de gastrulation et de neurulation chez *Xenopus laevis* [Cao *et al.*, 2001]. En effet, par épissage alternatif, le gène codant pour cette protéine code aussi pour une seconde forme : 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 [Sorimachi *et al.*, 1993b]. Cette calpaïne serait régulée positivement au niveau transcriptionnel par les œstrogènes, dans l'hypophyse.

Figure 5 : Structure tridimensionnelle de la calpaïne 8.
Schéma extrait du site : *www.sgc.ox.ac.uk/iSee/downloads.html*

2.1.1.2.4. La calpaïne 9

Découverte en 1998 par Lee et ses collaborateurs, la calpaïne 9 ou nCL-4, présente une homologie de 50-55% avec les calpaïnes ubiquitaires. C'est une calpaïne typique, constituée de quatre domaines (Figure 6). Elle est codée par le gène *capn9* localisé sur le chromosome 1 (1q42.11-q42-3). La calpaïne 9 est exprimée spécifiquement au niveau de l'estomac et de l'intestin grêle [Lee *et al.*, 1998]. Elle possède, tout comme les calpaïnes ubiquitaires, une activité cystéine protéasique dépendante du calcium. Sa sensibilité au calcium est intermédiaire entre celle de la µ- et celle de la m-calpaïne. Sa température optimale est basse, de l'ordre de 15°C et son pH optimal est neutre. Elle est inhibée par la calpastatine et nécessite d'être dimérisée avec la sous-unité régulatrice 30 kDa pour être active [Lee *et al.*, 1999]. L'expression de la calpaïne 9 est diminuée dans le cancer gastrique, chez l'homme ainsi que dans certaines lignées de cellules gastriques tumorales. Elle aurait donc un rôle suppresseur de tumeur [Liu *et al.*, 2000]. Enfin, la diminution de son expression serait aussi impliquée dans l'hypertension artérielle [Markmann *et al.*, 2005].

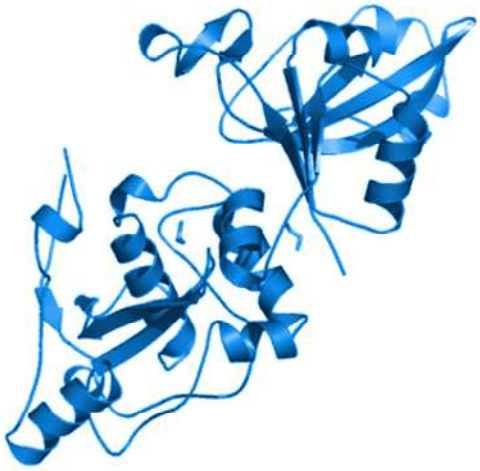

Figure 6 : Structure tridimensionnelle de la calpaïne 9.
Schéma extrait du site : *www.sgc.ox.ac.uk/iSee/downloads.html*

2.1.1.2.5. La calpaïne 11

La calpaïne 11 est une calpaïne typique, constituée de quatre domaines. Elle est codée par le gène *capn11*, localisé sur le chromosome 6 (6p12) et est spécifique des testicules. Cependant, une faible expression au niveau du thymus et des glandes

mammaires a été détectée. La calpaïne 11 présente une grande homologie avec la µ/m calpaïne de poulet (57,5 % d'homologie, contre seulement 54,3 % avec la µ-calpaïne). Ainsi, la calpaïne 11 serait l'orthologue humain de la µ/m calpaïne de poulet [Dear *et al.*, 1999b]. Elle serait impliquée dans l'apoptose et la régulation des facteurs de transcription spécifiques des testicules. Elle jouerait un rôle dans la régulation des signaux de transduction lors du remodelage du cytosquelette ainsi que lors de la méiose ou de la spermatogenèse [Ben-Aharon *et al.*, 2006].

2.1.1.2.6. La calpaïne 13

La calpaïne 13 (65 kDa), identifiée en même temps que la calpaïne 14, est codée par le gène *capn13*, localisé sur le chromosome 2 (2p22-21) (Figure 7). Elle est exprimée spécifiquement dans les testicules et les poumons et ne possède pas de domaine IV [Dear *et al.*, 2001].

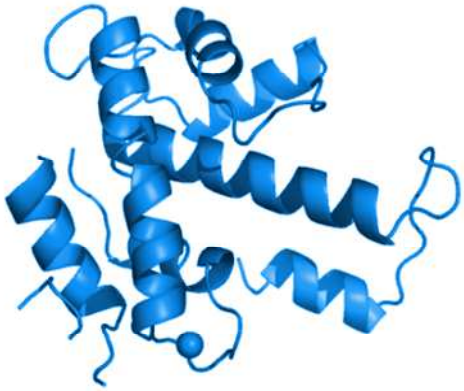

Figure 7 : Structure tridimensionnelle de la calpaïne 13.
Schéma extrait du site : *www.sgc.ox.ac.uk/iSee/downloads.html*

2.1.2. Les calpaïnes chez les invertébrés

Des protéases de type calpaïnes ont été découvertes chez les invertébrés, et ont pu être isolées à partir de tissus notamment chez *Schistosoma mansoni* (un ver plat parasite) [Siddiqui *et al.*, 1993], *Drosophilia* [Pinter et Friedrich 1988] et le homard [Mykles et Skinner, 1986]. Une protéase apparentée aux calpaïnes a aussi était découverte chez *C. elegans*.

2.1.2.1. Calpaïne chez Schistosoma mansoni

Une protéine possédant les quatre domaines et des structures EF-hand a été découverte chez *Schistosoma mansoni* [Andresen *et al.*, 1991]. Cette calpaïne présente 62% d'homologie avec la µ-calpaïne et le domaine IV ne possède que trois EF-hands. Son activité est dépendante du calcium. Elle est constituée de deux sous-unités (78kDa et 28kDa). Au niveau de la partie NH2-terminale, cette calpaïne présente une extension de 28 acides aminés, absente de la structure des calpaïnes de mammifères.

2.1.2.2. Calpaïnes chez Drosophilia

Chez la drosophile, quatre gènes ont été identifiés comme présentant des homologies avec la famille des calpaïnes (Figure 8) : un premier codant pour CalpA, constitué de 821 acides aminés et ayant une masse moléculaire de 94kDa [Theopold *et al.*, 1995], un second, codant pour CalpB de 791 acides aminés et ayant une masse moléculaire de 90kDa [Jekely et Friedrich 1999], un troisième qui code pour la protéine CalpC [Spadoni *et al.*, 2003] et un quatrième, codant pour la protéine SOL (*small orbit lobes*) de 1597 acides aminés [Delaney *et al.*, 1991]. CalpA et CalpB appartiennent au groupe des calpaïnes typiques. Le gène codant pour CalpA peut subir un épissage alternatif pour produire une protéine CalpA', délétée du domaine IV. CalpA présente un insert de 76 acides aminés au niveau du domaine IV alors que CalpB se singularise par la présence de 224 acides aminés supplémentaires, au niveau de la région N-terminale. CalpC est caractérisée par une absence de domaine

I ainsi que de 20 résidus de domaine II. Elle présente 30 et 35% d'identité dans les domaines II et III avec les domaines correspondant de la calpaïne B. Cette protéine serait dépourvue d'activité protéolytique en raison de la mutation de la triade catalytique (Cys → Arg, His → Val, Asn → Ser). La calpaïne SOL est quant à elle tissu-spécifique. Sa particularité réside dans le fait que la moitié de la molécule située du côté de l'extrémité N-terminale ne présente aucune homologie avec les calpaïnes mais possède six domaines similaires aux structures en « doigt de zinc » de récepteurs aux hormones tyroïdiennes. De plus, la calpaïne SOL ne possède pas de EF-hand. Des mutations de ce gène entraînent la formation d'un lobe optique rudimentaire caractérisé par l'absence de certaines classes de neurones [Delaney *et al.*, 1991].

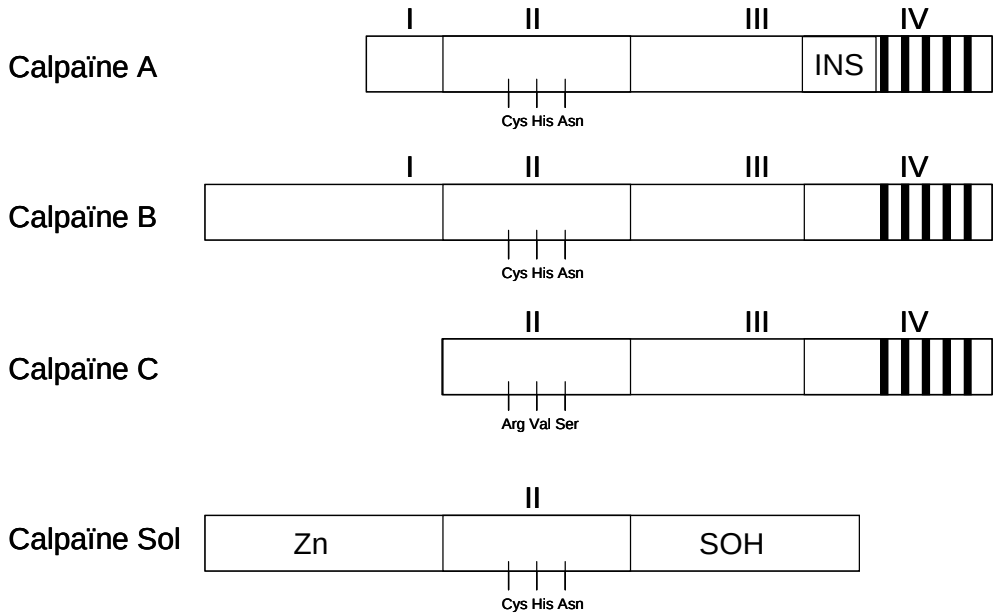

Figure 8 : Schéma de structure des calpaïnes chez la drosophile d'après Friedrich et al. *(2004).* Les barres verticales noires représentent les motifs EF-hands. INS représente l'insert de 76 acides aminés de la calpaïne A.

2.1.2.3. Calpaïnes chez C. elegans

Le séquençage du génome de *Caenorhabditis elegans* (nématode de la famille des *Rhabditidae*) a permis d'identifier 12 gènes, regroupés en 4 classes [Sorimachi et Suzuki, 2001], codant pour des calpaïnes. Aucune de ces calpaïnes n'a pu être isolée sous forme protéique. Parmi ces gènes, *tra-3* code pour une protéine de 73kDa

présentant une grande homologie avec les domaines II et III de la μ- et la m-calpaïne. La partie C-terminale de cette protéine, le domaine T, est singulière. Ce domaine ne présente aucune homologie avec le domaine IV de la μ- ou de la m-calpaïne et ne comporte aucune EF-hand. Des analyses génétiques indiquent que *tra-3* est impliqué dans la détermination du sexe chez *C. elegans*. TRA-3 stimule le phénotype féminin. Elle clive de manière calcium-dépendante, la protéine membranaire TRA-2A qui lie FEM-3 et inhibe par ce biais sa capacité à stimuler le phénotype masculin [Sokol et Kuwabara, 2000].

2.2. Activation et régulation des calpaïnes ubiquitaires

2.2.1. Le calcium : activation des calpaïnes

Synthétisées sous forme de pro-enzymes afin d'éviter une protéolyse anarchique (non régulée) pouvant être délétère pour la cellule, les calpaïnes nécessitent une activation mettant en jeu le calcium. Le calcium agit au niveau des domaines VI et IV. En se liant aux EF-hands de ces deux domaines, il favorise leur interaction et leur association, permettant la formation d'hétérodimères.

La concentration calcique requise pour une demi-activité maximale des calpaïnes (K_a), mesurée *in vitro*, est de l'ordre de 5-50 μM pour la μ-calpaïne et de l'ordre de 200-1000 μM pour la m-calpaïne. En dépit de ces données, les calpaïnes sont activées à des concentrations calciques physiologiques de l'ordre de 100-300 nM. Cette activité en conditions physiologiques implique des mécanismes visant à faire diminuer la concentration en calcium nécessaire à l'activité protéique.

Au niveau du domaine II de la sous-unité catalytique, le calcium induit un changement conformationnel conduisant au rapprochement des sous-domaines IIa et IIb permettant ainsi l'activation du site catalytique (Cys, His, Asn). Suite à la fixation du calcium, les calpaïnes migrent au niveau de la membrane plasmique et subissent un changement conformationnel leur permettant d'interagir avec les phospholipides membranaires (tels que la phosphatidylsérine et le phophatidylinositol) par leurs régions hydrophobes. Cette interaction entraîne une diminution de la concentration calcique (plus de 25 fois, Coolican et Hathaway,

1984) nécessaire à l'activité protéolytique des calpaïnes et provoque une modification structurale de la sous-unité catalytique à l'origine de la dissociation de la sous-unité catalytique et de la sous-unité régulatrice.

L'activation des calpaïnes s'effectue donc en présence de calcium, par dissociation du dimère et libération de la sous-unité catalytique active. L'autolyse de la région N-terminale de cette sous-unité pourrait intervenir dans la dissociation mais elle n'est pas nécessaire [Suzuki et Sorimachi, 1998] (Figure 9). Cette autolyse contribue à diminuer la concentration calcique nécessaire à l'activation des calpaïnes [Suzuki *et al.*, 1995 et Baki *et al.*, 1996]. La sous-unité catalytique active peut ensuite hydrolyser des substrats au niveau de la membrane ou après libération dans le cytosol.

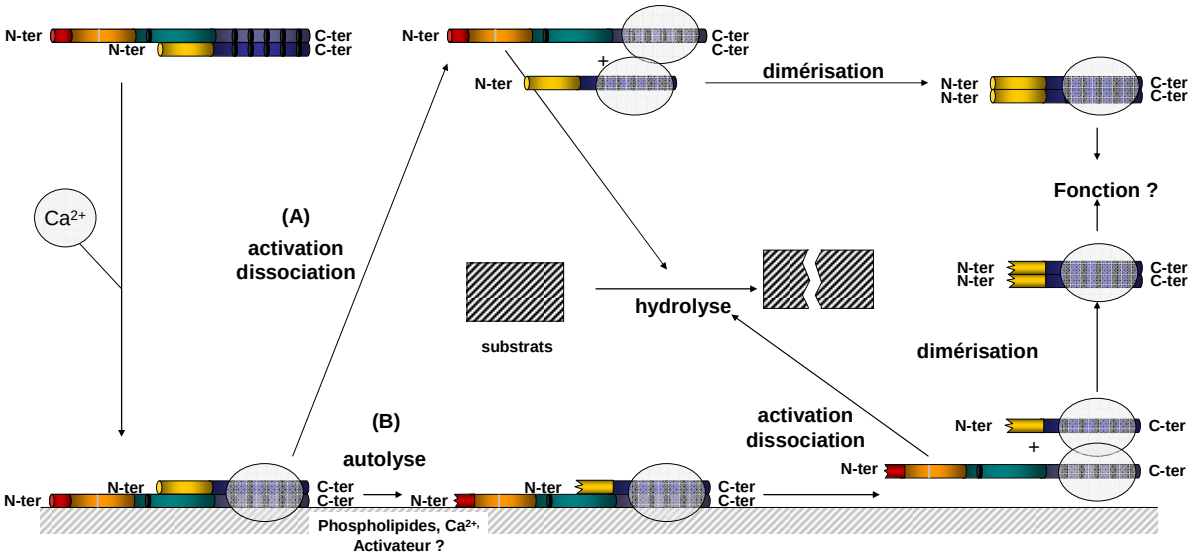

Figure 9 : **Modèle d'activation des calpaïne d'après Suzuki et Sorimachi** *(1998).* Après avoir fixé le calcium, les calpaïnes migrent vers la membrane plasmique et se dissocient directement (A) ou subissent d'abord une autolyse (B).

2.2.2. Régulation par les phosphorylations

La µ- et la m-calpaïne peuvent être phosphorylées en plusieurs sites [Cong *et al.*, 2000]. La µ-calpaïne possède neuf sites de phosphorylation et la m-calpaïne en possède huit (Figure 10) : deux phosphotyrosines, trois phosphothréonines et quatre phosphosérines pour la µ-calpaïne et une phosphosérine de moins pour la m-calpaïne. Les résidus phosphorylés sont concentrés dans deux régions : au niveau de la jonction du domaine I et du domaine II (quatre résidus phosphorylés pour la µ-calpaïne et la m-calpaïne) et au niveau de la partie N-terminale du domaine II (quatre résidus pour la µ-calpaïne et seulement trois pour la m-calpaïne). Les séquences encadrant les résidus phosphorylés suggèrent la présence de deux sites de phosphorylation par la protéine kinase A, deux (µ-calpaïne) ou un (m-calpaïne) sites de phosphorylation par la protéine kinase C, deux sites par la calmoduline kinase II, un site par la caséine kinase I et un site par la protéine kinase G. En moyenne, les calpaïnes possèdent deux à quatre phosphates par molécule. Ces phosphorylations peuvent réguler de manière positive ou négative l'activité des calpaïnes. En effet, au niveau du domaine I de la m-calpaïne, la phosphorylation de la sérine par la voie ERK/MAPK (*extracellular signal-regulated kinase/mitogen activated protein kinase*) activée par l'EGF (*epidermal growth factor*), induit une forte augmentation de l'activité protéolytique [Glading *et al.*, 2000 et 2004]. Au contraire, la phosphorylation de la sérine 369 et de la thréonine 370 par la protéine kinase A (PKA) réduit significativement l'activité de la m-calpaïne. Cette phosphorylation rigidifie la structure de la calpaïne ; le site actif étant maintenu ouvert, l'activité protéasique est impossible [Shiraha *et al.*, 2002].

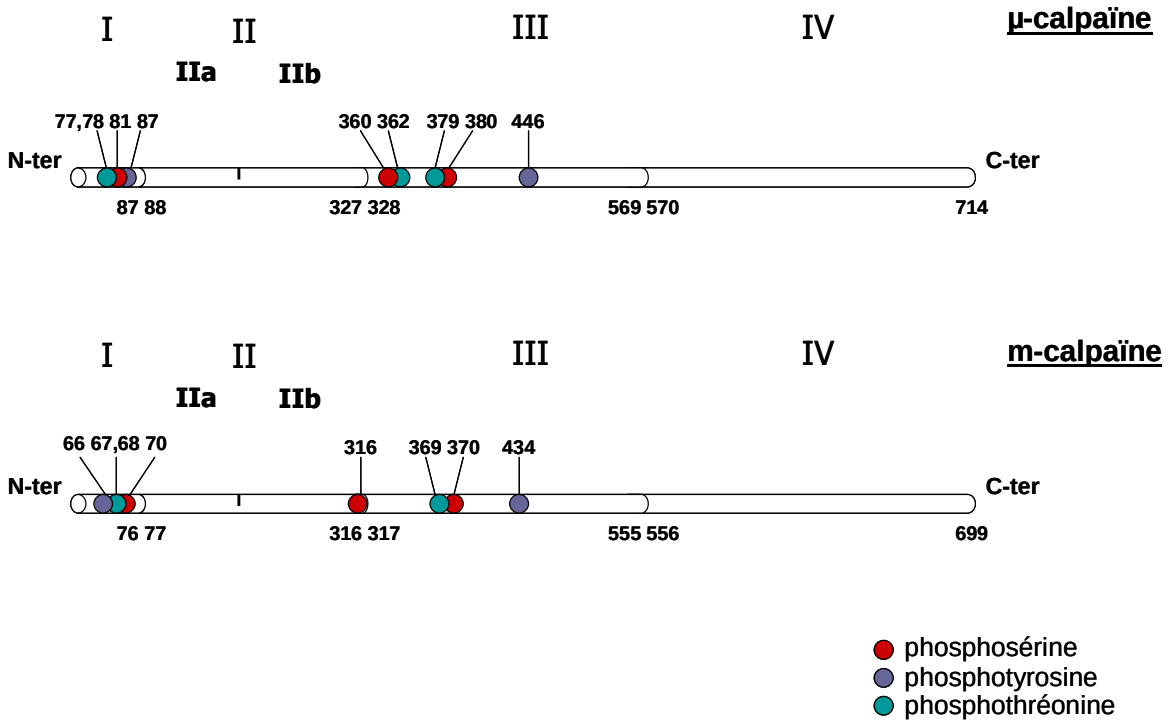

Figure 10 : Schématisation de la localisation des sites de phosphorylation de la µ- et de la m-calpaïne d'après Goll et al. *(2003).*

2.2.3. La calpastatine : inhibiteur endogène des calpaïnes ubiquitaires

La calpastatine a été découverte lors d'expériences de purification de la m-calpaïne à partir d'extraits de muscle squelettique de porc [Dayton *et al.,* 1976]. Sa distribution est ubiquitaire. Elle est codée par un gène unique, *cast*, composé de 34 exons et localisé, chez l'homme, sur le chromosome 5 (5q15). La présence de quatre promoteurs [Raynaud *et al.*, 2005] ainsi que les épissages alternatifs [Lee *et al.*, 1992 ; Takano *et al.*, 1999 et Parr *et al.*, 2001] entraînent la synthèse de nombreuses isoformes (au moins 11). La forme la plus exprimée a une masse moléculaire de 135 kDa, en conditions dénaturantes. Néanmoins, sa masse moléculaire varie entre 34 et 280 kDa [Maki et *al.*, 1990], du fait de sa structure non globulaire qui induit une migration particulière en SDS-PAGE. Contrairement aux calpaïnes, aucune séquence de calpastatine n'a été identifiée chez les invertébrés.

La calpastatine possède, du côté de la région N-terminale, un domaine XL [Cong *et al.,* 1998] et un domaine L (Leader), constitué de 80-150 acides aminés selon l'épissage alternatif et possédant de nombreux résidus basiques permettant à la

calpastatine de se lier à la membrane. La fonction de ces domaines n'est pas connue. Ils sont suivis de quatre domaines répétés, les domaines I, II, III et IV. Ces domaines se composent de 140 acides aminés et présentent 23 à 36% d'homologie entre eux. Ces quatre domaines possèdent une activité inhibitrice et peuvent fonctionner de manière autonome [Emori *et al.*, 1988 et Maki *et al.*, 1988]. Chacun des domaines peut inhiber une molécule de µ-calpaïne ou m-calpaïne indifféremment et est composé de trois sous-domaines conservés, A, B et C. Le sous-domaine A est impliqué dans la fixation au domaine IV et le sous-domaine C dans la fixation au domaine VI des calpaïnes [Ma *et al.*, 1994 et Yang *et al.*, 1994]. Le sous-domaine B est responsable de l'activité inhibitrice [Kawasaki *et al.*, 1989 et Maki *et al.*, 1989] (Figure 11).

L'inhibition des calpaïnes par la calpastatine est calcium-dépendante [Cottin *et al.*, 2000 et Kapprell et Goll, 1989]. En présence de calcium, le sous-domaine A et le sous-domaine C se fixent respectivement, aux domaines IV et VI de la molécule de calpaïne permettant ainsi au sous-domaine B de rentrer en interaction avec le domaine II de la calpaïne et d'exercer son action inhibitrice.

Cette inhibition des calpaïnes par la calpastatine est réversible [Imajoh et Suzuki, 1985 et Otsuka et Goll, 1987]. *In vitro*, la concentration calcique requise pour la fixation de la calpastatine aux calpaïnes ubiquitaires (10-300 nM pour se fixer à la µ-calpaïne et 10-40 µM pour se fixer à la m-calpaïne) est inférieure à celle requise pour leur activité protéolytique [Kapprell et Goll, 1989]. Ainsi, en cas d'augmentation de la concentration calcique, la calpastatine se fixe aux calpaïnes, avant l'initiation de l'activité protéolytique [Otsuka et Goll, 1987].

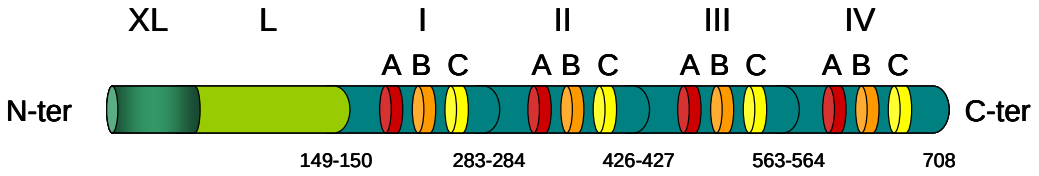

Figure 11 : Structure schématique de la calpastatine humaine d'après Wendt et al. *(2004).* Les différents domaines de la calpastatine sont notés XL, L,I, II, III, IV. Les lettres A, B et C représentent les sous-domaines.

2.3. Rôles des calpaïnes

2.3.1. Substrats des calpaïnes

Les calpaïnes sont des endoprotéases dont l'activité protéolytique est limitée. Plus d'une centaine de protéines ont été identifiées *in vitro* comme substrats potentiels de calpaïnes [Craoll et DeMartino, 1991 ; Goll *et al.*, 2003]. La plupart de ces substrats peuvent être rangés en quatre catégories : celle des kinases (FAK (*focal adhesion kinase*) ; Src ; protéine kinase C, protéine kinase calcium/calmoduline-dépendante…), des phosphatases (phospholipase C, protéine tyrosine phosphatase 1B, inositol polyphosphate 4-phosphatase…), la catégorie des facteurs de transcription (myogénine, p53, c-Fos, c-Jun…) et celle des protéines du cytosquelette (cadhérines ; desmine ; myosine ; taline ; tropomyosine…). *In vitro*, de nombreuses protéines ayant un rôle dans les interactions entre le cytosquelette et la membrane plasmique, comme la taline, la vinculine, la spectrine, la filamine ou l'erzine seraient clivées rapidement par les calpaïnes [Shcherbina *et al.*, 1999]. De même, de multiples protéines des filaments intermédiaires, comme la desmine et la vimentine seraient des cibles des calpaïnes. Parmi les nombreuses protéines cibles des calpaïnes, un grand nombre possède dans leur séquence d'acides aminés le motif PEST (proline, glutamine, sérine et thréonine). Cette combinaison d'acides aminés faciliterait la séquestration des ions calcium et favoriserait par ce biais l'activité des calpaïnes [Harris *et al.*, 1989]. Cependant, toutes les protéines clivées par les calpaïnes ne possèdent pas cette séquence particulière et une mutation dans cette suite d'acides aminés ne prévient pas le clivage des substrats [Malinari *et al.*, 1995]. La séquence PEST n'est donc ni nécessaire ni suffisante à la reconnaissance des substrats par les calpaïnes [Carillo *et al.*, 1996]. Pour certains substrats, les calpaïnes clivent préférentiellement au niveau de séquences précédant un résidu arginine ou lysine et un résidu valine ou leucine en position 1 et 2, respectivement [Sasaki *et al.*, 1984].

La phosphorylation des protéines cibles semble intervenir dans l'activité des calpaïnes. La phosphorylation par la protéine kinase A de la troponine I réduit la

sensibilité de la µ-calpaïne de 5 fois pour ce substrat alors que la phosphorylation par la protéine kinase C augmenterait cette sensibilité de 2 fois [Di Lisa *et al.*, 1995]. Enfin, il a aussi été suggéré que le clivage par les calpaïnes serait dépendant de la conformation de la chaîne polypeptidique du substrat [Sakai *et al.*, 1987].

2.3.2. Implications physiologiques des calpaïnes

2.3.2.1. Implication des calpaïnes dans le cycle cellulaire

Plusieurs études ont suggéré, *via* l'utilisation d'inhibiteurs synthétiques des calpaïnes que ces dernières seraient impliquées dans le cycle cellulaire notamment au niveau de la transition de G1 (gap 1) à la phase S (synthèse).

La privation en sérum dans des cellules NIH3T3 (cellules fibroblastiques de souris) entraîne une perte rapide de la cycline D1 qui est impliquée dans la progression des cellules vers la phase G1. L'addition d'inhibiteurs synthétiques des calpaïnes ou la surexpression de la calpastatine empêche la perte de cette cycline [Choi *et al.*, 1997], empêchant donc la progression de la cellule en phase S. Cependant, d'autres études portant sur des cellules EcR-CHO (cellules dérivant des cellules d'ovaires de hamster) surexprimant la calpastatine ainsi que sur des fibroblastes issus de souris *capn4* $^{-/-}$, (délétés en sous-unité régulatrice) montrent que ces cellules prolifèrent [Xu et Mellgren, 2002]. Au vu de ces différentes données, l'activité des calpaïnes ne paraît pas indispensable au bon déroulement de la mitose. Les calpaïnes pourraient servir de système de redondance avec la voie protéolytique du protéasome, principal régulateur protéolytique du cycle cellulaire.

2.3.2.2. Implication des calpaïnes dans la régulation de l'expression des gènes

Parce qu'*in vitro*, certains substrats tels que c-Jun, c-Fos [Hirai *et al.*, 1991 ; Pariat *et al.*, 2000] et p53 [Gonen *et al.*, 1997] sont des facteurs de transcription, les calpaïnes pourraient être impliquées dans la régulation de l'expression des gènes. Tous ces facteurs sont dégradés majoritairement par le protéasome. Les calpaïnes sont localisées préférentiellement dans le cytosol, le clivage des facteurs de transcription par les calpaïnes aurait donc lieu dans le cytoplasme. Cependant, une localisation nucléaire de la µ-calpaïne ainsi que de la m-calpaïne ayant été mise en

évidence dans des situations particulières [Gil-Parrado *et al.*, 2003 ; Raymond *et al.*, 2004], dans cette configuration, les calpaïnes pourraient agir sur les facteurs de transcription au niveau du noyau de la cellule. Dans les cellules NIH3T3, la surexpression de la calpastatine entraîne une diminution du taux de dégradation de c-Jun ; au contraire, l'utilisation d'oligodésoyribonucléotides antisens dirigés contre la calpastatine entraîne une augmentation de la dégradation du facteur de transcription c-Jun [Hayashi *et al.*, 1992]. Plusieurs mutants du facteur de transcription Fos présentent une résistance au clivage par les calpaïnes [Steff *et al.*, 1997]. De plus, la présence d'un inhibiteur des calpaïnes entraîne dans des cellules exprimant le type-sauvage de p53, une stabilisation de cette protéine [Kubbutat et Vousden, 1997]. Ces divers résultats suggèrent que les facteurs de transcription c-Fos, c-Jun et p53 peuvent être dégradés par différentes voies protéolytiques dont celle des calpaïnes.

2.3.2.3. Implication des calpaïnes dans l'apoptose

Le terme d'apoptose a été utilisé la première fois en 1972, pour décrire le processus de programmation de mort cellulaire [Kerr *et al.*, 1972]. L'apoptose fait intervenir plusieurs systèmes protéasiques comme les cathepsines lysosomales, le protéasome, les calpaïnes et principalement les caspases (cystéines protéases calcium-indépendantes). L'implication des calpaïnes dans ce phénomène est limitée à certains types cellulaires et à des stimuli spécifiques [Kidd *et al.*, 2000]. La surexpression de la calpastatine, dans différentes lignées, inhibe le phénomène de mort cellulaire programmée [Chi *et al.*, 1999 (lignée UV(r)-1 de fibroblastes humains) ; Squier *et al.*, 1999 (lignée de neutrophiles humains) ; Lu *et al.*, 2002, (lignée CHO)]. La détection de produits de dégradation de l'α-spectrine spécifiques d'un clivage par les calpaïnes (150 et 145 kDa), dans les cellules apoptotiques, renforce l'idée que ces dernières soient impliquées dans la mort cellulaire programmée [Saido *et al.*, 1993]. En effet, les caspases dégradent l'α-spectrine en deux fragments spécifiques de 150 et 120 kDa, permettant de distinguer clairement la protéolyse par les calpaïnes de celles par les caspases [Martin *et al.*, 1995]. Le rôle des calpaïnes dans l'apoptose est complexe puisqu'elles clivent et inhibent les caspases elles-mêmes (caspases-7, -8 et -9 [Chua *et al.*, 2000]) ainsi que de nombreuses autres protéines régulant le déroulement de l'apoptose. De plus, le rôle

des calpaïnes dans la mort cellulaire programmée varie : la m-calpaïne clive la procaspase-12 générant une caspase active, d'autre part, elle peut cliver Bcl-x1, transformant ainsi cette molécule anti-apoptotique en une molécule pro-apoptotique [Nakagawa et Yuan, 2000]. Les calpaïnes agissent donc dans le processus apoptotique soit comme régulateur négatif, soit comme régulateur positif.

2.3.2.4. Implication des calpaïnes dans la fusion des myoblastes

Lors du développement du muscle squelettique, après prolifération, les myoblastes se différencient, ils s'alignent et fusionnent pour former des myotubes multinucléés qui accumulent des protéines musculaires telles que l'actine, la myosine et la titine pour former des fibres musculaires squelettiques. La fusion des myoblastes nécessite un réagencement des interactions entre le cytosquelette et la membrane. L'ajout de calpastatine, inhibiteur endogène spécifique des calpaïnes, juste avant la fusion des myoblastes, inhibe cette fusion momentanément jusqu'à ce que toute la calpastatine en excès ait été neutralisée [Temm-Grove *et al.*, 1999]. L'utilisation d'antisens oligodésoxyribonucléotides dirigés contre la m-calpaïne diminue de 50% le taux de fusion des myoblastes [Balcerzak *et al.*, 1995]. De même, l'utilisation de calpeptine [Kwak *et al.*, 1993], de leupeptine et d'inhibiteur II [Dourdin et al., 1997] ou de E-64d [Kumar *et al.*, 1992], inhibe aussi la fusion des myoblastes de poulet, souris et rat, respectivement. De plus, il a été montré dans des myoblastes de rat (lignée L8) qu'une diminution importante (plus de 10 fois) de la quantité de calpastatine précède le phénomène de fusion, la quantité de µ-calpaïne et de m-calpaïne restant inchangée [Barnoy *et al.*, 1996]. Dans les myoblastes de souris en différenciation, l'expression de la m-calpaïne est maximale lorsque la fusion est elle aussi à son maximum [Cottin et al., 1994].

2.3.3. Pathologies impliquant les calpaïnes

De par leurs nombreux rôles physiologiques, les calpaïnes sont aussi impliquées dans plusieurs pathologies. Parmi ces pathologies, trois sont provoquées par des mutations des gènes codant pour les calpaïnes : la LGMD2A, due à une mutation du gène codant pour la calpaïne 3a, le cancer de l'estomac, dû à une mutation du gène codant pour la calpaïne 9 [Liu *et al.*, 2000] et le diabète de type 2 dû à une mutation

du gène codant pour la calpaïne 10 [Horikawa *et al.*, 2000]. Les autres pathologies impliquant les calpaïnes sont associées à une dérégulation de l'activité des calpaïnes. Dans la plupart des cas, une dérégulation de l'homéostasie calcique entraîne une sur-activation des calpaïnes et donc une protéolyse anarchique (non régulée), qui peut s'avérer délétère voire létale pour la cellule.

2.3.3.1. Implication des calpaïnes dans la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénératvie conduisant progressivement à la perte des fonctions cognitives au premier rang desquelles figure la mémoire. Cette pathologie se caractérise par deux processus : (i) l'amyloïdogenèse, qui consiste en un dépôt de peptides β-amyloïdes, Aβ40 et Aβ42, entraînant, au niveau du cerveau, la formation de plaques amyloïdes extracellulaires et (ii) la dégénérescence neurofibrillaire, qui résulte de l'agrégation intraneuronale de filaments de protéines Tau hyperphosphorylées (protéine associée aux microtubules) (Figure 12). Les cellules de cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer présentent des concentrations calciques intracellulaires anormalement élevées [Leissring *et al.*, 2000]. Le niveau d'expression de la m-calpaïne ainsi que l'autolyse de la μ-calpaïne sont augmentés, entraînant une forte activité du système protéolytique calcium-dépendant [Grynspan *et al.*, 1997 ; Saito *et al.*, 1993]. Cette dérégulation pourrait affecter la sécrétion des peptides β-amyloïdes, notamment par la conversion de la PKC en une kinase constitutivement active [Goll *et al.*, 2003]. De plus, les calpaïnes clivent la protéine p35, activant la protéine kinase cycline-dépendante 5 (CDK5), en une protéine de 25 kDa (p25) qui, ainsi activée, prolonge l'activation de CDK5 [Kusakawa *et al.*, 2000]. Le fait que la protéine Tau soit un substrat de CDK5 et qu'une accumulation de p25 a été mise en évidence dans le cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer [Lee et al., 2000], suggèrent que la p25, clivée par les calpaïnes, est responsable de l'hyperphosphorylation de Tau, induisant la dégénérescence neurofibrillaire.

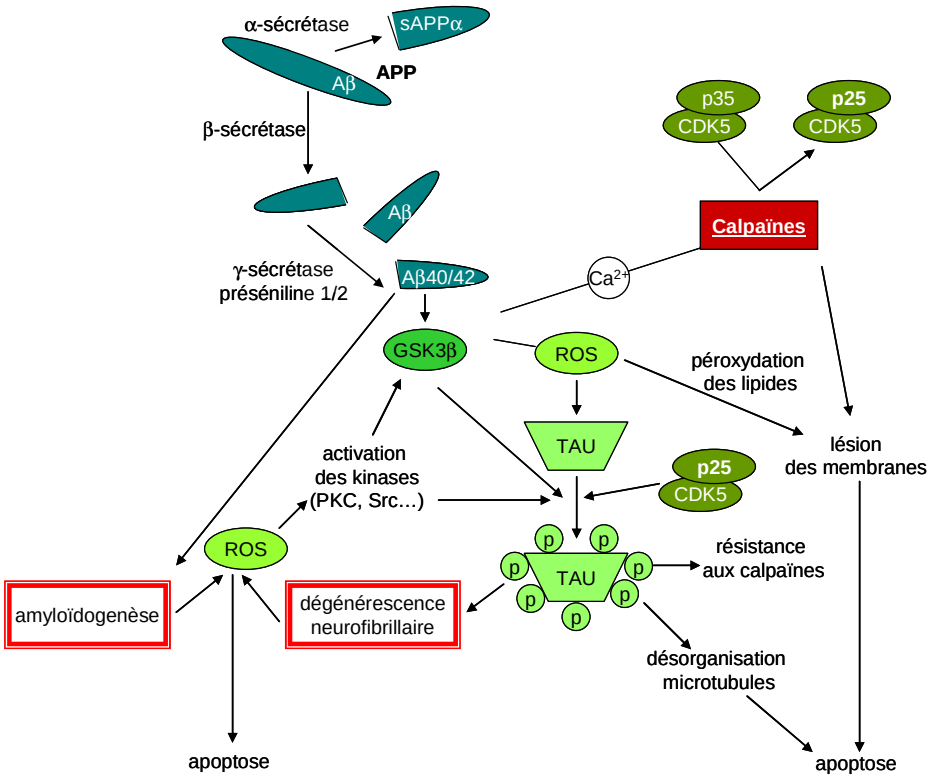

Figure 12 : Schématisation des mécanismes impliqués dans la maladie d'Alzheimer. La protéine APP (amyloid precursor protein) est clivée par les sécrétases α, β et γ pour former un fragment Aβ de 40 ou 42 résidus acides aminés. L'agrégation de ces fragments forme les plaques amyloïdes. De plus, ils induisent la génération de ROS (reactive oxygen species), comme des radicaux hydroxyles, qui sont responsables de la péroxydation des lipides et altèrent un grand nombre de fonctions cellulaires. L'activation des kinases PKC et de la CalmK (calcium-calmoduline kinase) favorise la phosphorylation de Tau par GSK3. Le clivage de p35 en p25, par les calpaïnes entraîne une hyperphosphorylation de Tau par p25/CDK5.
Schéma adapté du site : *https://www1.qiagen.com/Geneglobe/PathwayView.aspx?pathwayID=29*

2.3.3.2. Implication des calpaïnes dans la cataracte

La cataracte est une autre pathologie impliquant les calpaïnes. Elle est définie comme une affection de l'œil aboutissant à l'opacité partielle ou totale du cristallin (Figure 13). Au niveau de l'œil normal, les protéines du cristallin (α, β, γ) sont concentrées et organisées de manière à laisser passer la lumière. Une concentration en calcium élevée est observée dans la majorité des cas de cataractes humaines. Cette concentration est suffisante pour initier directement l'activité de la m-calpaïne (qui est l'isoforme la plus représentée dans le cristallin). Dans le cristallin de rat, la m-calpaïne dégrade les protéines α et β dans leur partie N-terminale mais n'interagit pas avec la protéine γ. Les protéines α et β ainsi tronquées précipitent et deviennent

résistantes à toute dégradation, conduisant à l'opacité du cristallin [Goll *et al.*, 2003 et Huang et Wang, 2001].

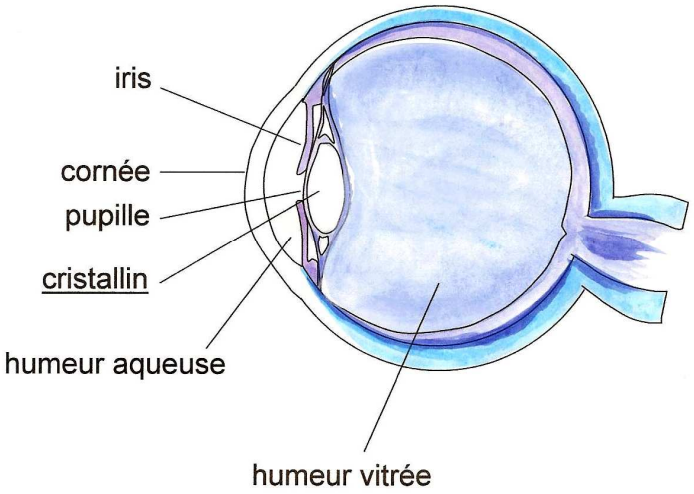

Figure 13 : Schéma de l'œil situant le cristallin

2.3.3.3. Implication des calpaïnes dans les ischémies cérébrales et cardiaques

Les calpaïnes sont aussi impliquées dans les ischémies cérébrales et cardiaques [Neumar *et al.*, 1996]. Ces pathologies sont associées à une augmentation du calcium intracellulaire engendrant une activation importante des calpaïnes. Cette activité dérégulée se traduit par une protéolyse anarchique induisant une nécrose des cellules.

2.3.3.4. Implication de la calpaïne 10 dans le diabète de type II

Le diabète de type II, diabète non insulino-dépendant, est le résultat de la combinaison de facteurs génétiques et environnementaux. Il est défini par une insulino-résistance se caractérisant par une faible réponse des tissus cibles à l'insuline. Il concerne environ 2% de la population française et est associé à une obésité dans 80% des cas. Ce trouble métabolique visant dans un premier temps les personnes d'un âge mûr, tend à s'étendre aux jeunes générations [Weiss *et al.*, 2004]. Chez l'Homme, le chromosome 2 présente un locus majeur de susceptibilité au diabète de type II [Hanis *et al.*, 1996]. Au sein de ce locus, le gène codant pour la calpaïne 10 a été identifié (par clonage positionnel) [Horikawa *et al.*, 2000]. Les

variants génétiques du gène *Capn10* sont associés à une augmentation en acides gras libres et une résistance à l'insuline [Orho-Melander *et al.*, 2002]. *In vitro*, les acides gras libres activent la PKC, entraînant ainsi une hyperphosphorylation des récepteurs à l'insuline ce qui a pour effet d'augmenter la résistance à l'insuline [Griffin *et al.*, 1999]. Ainsi, une sous-régulation de la PKC apparaît comme un facteur important dans le maintien du niveau de phosphorylation approprié des récepteurs à l'insuline. *In vivo*, la PKC étant un substrat des calpaïnes, une moindre quantité de calpaïne conduirait à la sur-régulation de la PKC, réduisant le signal de l'insuline et induisant une résistance à celle-ci. De plus, l'ajout d'un inhibiteur des calpaïnes, au niveau des îlots pancréatiques de souris, entraîne une augmentation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose ainsi qu'une diminution de l'assimilation de glucose dans les adipocytes et le muscle squelettique et une diminution du taux de synthèse de glycogène dans le muscle [Sreenan *et al.*, 2001]. Enfin, la calpaïne 10 a été impliquée dans la survie des cellules β du pancréas [Johnson *et al.*, 2004].

2.3.3.5. Implication de la calpaïne 3a dans la dystrophie musculaire des ceintures de type 2A

La LGMD2A se caractérise par une atteinte musculaire progressive symétrique des ceintures pelvienne et scapulaire et est due à des mutations du gène de la calpaïne 3 [Richard *et al.*, 1995]. Plus de 100 modifications du gène *Capn3* ont été identifiées. Elles sont dispersées le long du gène (Figure 14). Ces différentes mutations affectent les interactions entre les différents domaines de la calpaïne 3a, ce qui réduit son activité protéolytique. Les patients atteints de LGMD2A présentent, au niveau des fibres apoptotiques, une accumulation cytoplasmique de NFκB (facteur de transcription qui active des gènes de survie) et de IκBα (inhibiteur de NFκB) [Baghdiguian *et al.*, 2001]. IκBα est un substrat de la calpaïne 3a. La protéolyse IκBα permet la translocation nucléaire de NFκB qui peut ainsi activer la transcription de gènes de survie. Il semblerait que chez les patients atteints de LGMD2A, la calpaïne 3a, suite aux mutations de son gène, ne possède plus la capacité de cliver IκBα, inhibant ainsi la translocation de NFκB et donc l'activation des gènes de survie qui préviennent l'apoptose [Branca, 2004].

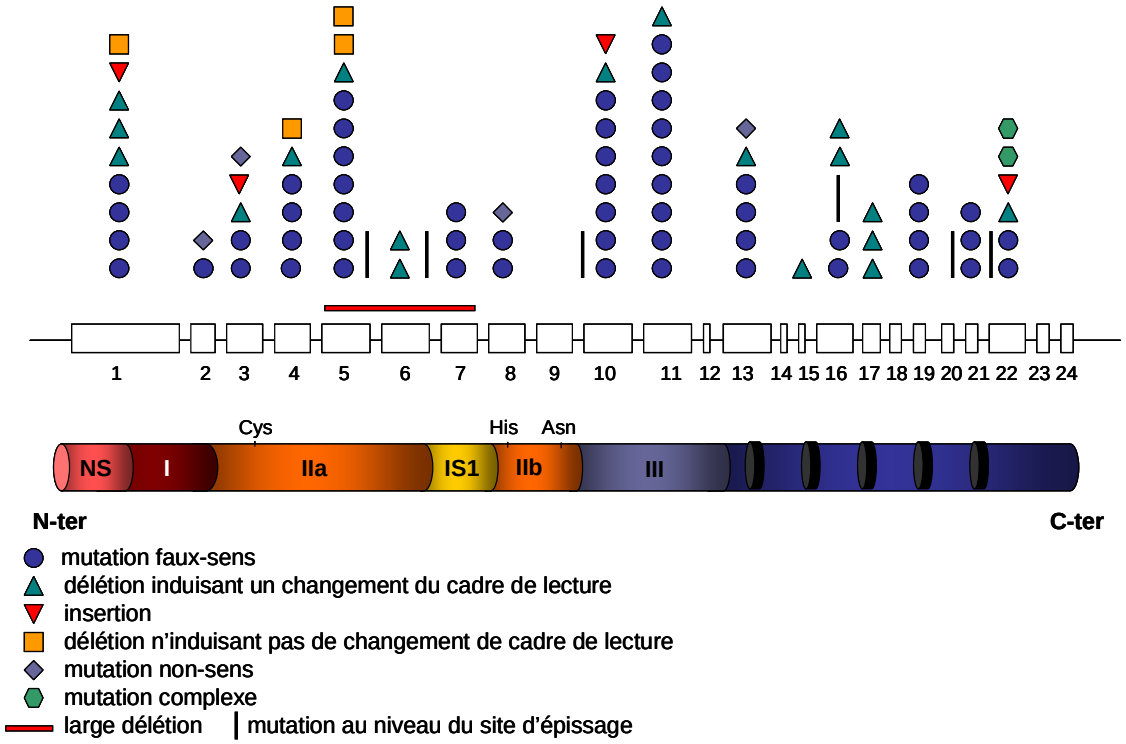

Figure 14 : Représentation schématique des mutations décrites dans le cadre de la LGMD2A sur le gène codant pour la calpaïne 3a, d'après Branca. (*2004*)

2.3.3.6. Implication des calpaïnes ubiquitaires dans le cancer et la dissémination métastatique

Les calpaïnes ont aussi un rôle important dans l'établissement de certains cancers. Chez l'Homme, le développement de tumeurs malignes du rein [Braun *et al.*, 1999b], de différents cancers de la peau [Reichrath *et al.*, 2003] et d'adénocarcinomes colorectaux [Lakshmikuttyamma *et al.*, 2004] sont caractérisés par une expression et/ou une activité élevée des calpaïnes. Les oncoprotéines (protéines fabriquées par l'organisme sur la commande d'un oncogène (gène jouant un rôle dans le contrôle de la croissance ou de la division cellulaire, qui a subit une mutation) et susceptibles d'engendrer une tumeur) v-Src, v-Jun, v-Myc, k-Ras et v-Fos, capables d'induire la transformation des cellules, activent de manière significative les calpaïnes. Leur activité est augmentée d'un facteur 2 dans les cellules transformées par v-Jun et d'un facteur 11 après transformation par v-Myc [Carragher *et al.*, 2004]. Dans le cancer de la prostate, l'inhibition de la m-calpaïne (par stratégie antisens) réduit significativement l'invasion tumorale [Mamoune *et al.*, 2003]. Dans le cancer du poumon, l'activation par la nicotine de la PKCι (protéine kinase C iota), entraîne la

phosphorylation des calpaïnes qui induit une augmentation de leur activité. Cette augmentation d'activité accélère la migration et l'invasion tumorale [Xu et Deng, 2006b]. À l'opposé, toujours dans le cancer du poumon, la déphosphorylation de la µ-calpaïne et de la m-calpaïne, par la phosphatase 2A, supprime la migration et l'invasion des cellules cancéreuses [Xu et Deng 2006a].

La dérégulation des calpaïnes dans les cellules tumorales fait de ces dernières un modèle d'étude intéressant pour compléter les connaissances sur le rôle de la protéolyse neutre calcium-dépendante dans l'adhésion, la migration et l'invasion cellulaires.

En résumé, la µ-calpaïne ainsi que la m-calpaïne sont les deux principales calpaïnes ubiquitaires appartenant à une famille de 14 protéases. Ce sont des endoprotéases dont l'activité protéolytique est limitée. Elles se présentent sous forme d'un hétérodimère constitué d'une sous-unité catalytique (80 kDa) et d'une petite sous-unité régulatrice (30 kDa). Elles forment avec leur inhibiteur endogène, la calpastatine, le système neutre protéolytique calcium-dépendant. Ce système intervient dans de nombreux processus physiologiques tels que l'expression de la régulation des gènes. Plus particulièrement, elles sont impliquées dans la migration cellulaire. Au niveau pathologique, outre un rôle potentiel des calpaïnes dans la maladie d'Alzheimer, la cataracte, le diabète de type 2 ou encore la LGMD2A, des taux élevés de µ-calpaïne et de m-calpaïne dans certains cancers font de ces molécules des cibles de choix pour l'étude des mécanismes de la dissémination métastatique.

CHAPITRE 2 : LE PROCESSUS DE MIGRATION CELLULAIRE

Il n'y a rien de vivant dans une cellule sauf l'ensemble. Lucien Cuénot.

Pour migrer, les cellules peuvent emprunter différents modes de déplacement. Elles peuvent se déplacer individuellement par un mode de migration amiboïde ou mésenchymale ou en groupe par un mode de migration collectif. Les mouvements amiboïdes, uniquement possibles en matrice 3D [Friedl et Wolf, 2003], sont caractérisés par une morphologie cellulaire arrondie. Ils sont indépendants des protéases extraxellulaires et nécessitent un niveau élevé de capacité contractile *via* les interactions acto-myosine contrôlée par RhoA-ROCK déformant la matrice et permettant le mouvement cellulaire [E. Sahai *et al.*, 1999 ; Sahai et Marshall, 2003 ; Wilkinson *et al.*, 2005 ; Wyckoff *et al.*, 2006]. La migration mésenchymale fait intervenir Rac et Cdc42. Les cellules adoptant ce mode de migration présentent une morphologie allongée et des lamellipodes. Elles adhèrent à la matrice extracellulaire. Rac et Cdc42 stimulent la polymérisation d'actine en régulant WASP/WAVE [Miki *et al.*, 1998 ; Rohatgi *et al.*, 1999 ; El-Sibai *et al.*, 2007]. Les interactions entre N-WASP et WAVE avec Arp2/3 (facteur de nucléation de l'actine) stimulent la formation de réseaux d'actine à l'avant de la cellule [Suetsugu *et al.*, 2001]. De plus, la migration mésenchymale se distingue de la migration amiboïde par sa dépendance aux intégrines, la présence de fibres de stress ainsi que par le remaniement et la dégradation de la matrice extracellulaire. Ces deux modes de migration sont interconvertibles au travers de transitions amoeboïde-mésenchymale ou mésenchymale-amoeboïde [Friedl *et al.*, 2003 ; Sahai *et al.*, 2003 ; Wilkinson *et al.*, 2005]. Enfin les cellules peuvent migrer de manière collective. Lors de cette migration, les cellules restent phyiquement et fonctionnellement connectées puisque l'intégrité des jonctions cellule-cellule est préservée durant le mouvement [Friedl *et al.*, 2004 ; Montell, 2008]. De plus, la polarité multicellulaire et l'organisation supracellulaire du cytosquelette d'actine génère des tractions pour la migration et le maintien des jonctions cellulaires. Enfin, dans la plupart des modes de migration

collective, le groupe de cellules en migration modifie de manière structurale le tissu le long duquel elles migrent, soit en laissant un vide, une trace ou en causant des modifications secondaires de la matrice exracellulaire, incluant le dépôt d'une lame basale [Friedl et Gilmour 2009].

Dans ce chapitre 2, seule la migration individuelle, mésenchymale, sur matrice 2D sera détaillée. Les autres types de migration, pouvant intervenir dans la dissémination métastatique, seront détaillés dans le chapitre 3.

Le processus de migration cellulaire est défini dans ce chapitre. Dans un premier temps, les différentes composantes impliquées dans ce processus sont décrites. Elles comprennent les composants de la matrice extracellulaire, environnement de la cellule, les protéines d'ancrage et d'échange entre la cellule et son environnement ainsi que le cytosquelette d'actine, architecture interne de la cellule. Dans un deuxième temps, l'aspect dynamique de la migration cellulaire est décrit. Enfin, l'implication des calpaïnes dans ce processus complexe est soulignée.

1. Les différentes composantes de la migration

La migration implique les composants de la matrice extracellulaire, les récepteurs de ces composants à la face ventrale de la cellule adhérente, les molécules de l'adhésion focale et le cytosquelette d'actine (Figure 15).

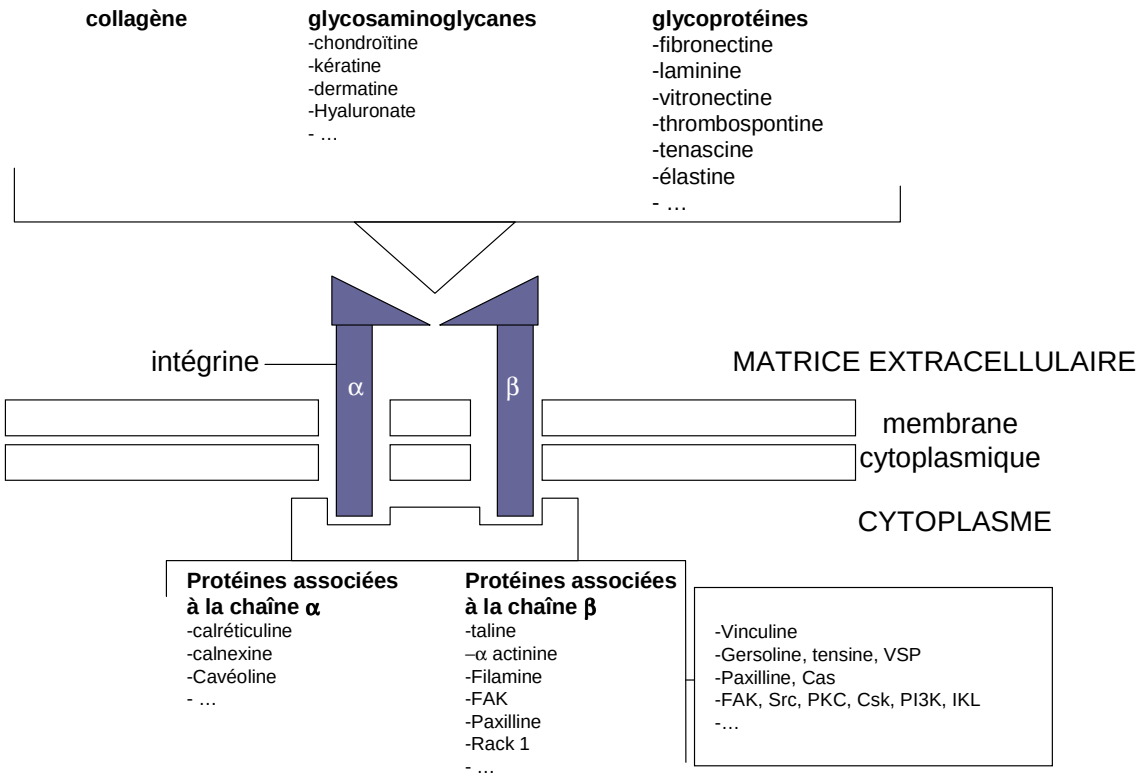

Figure 15 : Représentation schématique des interactions des composants de la migration. Les intégrines entrent en interaction avec les molécules de la matrice extracellulaire et modulent par leurs liaisons aux molécules cytoplasmiques de la plaque d'adhésion les caractéristiques fonctionnelles et dynamiques de la cellule.

1.1. La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire correspond au réseau macromoléculaire sécrété par les cellules dans l'espace extracellulaire. Elle est formée de fibres de collagène et de fibronectine, d'acide hyaluronique, de protéoglycanes portant des chaînes glycosaminoglycanes ainsi que de glycoprotéines. Toutes ces molécules interagissent avec les récepteurs, de type non-intégrine ou intégrine, à la face ventrale de la cellule adhérente. La matrice extracellulaire a un rôle de support pour les cellules. Elle peut agir de deux façons sur la cellule :

- tout d'abord, l'interaction matrice extracellulaire-cellule régule directement les fonctions cellulaires *via* des signaux extracellulaires, perçus par la cellule au niveau de récepteurs [Cf. Ch.2 **1.2**] ;
- de plus, la matrice extracellulaire contrôle la mobilisation de facteurs de croissance et de différenciation, modulant ainsi la prolifération cellulaire et contrôlant le phénotype de la cellule [Taipale et Keski-Oia, 1997].

1.1.1. Les composants de la matrice extracellulaire

La composition de la matrice extracellulaire varie en fonction du type de tissu et du stade de développement des cellules. Les différents constituants interagissent entre eux pour former un réseau moléculaire dans l'espace intercellulaire dans lequel s'organise la communication entre les cellules. Ce réseau permet le maintien de l'intégrité des tissus, participe à la régulation de la morphologie, la prolifération [Grinnell *et al.*, 1999], la différentiation cellulaire [Engler *et al.*, 2006] ainsi que la migration [Lo *et al.*, 2000].

La matrice extracellulaire se compose d'une grande variété de molécules : collagènes, fibres élastiques, glycosaminoglycanes et protéoglycanes ainsi que glycoprotéines adhésives. Les différentes combinaisons et organisations spatiales de ces molécules, définissent les divers types de réseaux caractérisant les tissus et organes.

1.1.1.1. Le collagène

Le collagène, glycoprotéine formée de trois chaînes α en forme de super-hélice, est la protéine la plus abondante chez les vertébrés. Sa synthèse se fait sous la forme de procollagène (Figure 16). Une molécule de procollagène est constituée de l'enroulement de trois chaines polypeptidiques, reliées entre elles par des ponts disulfures. La molécule est ensuite transportée dans des vésicules et secrétée par exocytose. L'assemblage des fibrilles et des fibres se fait à l'extérieur de la cellule, elles s'unissent les unes aux autres par des liaisons hydrogènes. L'ensemble forme de grosses fibres très résistantes à la traction.

Plus de 20 molécules de collagène différentes ont été identifiées, chacune ayant des propriétés mécaniques et des fonctions propres. Certains collagènes sont tissu-spécifiques. Le collagène II est retrouvé uniquement au niveau du cartilage [Zhang *et al.*, 2003]. Les collagènes de types I, II et III sont les formes les plus représentées dans l'organisme humain et forment des fibrilles responsables des forces de tension tissulaires. Les collagènes de types IV, VII, IX, X et XII sont associés aux fibrilles de collagène (I, II, III) ou organisés en réseau au niveau de la

lame basale [Cf. Ch2. *1.1.2*]. En plus de ses fonctions mécaniques et structurales, le collagène joue un rôle important dans l'adhésion et l'étalement cellulaire [Prasad *et al.*, 2002]. Il influence aussi la différenciation et la migration cellulaire [Keely et al., 1995].

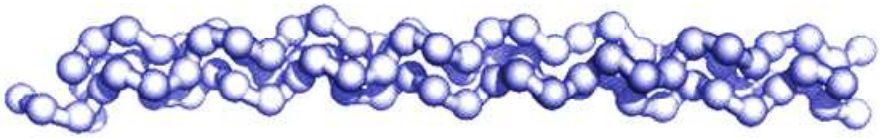

Figure 16 : Représentation schématique de la triple hélice d'une molécule de procollagène
La molécule de procollagène est constituée de l'enroulement de trois chaines polypeptidiques α, reliées entre elles par des ponts disulfures.

1.1.1.2. Les glycosaminoglycanes

Les glycosaminoglycanes sont des polysaccharides formés par la répétition de disaccharides contenant des groupes sulfates. Les principaux glycosaminoglycanes sont les chondroïtines, les kératines et les dermatines. Le hyaluronate est l'unique polysaccharide non sulfaté qui peut exister sous forme libre, sans liaison covalente avec une protéine. Il joue un rôle important dans divers processus biologiques : il participe au maintien structural de la matrice, à l'homéostasie hydrique, à la différenciation et à la migration cellulaire [Turley *et al.*, 2002]. Lors du développement embryonnaire, le hyaluronate représente le constituant majeur de la matrice extracellulaire.

1.1.1.3. Les glycoprotéines adhésives

Les glycoprotéines adhésives, telles que la fibronectine, la laminine, la vitronectine, la thrombospontine, l'élastine et la tensine, autres constituants de la matrice extracellulaire, possèdent de multiples sites de liaison aux collagènes et aux protéoglycanes ainsi que des sites permettant la liaison à la surface cellulaire [Friedl et Bröker, 2000]. La fibronectine joue un rôle important dans l'adhésion, la différenciation et la migration cellulaire [Mostafavi-Pour *et al.*, 2003]. Il existe plusieurs formes de fibronectine dues à un épissage alternatif. Dans sa séquence, la fibronectine présente de multiples motifs (Arg-Gly-Asp), (Arg-Gly-Asp-Ser), (Leu-

Asp-Val) et (Arg-Glu-Asp-Val) qui permettent sa liaison avec les cellules [Kao, 1999]. Elle présente aussi des sites de liaisons aux autres protéines de la matrice extracellulaire comme le collagène, la fibrine, l'héparine.

La laminine (Figure 17) est localisée principalement au niveau de la lame basale. Elle présente une grande affinité de liaison pour l'héparine et pour le collagène de type IV. De plus, elle possède des séquences similaires à celles des facteurs de croissance. Ces domaines sont des peptides « *EGF-like* » et peuvent stimuler la prolifération et la différentiation cellulaire [Schenk *et al.*, 2003].

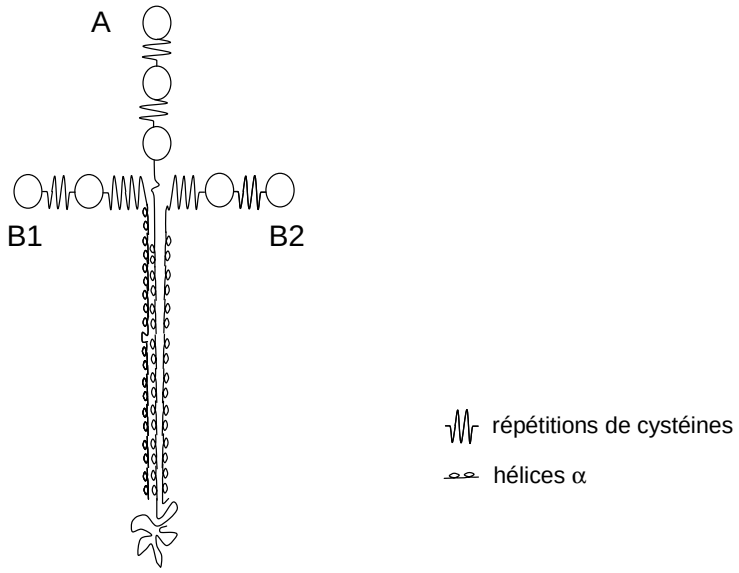

Figure 17 : Représentation schématique de la structure de la laminine d'après Yurchenco et Schittny *(1990).* Les chaînes A, B1 et B2 forment une molécule asymétrique à quatre bras. Les trois bras courts sont formés par la partie N-terminale des trois chaînes, le bras long est formé par des hélices α. Les domaines globulaires des bras courts sont reliés entre eux par des domaines riches en cystéine.

1.1.2. La membrane basale, une matrice extracellulaire particulière

La membrane basale est une matrice extracellulaire spécialisée qui se trouve entre un épithélium et des cellules du mésenchyme. Elle est constituée d'une lame basale (*lamina densa*), produite par les cellules épithéliales et d'une *lamina fibroreticularis*, produite par les cellules du mésenchyme. En l'absence de cellules mésenchymateuses, seule la lame basale est présente.

La lame basale est composée d'un grand nombre de protéines parmi lesquelles le collagène IV et la laminine. Ces deux molécules forment chacune deux types de polymères typiques de cette structure [Yurchenco et Schittny, 1990].

1.2. Les récepteurs de la matrice extracellulaire, à la face ventrale de la cellule

La face ventrale de la cellule possède deux types de récepteurs : des récepteurs de type non-intégrine et des récepteurs intégrines.

1.2.1. Les récepteurs de type non-intégrine

Les récepteurs de type non-intégrine sont des protéoglycanes, CD44 (*cluster of differenciation*) et des protéines liant la laminine. Le protéoglycane syndécane ainsi que CD44 sont les deux récepteurs de surface de type non-intégrine les plus étudiés.
Les syndécanes sont des protéoglycanes transmembranaires, composés d'un domaine cytoplasmique, d'une région membranaire hydrophobe et d'un domaine extracellulaire. Ces récepteurs possèdent une composition particulière au niveau du domaine glycosaminoglycane extracellulaire [Couchman *et al.*, 2001]. Ils ont la capacité de lier le collagène, la fibronectine, la thrombospondine mais aussi le β-FGF (facteur de croissance fibroblastique).
CD44 est une glycoprotéine de surface transmembranaire polymorphique et le principal récepteur de surface du hyaluronate [Cf. Ch.2 *1.1.1.2*]. Il peut former des complexes avec du collagène, une métalloprotéase matricielle (MMP-7), le précurseur *du heparin-binding epidermal growth facto*r (HB-EGF), et l'un de ses récepteurs erbB1. Ces liaisons entre CD44 et le collagène I, IV ou le hyaluronate, sont impliquées dans l'adhésion et la migration cellulaire [Cichy et Pure, 2003].

1.2.2. Les intégrines

Les intégrines représentent un large groupe de la famille des glycoprotéines. Ce sont des hétérodimères, constitués d'une sous-unité α fixant des cations divalents et d'une sous-unité β possédant un domaine riche en cytosine (Figure 18). La molécule d'intégrine se compose de 3 domaines : un large domaine extracellulaire (extrémité N-terminale), un domaine transmembranaire et le dernier intracellulaire (en C-terminal). Il existe 24 chaînes α et 9 chaînes β différentes, et leur combinaison détermine la spécificité de l'intégrine à son ligand. Du fait des différentes possibilités de combinaisons entre les deux chaînes, 24 couples $\alpha\beta$ fonctionnels ont été identifiés [Zamir et Geiger, 2001 ; Hynes, 2002]. Si la sous-unité β ne semble pas être impliquée dans l'activité de récepteur de la molécule d'intégrine, la sous-unité α, au contraire, présente une spécificité importante envers les signaux de transduction. Le domaine cytoplasmique $\beta 1$ est impliqué dans l'agencement du cytosquelette [Schaffert *et al.*, 2001]. Cette association dynamique entre l'intégrine et l'actine cytosquelettique [Cf. Ch.2 **1.4**], induit des changements de morphologie cellulaire altérant ainsi la prolifération et la différenciation cellulaire [Stroker *et al.*, 1999]. Chacun des principaux composants de la matrice extracellulaire peut être reconnu par au moins une intégrine [Giancotti, 2003].

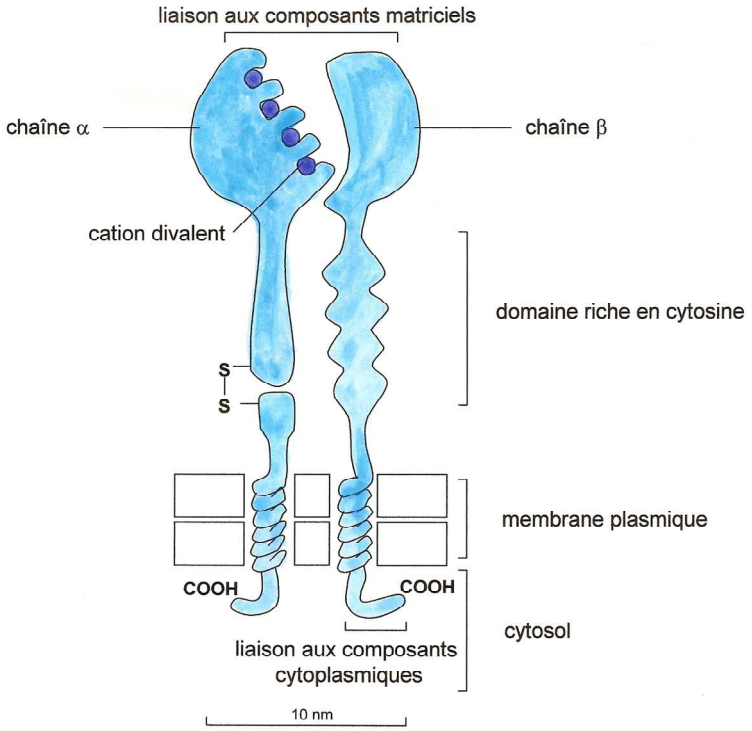

Figure 18 : Représentation schématique de la structure d'une intégrine d'après MF Poupon *(2006).* L'intégrine est constituée de deux chaînes (a et b). Les deux extrémités extracellulaires forment une structure réceptrice spécifique pour la fixation de composants de la matrice extracellulaire.

1.3. Les adhésions focales, composition

Au niveau du contact entre la matrice extracellulaire et la face ventrale de la cellule adhérente, des structures spécialisées se forment : les adhésions focales. Elles représentent une interaction physique entre la cellule et la matrice extracellulaire par laquelle des récepteurs d'adhésion forment un lien entre le cytosquelette d'actine et les composants de la matrice. Cette interaction permet à la cellule de communiquer avec son environnement extérieur et d'engendrer une réponse menant à l'adhésion, la migration, la prolifération, la différenciation, la mort cellulaire ou l'expression de gènes.

Au niveau moléculaire, les adhésions focales sont composées d'agrégats d'intégrines transmembranaires [Cf. Ch.2 *1.2.2*] qui se lient aux composants de la matrice extracellulaire au niveau de leur région extracellulaire. Les intégrines constituent un site d'ancrage pour le cytosquelette d'actine, du coté cytoplasmique de la membrane

cellulaire, et sont impliquées dans différentes voies de signalisation intracellulaires du côté matriciel [Burridge *et al.*, 1988 ; Hynes, 2002 ; Jockusch *et al.*, 1995 ; Schwartz *et al.*, 1995]. Les intégrines ne possèdent pas de capacité à lier l'actine ni d'activité enzymatique. Ces deux processus de structure et de signalisation mettent en jeu les protéines associées à la partie cytoplasmique des intégrines. Certaines de ces protéines participent à la liaison entre les récepteurs membranaires et le cytosquelette d'actine alors que d'autres sont des molécules de signalisation comme des protéines kinases et des phosphatases [Jockusch *et al.*, 1995 ; Yamada et Geiger, 2000]. Les intégrines sont impliquées dans le déclenchement de signaux de transduction tels que des phosphorylations de tyrosine, des élévations du pH intracellulaire, la synthèse de phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP2), ou encore l'activation des cascades MAPK [Clark et Brugge, 1995 ; Giancotti et Ruoslahti, 1999 ; Howe *et al.*, 1998].

1.3.1. Les protéines associées directement aux intégrines

1.3.1.1. Les protéines liées à la chaîne α de l'intégrine

Les deux sous-unités des intégrines interagissent directement, à leur extrémité cytoplasmique, avec certaines protéines impliquées dans la régulation de leur affinité avec leurs ligands ainsi que dans les interactions avec le cytosquelette.

La séquence de la chaîne α de l'intégrine, KXG/FFKR (Lys, X, Gly/Phe, Phe, Lys, Arg), qui est très conservée, permet une liaison avec la protéine chaperonne, la calreticuline [Rojiani *et al.*, 1991] qui régule l'adhésion intégrine-dépendante [Coppolino *et al.*, 1997]. Une autre protéine chaperonne, la calnexine s'associe avec les deux sous-unités α et β et facilite l'assemblage de l'hétérodimère au niveau du réticulum endoplasmique [Lenter et Vestweber, 1994]. De même, la protéine cavéoline peut aussi se lier à la chaîne α de la molécule d'intégrine [Wary *et al.*, 1996]. La cavéoline 1 est elle-même liée avec la tyrosine kinase Fyn qui devient active lors de la liaison à l'intégrine. Cette activation permet le recrutement de la molécule Shc qui permet à son tour l'activation de la voie Ras-MAPK [Wary *et al.*, 1996 ; Wary *et al.*, 1998] (Figure 19). La protéine paxilline s'associe elle aussi avec

la sous-unité α de l'intégrine et stimule l'adhésion et la migration cellulaire [Liu *et al.*, 1999].

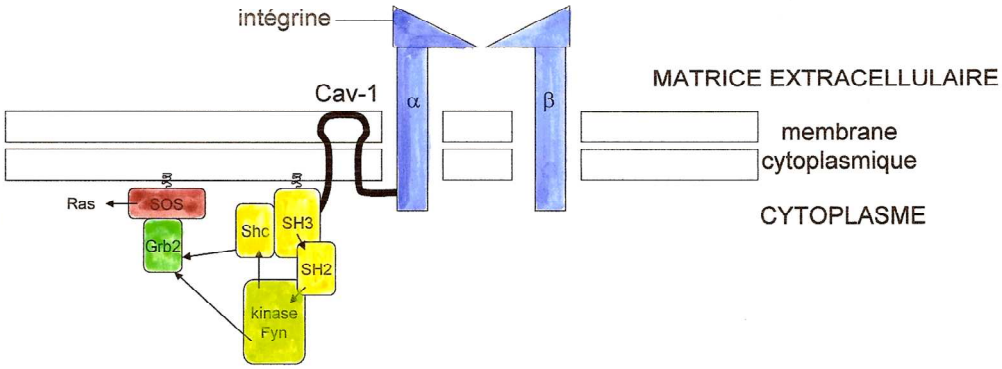

Figure 19 : Représentation schématique du modèle de recrutement de Shc, faisant intervenir les intégrines et de l'activation de Ras, d'après Wary *et al.* *(1998).* La liaison de la cavéoline 1 à la chaîne α de la molécule d'intégrine entraîne l'activation de tyrosine phosphatases qui activent Fyn par déphosphorylation au niveau de son domaine C-terminal. Fyn se lie alors à Shc, en présence de SH3. L'ensemble se combine avec le complexe Grb2/SOS pour stimuler la voie Ras/MAPK.

1.3.1.2. Les protéines liées à la chaîne β de l'intégrine

Les protéines qui se lient à la chaîne β de l'intégrine appartiennent à deux groupes. Le premier groupe est composé de protéines cytosquelettiques comme la taline, l'α-actinine et la filamine [Horwitz *et al.*, 1986 ; Otey *et al.*, 1990 ; Sharma *et al.*, 1995]. De nombreuses études utilisant la microinjection d'anticorps [Bolton *et al.*, 1997 ; Nuckolls *et al.*, 1992], les oligodésoyribonucléotides antisens [Albiges-Rizo *et al.*, 1995] ou l'augmentation du niveau d'expression [Gluck et Ben-Ze'ev, 1994 ; Gluck *et al.*, 1993], montrent que la taline et l'α-actinine participent à l'assemblage des plaques d'adhésion ainsi qu'au processus de migration.

Le second groupe de protéines cytoplasmiques interagissant avec la sous-unité β de l'intégrine sont des facteurs de régulation. Ainsi, des facteurs de régulation tels que la kinase d'adhésion focale (p125FAK) ou Rack1 (récepteur de la protéine kinase C) se lient à la chaîne β [Schaller *et al.*, 1995 ; Liliental et Chang, 1998].

1.3.2. Les protéines associées indirectement aux intégrines

De nombreuses protéines interagissent indirectement avec les intégrines et forment un réseau en trois dimensions.

1.3.2.1. La vinculine, protéine de structure

La vinculine (masse moléculaire : 130 kDa) est la principale protéine de structure localisée au niveau des adhésions focales [Geiger, 1979]. Elle se compose d'une tête globulaire et d'un domaine queue, les deux domaines étant connectés par une séquence riche en proline. Les interactions intramoléculaires entre le domaine tête et le domaine queue masquent des sites de liaisons à la taline et à l'actine [Johnson et Craig, 1994 ; Johnson et Craig, 1995]. Cette structure intramoléculaire peut être remaniée par la liaison de PIP2 à la vinculine [Fukami *et al.*, 1994 ; Gilmore et Burridge, 1996] (Figure 20). La surexpression de la vinculine entraîne une inhibition de la migration cellulaire, alors qu'une inhibition de cette molécule induit une forte motilité cellulaire et un pouvoir invasif important [Rodriguez Fernandez *et al.*, 1992 ; Rodriguez Fernandez *et al.*, 1993]. Des embryons de souris *vinculine* $^{-/-}$ ne peuvent pas se développer au-delà de 10 jours de gestation et présentent un tube neural altéré ainsi que des malformations cardiaques [Xu *et al.*, 1998]. La vinculine joue un rôle important dans la régulation de l'adhésion et de la migration cellulaire. Elle interagit avec l'actine, la taline [Burridge et Mangeat, 1984 ; Menkel *et al.*, 1994], l'α-actinine [Kroemker *et al.*, 1994], la paxilline [Turner *et al.*, 1999a], VASP (*vasodiloator-stimulated phosphoprotein*) [Brindle *et al.*, 1996] et la vinexine [Kioka *et al.*, 1999].

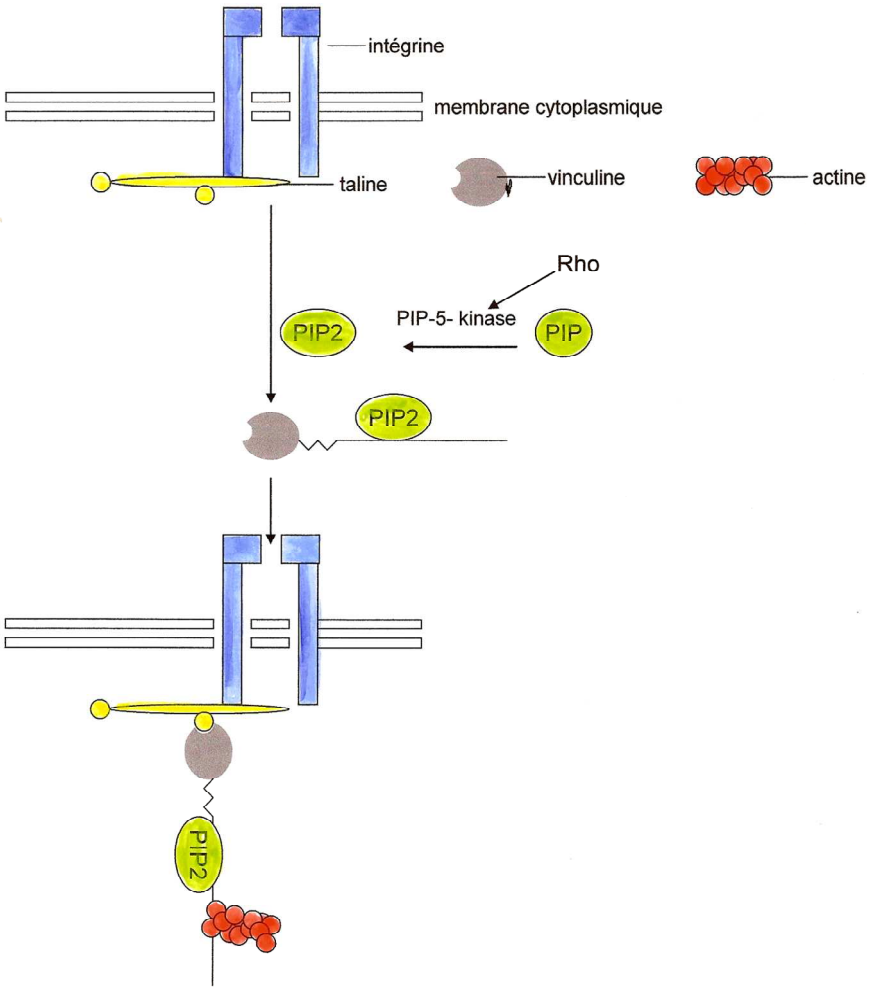

Figure 20 : Modèle de recrutement de la vinculine par PIP2 au niveau de l'adhésion focale, d'après Gilmore et Burridge, *(1996).* La vinculine présente sous forme inactive est activée par la liaison avec PIP2 après que ce dernier ait été stimulé par la protéine Rho.

1.3.2.2. Les protéines régulatrices

- Les protéines régulant le dynamisme de l'actine

Certaines protéines régulatrices localisées au niveau des plaques d'adhésion sont impliquées dans la régulation du dynamisme de l'actine. Les filaments d'actine sont ancrés aux adhésions focales sous forme de fibres de stress. La formation et le maintien de ces structures dépendent de facteurs de régulation de l'actine dont certains tels que la gelsoline, la tensine, la protéine VASP ont été identifiés au niveau des adhésions focales. La gelsoline est une protéine qui intervient dans la nucléation de l'actine [Kwiatkowski, 1999]. Du fait de l'implication de la gelsoline dans la dynamique de l'actine, les fibroblastes *gelsoline* $^{-/-}$ présentent une incapacité à

former des lamellipodes et sont dépourvus de capacité migratoire [Azuma *et al.*, 1998]. La tensine est elle aussi impliquée dans le dynamisme de l'actine ; sa surexpression entraîne un retard dans la polymérisation des fibres de stress [Lo *et al.*, 1994]. La protéine VASP interagit avec la vinculine et la zyxine, au niveau des adhésions focales. Elle régule négativement la migration et la formation de lamellipodes dans les fibroblastes [Bear *et al.*, 2000].

- Les protéines adaptatrices

D'autres protéines ont un rôle d'adaptateur, elles possèdent plusieurs sites de liaison à différentes protéines et permettent aussi de créer un réseau d'interactions protéiques. Parmi ces adaptateurs, la paxilline présente des sites de liaison à la protéine Src [Weng *et al.*, 1993], avec FAK, la vinculine [Brown *et al.*, 1998 ; Wood *et al.*, 1994] ou encore la protéine PP2A (phosphatase à sérine/thréonine) [Ito *et al.*,2000]. La paxilline serait impliquée dans la réorganisation du cytosquelette d'actine (*via* le recrutement du complexe PAK (*p21 GTPase-activated kinase*) /PIX (*PAK-interacting exchange factor*) [Turner *et al.*, 1999b]) ainsi que dans la migration (par le recrutement de la protéine adaptatrice Crk [Petit et al., 2000]). La protéine p130Cas (*Crk-associated substrat*) est aussi une protéine ayant un rôle d'adaptateur. Elle peut, entre autre, lier FAK [Burnham *et al.*, 1996 ; Harte *et al.*, 1996]. Cette interaction augmente la phosphorylation de Cas [Cary *et al.*, 1998] ce qui a pour conséquence le recrutement de l'adaptateur Crk et de stimuler ainsi la migration cellulaire [Klemke *et al.*, 1998].

- Les protéines kinases

Plusieurs protéines kinases participent aussi à la formation des plaques d'adhésion dont FAK, Src, Csk, PKC, PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*) et p53ILK (*Integrin-linked kinase*).

FAK est une des protéines kinases présentent au niveau des adhésions focales (Figure 21). Elle possède trois principaux domaines fonctionnels : un domaine N-terminal qui contient un site de liaison à l'intégrine, un domaine catalytique central et une région C-terminale portant une séquence FAT (*focal adhesion targeting*). Elle possède aussi deux régions riches en proline. La protéine FAK interagit avec

plusieurs protéines dont la paxilline [Hildebrand *et al.*, 1995], p130Cas [Harte *et al.*, 1996 ; Polte et Hanks, 1995] et la taline [Chen *et al.*, 1995]. L'activité kinase de FAK est dépendante de sa phosphorylation au niveau de la tyrosine 397. Cette phosphorylation est stimulée par l'adhésion à l'intégrine [Burridge et al., 1992 ; Guan et Shalloway, 1992] ainsi que par des facteurs de croissance ou des hormones [Rankin et Rozengurt, 1994]. Cette phosphorylation joue un rôle important dans la médiation des signaux de transduction au niveau des adhésions focales. La phosphorylation de la FAK, au niveau de la tyrosine 397, permet de créer un site de liaison au domaine SH2 (*Src domaine homology region 2*) des protéines Src [Schaller *et al.*, 1994], à PI3K [Chen *et al.*, 1996] et à PTEN (*phosphatase and tension homologue*) [Tamura *et al.*, 1999]. L'association de FAK avec Src induit la phosphorylation de la tyrosine 925 créant ainsi un site de liaison à la protéine adaptatrice Grb2 (*growth factor receptor-bound protein 2*) [Schlaepfer *et al.*, 1994] ainsi que la phosphorylation des tyrosines 861, 576 et 577 induisant la régulation de l'activité kinase de la protéine FAK [Calalb *et al.*, 1995]. La protéine FAK est impliquée dans différents processus cellulaires tels que l'étalement, la migration, la survie et la prolifération. Des fibroblastes issus d'embryons *fak* $^{-/-}$ présentent un défaut d'étalement, une migration moins importante que les cellules témoins et une augmentation du nombre d'adhésions focales [Ilic *et al.*, 1995]. Les embryons quant à eux ne sont pas viables et présentent des défauts au niveau du mésoderme. De même, dans les cellules CHO, une surexpression de FAK entraîne une augmentation de la vitesse de migration [Cary *et al.*, 1996].

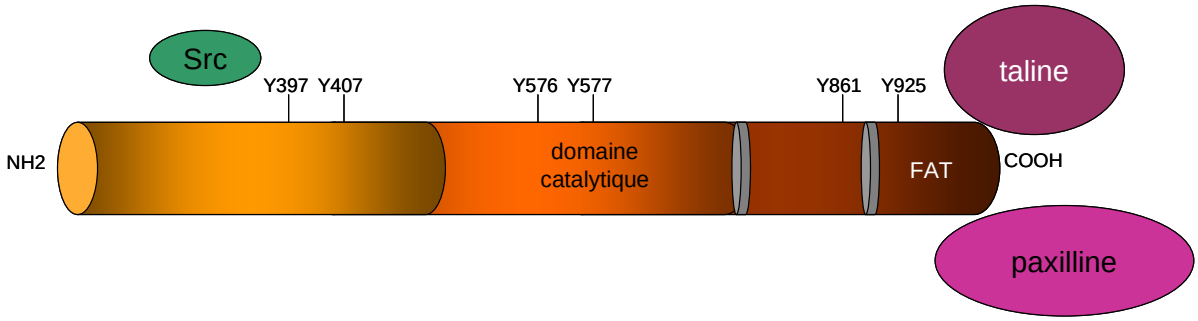

Figure 21 : Représentation schématique de la structure de la protéine kinase FAK, d'après Cornillon *et al.* *(2003).* La protéine FAK est divisée en trois domaines, un domaine N-terminal qui porte un site de liaison à l'intégrine, un domaine central catalytique et un domaine C-terminal portant une séquence FAT. L'autophosphorylation de la tyrosine en 397 permet la liaison avec Src. Cette interaction induit la phosphorylation des autres résidus tyrosine de FAK ainsi que des résidus de protéines liées à FAK. La région FAT (focal adhesion targeting) est nécessaire pour la localisation dans le complexe d'adhésion par l'intermédiaire de liaisons avec la taline et la paxilline. La molécule présente deux régions riches en proline ; elles sont représentées en foncé.

La protéine kinase Src, localisée au niveau des adhésions focales possède six domaines fonctionnels : un domaine SH4 permettant la liaison à la membrane cellulaire, un domaine SH2 et un domaine SH3, un domaine catalytique et un domaine queue inhibiteur (Figure 22). L'activité de la kinase Src est régulée par un changement conformationnel. Lorsque la protéine est inactive, elle est repliée sur elle-même et présente des interactions intramoléculaires stabilisant sa conformation [Xu et al., 1997]. Cette configuration permet une interaction entre le domaine SH2 et la tyrosine 527 phosphorylée de la région queue inhibitrice [Cooper *et al.*, 1986]. Cette phosphorylation est due à la tyrosine kinase cytoplasmique, Csk, inhibiteur de l'activité kinase de la protéine Src [Okada and Nakagawa, 1989]. L'adhésion cellulaire augmente l'activité kinase de la protéine Src ainsi que sa concentration au niveau des adhésions focales [Kaplan *et al.*, 1995]. De plus, les fibroblastes *Src* $^{-/-}$ présentent un retard d'adhésion et d'étalement ainsi qu'un pouvoir migratoire réduit [Hall *et al.*, 1996]. Le rétablissement de l'adhésion dans ces fibroblastes nécessite la présence des domaines SH2 et SH3 alors que le rétablissement de la migration nécessite la présence du domaine kinase (SH1).

Figure 22 : Représentation schématique de la structure de la protéine kinase Src, d'après Roskoski *(2004).* La protéine Src se compose du côté N-terminal au côté C-terminal, d'un groupe de 14 carbones myristoylés (facilitant l'attachement de Src à la membrane) attaché au domaine SH4, d'un domaine unique, d'un domaine SH2, un domaine de liaison, d'un domaine SH1 tyrosine kinase et d'un domaine régulateur en C-terminal. In vivo, 90 à 95% des protéines Src sont phosphorylées au niveau des tyrosines 416 et 527.

Les protéines PI3K et PKC sont deux autres kinases jouant un rôle important au niveau des adhésions focales. La protéine kinase PI3K est impliquée dans le processus mitotique, la survie cellulaire, le trafic intracellulaire, la migration et la régulation de cytosquelette [Carpenter et Catley, 1996]. Quant à la protéine PKC, elle peut phosphoryler la protéine MARCKS (*Myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate*), la taline, la vinculine et la paxilline [De Nichiolo et Yamada, 1996 ; Hyatt *et al.*, 1994].

- Les phosphatases

L'équilibre du niveau de phosphorylation est maintenu par les protéines kinases et les phosphatases.

La phosphatase Shp-2, localisée au niveau des adhésions focales, est impliquée dans la transduction du signal. Les fibroblastes *shp* $^{-/-}$ présentent un défaut d'étalement et de migration ainsi qu'une augmentation du nombre d'adhésions focales, en comparaison des cellules témoins [Yu *et al.*, 1998]. De même, les fibroblastes *ptp-pest* $^{-/-}$, délétés en protéine PTP-PEST (phosphatase cytoplasmique), présentent, eux aussi, une migration réduite [Angers-Loustau *et al.*, 1999]. PTP-PEST interagit avec p130Cas et la paxilline.

La tyrosine phosphatase PTEN joue aussi un rôle important au niveau des adhésions focales, elle permet la déphosphorylation de la protéine FAK et ainsi, inhibe la migration cellulaire et la formation de plaques d'adhésion [Tamura *et al.*, 1998]. De plus, elle déphosphoryle la protéine adaptatrice Shc et inhibe ainsi le recrutement de la protéine Grb2, bloquant la voie MAPK [Gu *et al.*, 1998].

Toutes les protéines énumérées ci-dessus composent les adhésions focales. Cependant, elles ne sont pas toutes présentent en même temps et la composition de l'adhésion focale est dépendante de la nature de la matrice extracellulaire ainsi que du type cellulaire.

1.4. Le cytosquelette d'actine

Le cytosquelette d'actine joue un rôle primordial dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que le maintien de la morphologie de la cellule, la division cellulaire, la migration, la contraction, l'adhésion, la phagocytose ou encore la transduction de signaux.

Dans la cellule, les microfilaments d'actine, constituants du cytosquelette, sont perpétuellement en train de se raccourcir ou de s'allonger et les faisceaux et les trames en train de se former et de se défaire. Tous ces changements dans l'organisation des microfilaments d'actine génèrent des forces modifiant profondément la forme de la cellule et lui conférant la capacité migratoire. Le cytosquelette présente différentes structures : des réseaux d'actine, au niveau des lamellipodes, des agrégats, au niveau des filopodes et des fibres de stress d'actine contractiles [Ridley et al., 2003].

Ces différentes structures intervenant directement dans le processus de migration, elles seront détaillées dans le paragraphe **2.2.**

1.4.1. Les constituants de l'actine filamenteuse

L'actine F, filamenteuse, est constituée de monomères d'actine G (Figure 23). L'actine G est divisée en trois isoformes, l'actine α, β et γ. Dans les cellules musculaires, l'isoforme β est localisée préférentiellement à la périphérie de la cellule, associée avec des plaques de vinculine, de la myosine striée et des agrégats d'α-actinine. L'isoforme α est quant à elle, localisée préférentiellement dans la partie centrale de la cellule, associée à de la myosine et de l' α-actinine [Song et al, 2000].

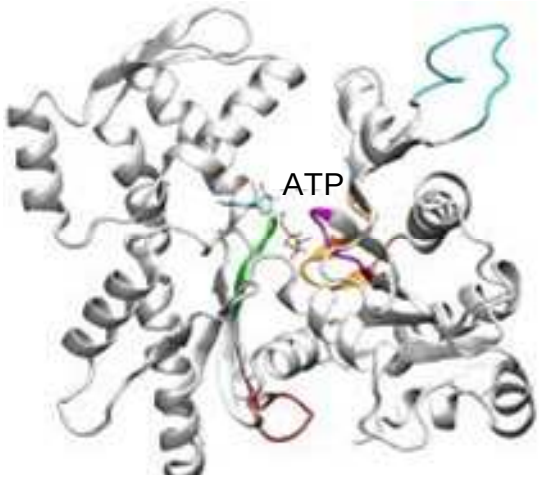

Figure 23 : Structure tridimensionnelle du monomère d'actine d'après Zheng et al. *(2007).* En violet : boucle S ; en cyan : boucle D ; en orange : boucle H ; en vert : boucle G ; en rouge : boucle W.

1.4.2. La polymérisation de l'actine

In vitro, l'actine polymérise en trois phases (Figure 24). Durant la première phase, dite de nucléation, l'actine G (actine globulaire) s'agrège en petits noyaux, oligomères instables. Lorsque 3 ou 4 sous-unités d'actine G sont agrégés, l'oligomère sert d'amorce à l'édification du filament d'actine. C'est la phase d'élongation, durant laquelle le filament d'actine F s'allonge rapidement par addition de monomères d'actine G à ses deux extrémités. À mesure que le filament s'allonge, la concentration d'actine G libre diminue jusqu'à atteindre la phase d'équilibre. Lors de cette phase, les monomères d'actine G s'échangent avec les sous-unités d'actine en bout de filament, sans changement de masse du filament. La concentration d'actine G à l'équilibre est appelée concentration critique.

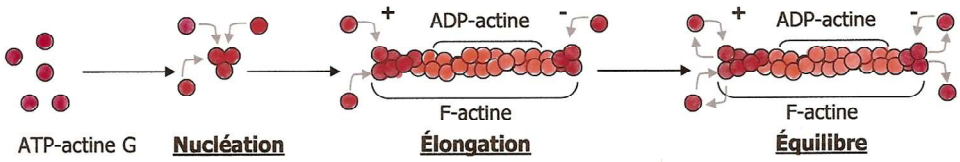

Figure 24 : Représentation schématique de la polymérisation en trois phases de la F-actine

Une fois incorporés dans un filament de F-actine, les monomères hydrolysent lentement l'ATP pour devenir de l'ADP-actine, élément plus stable.
Le filament d'actine n'est pas symétrique : il possède une extrémité (+), ou barbée, et une extrémité (-), ou pointue. L'extrémité (+) grandit 5 à 10 fois plus vite que l'extrémité (-). Cette différence de croissance est due à une différence de concentration critique entre les deux extrémités du filament [Pollard 1986]. Cette différence entraîne, en phase d'équilibre un ajout de monomères à l'extrémité (+) et une perte de monomères à l'extrémité (-) ; la longueur du filament reste ainsi constante. Les monomères ajoutés à l'extrémité (+) se déplacent le long du filament jusqu'à l'extrémité (-) où ils se détachent, suivant le mécanisme d'un tapis roulant.

1.4.3. Les protéines associées à l'actine

Les protéines associées à l'actine peuvent être classées en six groupes : les protéines de réticulation, de stabilisation, de séquestration, de la coiffe, de fragmentation du filament d'actine ainsi que des protéines motrices ; l'ensemble de ces groupes compte 162 protéines.

1.4.3.1. Les protéines de réticulation

Les protéines de réticulation participent à la formation des réseaux et des faisceaux d'actine. L'α-actinine et la filamine sont les deux principales protéines de réticulation du cytosquelette. Elles sont toutes deux impliquées dans la signalisation cellulaire en connectant les intégrines au cytosquelette [Kiema *et al.*, 2006 ; Critchley, 1993].
Chez l'Homme, la filamine A est la plus abondante des trois isoformes identifiées [Stossel *et al.*, 2001]. La filamine est un homodimère de deux sous-unités de 280 KDa. Chaque sous-unité possède, au niveau du domaine N-terminal, un site de liaison à l'actine composé de deux domaines homologues à la calponine (domaine CH). Ce site de liaison à l'actine est suivi de 24 tandems homologues au domaine immunoglobuline (IgFLN1-24). La dimérisation au niveau de ces tandems permet la formation d'un homodimère parallèle, flexible possédant un grand angle de réticulation des filaments d'actine [Flanagan *et al.*, 2001]. La filamine permet ainsi

l'assemblage d'un réseau complexe entre les récepteurs transmembranaires et le cytosquelette d'actine, ainsi qu'entre les filaments d'actine eux-mêmes.

L'α-actinine est une protéine cytosquelettique abondante. Elle permet d'ancrer les fibres de stress au niveau des plaques d'adhésion. Au niveau de sa région N-terminale, elle possède, comme la filamine, un domaine homologue à la calponine qui interagit avec les filaments d'actine. Ce domaine CH est suivi par un domaine central de répétition de spectrines (SP) puis d'un domaine C-terminal possédant des motifs EF-hand [Broderick et Winder, 2005 ; Otey et Carpen, 2004] (Figure 25). L'unité fonctionnelle de l'α-actinine est un homodimère antiparallèle [Blanchard *et al.*, 1989]. Les quatre répétitions de motifs spectrine définissent la distance entre deux filaments d'actine. Contrairement à la filamine qui permet la formation de réseaux complexes, l'α-actinine permet la formation de faisceaux (Figure 26).

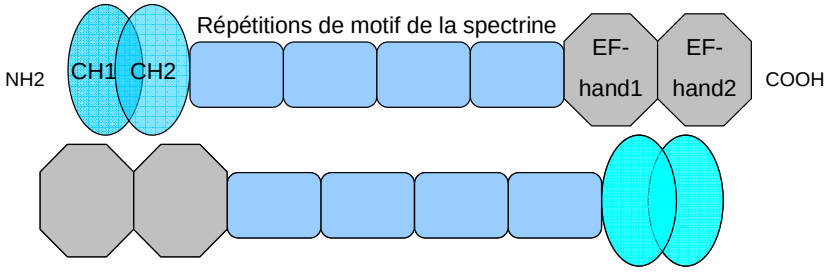

Figure 25 : Représentation schématique de la structure de l'homodimère d'α-actinine, d'après Broderick et Winder *(2005).* L'α-actinine protéine Src se compose de deux domaines homologues de la calponine, du côté N-terminal, puis de trois répétitions de motifs de la spectrine et enfin, de deux motifs EF-hands, du côté C-terminal. L'unité active de l'α-actinine est un homodimère antiparallèle.

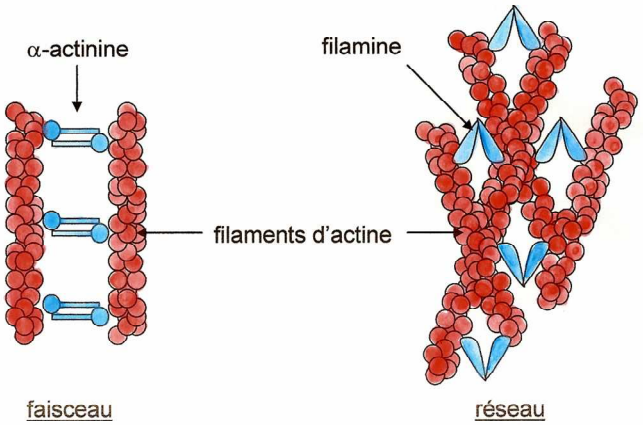

Figure 26 : Représentation schématique du rôle de l'α-actinine et de la filamine dans l'établissement, respectivement, de faisceau et de réseau d'actine. Le dimère d'α-actinine permet la formation de structures en faisceau ; ces structures sont retrouvées notamment au niveau des plaques d'adhésion. La filamine permet la formation de réseaux, retrouvés notamment au niveau des lamellipodes et des pseudopodes.

1.4.3.2. Les protéines de stabilisation

Parmi les protéines de stabilisation, les tropomyosines jouent un rôle important dans le maintien de l'actine F. Elles forment une structure secondaire filamenteuse en double hélice provenant de la polymérisation en tête-queue de dimères. La molécule de tropomyosine est constituée de deux sous-unités assemblées sous forme d'homo- ou hétérodimère. Les tropomyosines musculaires forment préférentiellement des hétérodimères [Jancso et Graceffa, 1991 ; Lehrer *et al.*, 1989 ; Sanders *et al.*, 1986]. Inversement, les tropomyosines cytosquelettiques forment préférentiellement des homodimères [Lin *et al.*, 1985 ; Matsumura et Yamashiro-Matsumura, 1985]. L'affinité intrinsèque pour l'actine d'un unique dimère de tropomyosine est faible. De plus, des études de diffraction aux rayons X montrent que la distance la plus faible entre un carbone de la molécule de tropomyosine et la molécule d'actine est de 10,5 Å [Lorentz *et al.*, 1995]. Le dimère de tropomyosine semble ainsi « flotter » dans la cannelure du polymère d'actine, les deux structures étant reliées par des interactions ioniques. Cependant, la tropomyosine présente une grande capacité à former des polymères le long de la cannelure du filament d'actine ce qui augmente l'affinité et la stabilité de l'interaction [Perry, 2001].

La tropomyosine possède un rôle stabilisateur du filament d'actine F [Lal et Korn, 1986]. Elle n'intervient pas de manière directe sur la polymérisation d'actine, elle stabilise mécaniquement le filament diminuant ainsi le nombre d'extrémité de filaments disponibles pour la polymérisation [Hitchcock-DeGregori *et al.*, 1988]. L'interaction entre la tropomyosine et l'actine a aussi pour conséquence d'inhiber la formation de réseaux d'actine, contrant l'action d'Arp2/3, et limitant par conséquent la formation de lamellipodes [Blanchoin *et al.*, 2001] (figure 27).

La tropomyosine collabore avec d'autres protéines (myosine, tropomoduline, cofiline, caldesmone, gelsoline…) liant l'actine pour former des complexes de fonction différente.

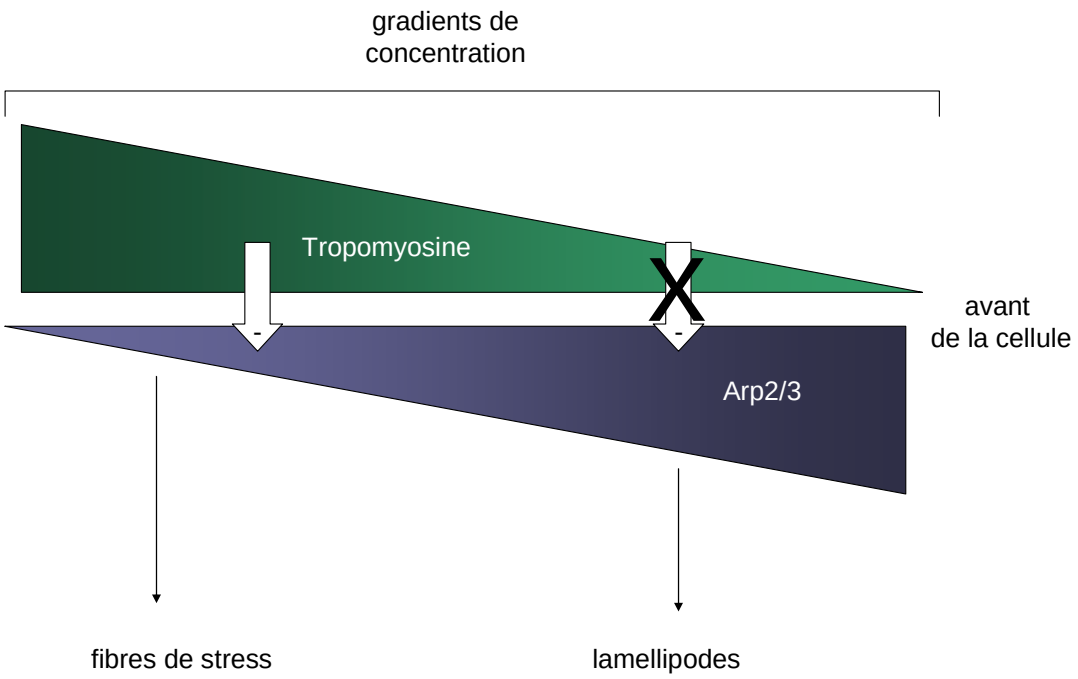

Figure 27 : Représentation schématique de la régulation par la tropomyosine de la formation de réseaux d'actine stimulée par Arp2/3. La tropomyosine inhibe les branchements des filaments d'actine stimulés par Arp2/3. Elle inhibe ainsi la formation de lamellipodes et stimule la formation de fibres de stress. A l'avant de la cellule en migration, la concentration en tropomyosine diminue permettant ainsi à la protéine Arp2/3 de stimuler la formation de réseaux d'actine, constituants des lamellipodes.

1.4.3.3. Les protéines de séquestration

Dans la cellule, environ 40% de l'actine est sous forme monomère. Ce pourcentage implique l'existence de protéines de séquestration de l'actine G. La thymosine β4 est considérée comme étant la principale protéine de séquestration de l'actine [Carlier et

al. 1993]. La thymosine β4 est une petite protéine qui se fixe à l'ATP-actine avec un rapport 1/1. Cette liaison bloque le site de l'actine G pour l'ATP et ainsi la polymérisation (Figure 28).

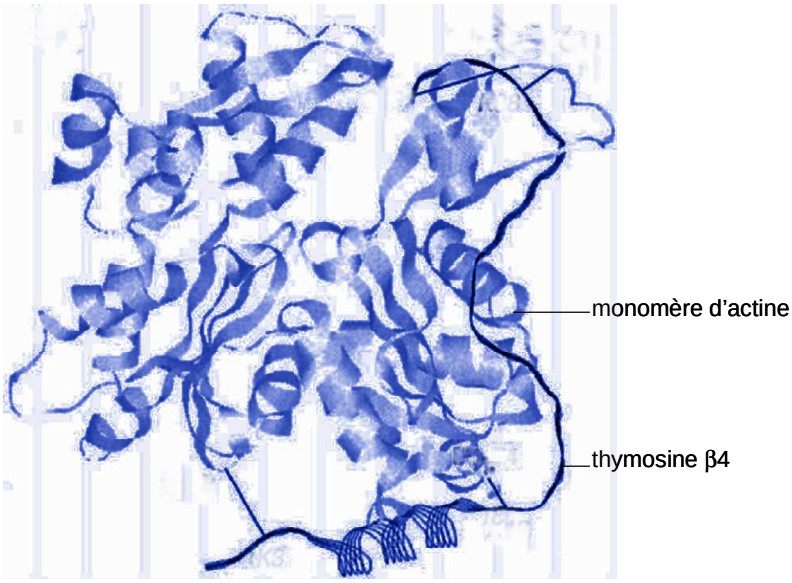

Figure 28 : Modèle hypothétique de l'interaction entre le monomère d'actine et la thymosine β4 d'après De la Cruz et al. (*2000).*

La profiline se lie aussi aux monomères d'ATP-actine dans un rapport 1/1. Sa principale fonction serait de favoriser l'assemblage des filaments de F-actine, en agissant comme facteur d'échange de nucléotides [Perelroizen et al. 1996 et Vinson et al. 1998]. Elle permet de remplacer l'ADP par l'ATP. De plus, lorsqu'elle est complexée à l'actine G, la profiline contribuerait à l'addition de monomères d'actine G à l'extrémité (+) du filament [Zebda et al. 2000].

Ainsi, la thymosine β4 ainsi que la profiline régulent la proportion entre les monomères d'actine et leur polymérisation (Figure 29).

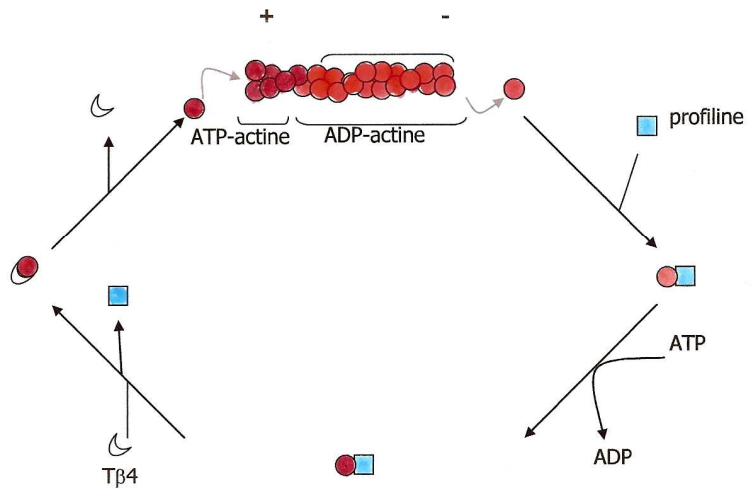

Figure 29 : Représentation schématique des interactions existant entre les monomères d'ATP-actine (ronds gris) **ou ADP-actine** (ronds blancs) **et la thymosine β4** (croissant blanc) **ou la profiline** (carré blanc)**.**

Lors de la polymérisation de la F-actine, l'hydrolyse de l'ATP est une réaction rapide avec un temps de demi-réaction d'environ 2 secondes [Blanchoin et Pollard, 2002]. Cependant, la dissociation du phosphate inorganique ainsi libéré est beaucoup plus lente, avec un temps de demi-réaction d'environ 350 secondes [Carlier et Pantaloni, 1986].

1.4.3.4. Les protéines de la coiffe

D'autres protéines se fixant à l'extrémité barbée, sont capables de réguler la dépolymérisation de l'actine du côté pointu et d'augmenter ainsi le réservoir de monomères. Un filament à l'état stationnaire, bloqué au bout barbé, ne peut que se raccourcir par dépolymérisation du bout pointu, entraînant un ralentissement du processus de tapis roulant.

La tropomoduline (40 kDa) est une protéine coiffante. Elle lie la partie N-terminale de la tropomyosine (acides aminés 7 à 14) ainsi que l'extrémité pointue du filament d'actine [Vera *et al.*, 2000]. La liaison à l'actine induit une inhibition de l'élongation de l'extrémité pointue du filament et la liaison à la tropomyosine induit une inhibition de la dépolymérisation de cette extrémité [Mudry *et al.*, 2003]. Ensemble, la

tropomyosine et la tropomoduline régulent la longueur des filaments d'actine [Ursitti et Fowler, 1994 ; Woo et Fowler 1994].

1.4.3.5. Les protéines de fragmentation

D'autres protéines sont impliquées dans la dissociation des filaments d'actine F ; ce sont des protéines de dislocation telles que la gelsoline et la cofiline.

Le complexe ADF (*actin depolymerising factor*)/cofiline stimule la dépolymérisation des filaments d'actine [Bernstein et Bamburg, 1982 ; Nishida *et al.*, 1992]. La cofiline humaine est une protéine de 18 kDa, composée de 166 acides aminés. Sa séquence contient un peptide signal de localisation nucléaire, un site potentiel de liaison à l'actine de l'acide aminé 106 à l'acide aminé 125 et un site de phosphorylation au niveau de la sérine en position 3 dans sa partie N-terminale. Du fait de sa petite taille, cette protéine ne contient qu'un seul domaine [Hatanaka *et al.*, 1996 ; Fedorov *et al.*, 1997 ; Leonard *et al.*, 1997] constitué de feuillets β entourés de quatre hélices α [Puius *et al.*, 1998]. La cofiline peut se lier aux monomères et aux filaments d'actine mais son action dépend d'un certain nombre de facteurs. En effet, son activité de liaison ou de fragmentation est très sensible aux variations de pH. À un pH inférieur à 7,3, la cofiline se lie le long du filament, avec une stœchiométrie d'une molécule de cofiline pour une sous-unité d'actine. Elle n'entraîne la dépolymérisation du filament qu'à partir d'un pH plus élevé. La cofiline se lie préférentiellement à l'actine couplée à l'ATP (les constantes de dissociation sont respectivement de 0,2 mM et 1,3 mM) [Hayden *et al.*, 1993, Hawkins *et al.*, 1993]. L'état de phosphorylation de la molécule est aussi un facteur de régulation important ; la phosphorylation d'un de ses résidus sérine inhibe sa liaison à l'actine [Agnew *et al.*, 1995]. *In vivo*, cette phosphorylation est due à la LIM-kinase (protéine spécifique des sérines) [Edwards et Gill, 1999]. Le PIP2 est aussi un inhibiteur de la liaison cofiline/actine [Yonezawa *et al.*, 1990].

La gelsoline (83 kDa) est une protéine monomérique, codée par un gène unique localisé sur le chromosome 9. Elle se présente sous deux isoformes : une cytosquelettique et une plasmatique. Elle est composée de six domaines de 120 à 130 acides aminés [Vandekerchhove *et al.*, 1990 ; Hartwig et Kwiatkowski, 1991]. Ces domaines sont homologues entre eux et présentent quelques homologies avec

la profiline [Cf. Ch.2 *1.4.3.3*] Elle fragmente et coiffe l'extrémité barbée des filaments d'actine : elle se lie au filament d'actine, le fragilise puis se fixe sur l'extrémité d'un des deux morceaux, générant ainsi deux filaments plus courts, de stabilité différente ainsi qu'une nouvelle extrémité pointue [McGough et Way, 1995]. La gelsoline entraîne aussi la polymérisation de nouveaux filaments d'actine en formant des nucléus avec les monomères d'actine [Yin, 1998 ; Weeds et Maciver, 1993]. De même que la cofiline, son activité est régulée par le calcium, le pH et le PIP2. Son rôle est de réguler la longueur ainsi que le nombre des filaments d'actine et de permettre des réarrangements de l'actine au niveau du cytosquelette, notamment pendant la migration cellulaire. Chez les fibroblastes, la concentration en gelsoline est corrélée à la vitesse de migration [Cunningham *et al.*, 1991].

1.4.3.6. Les protéines motrices

Des protéines motrices, telle que la myosine II, lient les filaments d'actine cytosquelettiques (Figure 30).

Les filaments d'actine sont interdigités avec des filaments bipolaires de myosine, constitués de 15 à 20 molécules (Figure 31). Cette structure permet la contraction en faisant glisser les filaments d'actine les uns par rapport aux autres (Figure 32).

L'augmentation de la concentration calcique stimule la liaison de calmoduline avec une kinase, la MLCK (*myosin light-chain kinase*). Cette association permet la phosphorylation de la chaîne légère régulatrice de la myosine. Cette phosphorylation permet la contraction en stimulant l'assemblage de la myosine au filament d'actine et en permettant d'augmenter l'activité catalytique de la myosine.

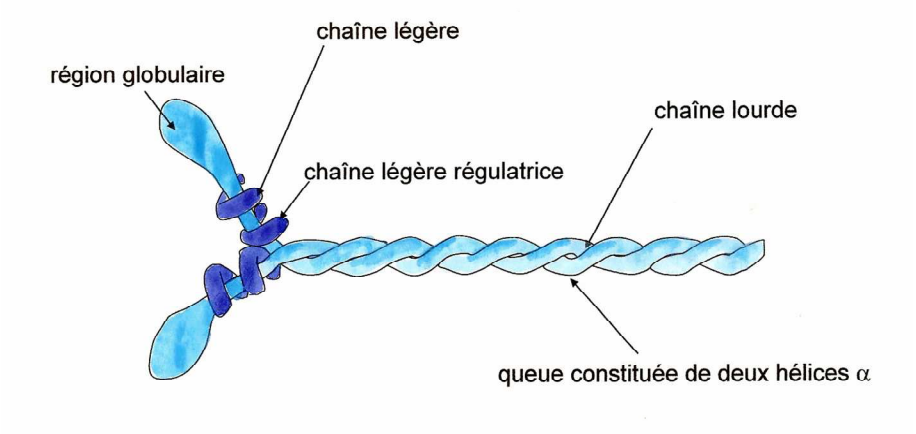

Figure 30 : Représentation schématique de la molécule de myosine II, d'après Cooper *(2000).* La molécule de myosine II est constituée de deux chaînes lourdes et de deux paires de chaînes légères. Les chaînes lourdes ont une région tête globulaire et une queue en hélice α.

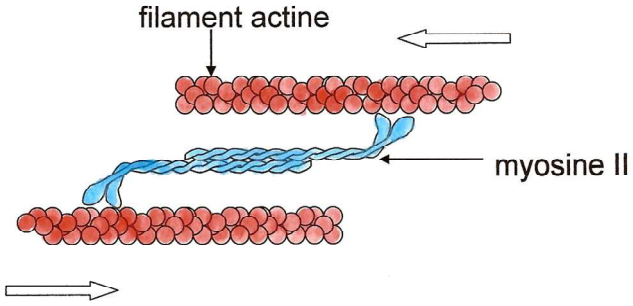

Figure 31 : Représentation schématique de l'association de la myosine II et des filaments d'actine F, d'après Cooper *(2000).* L'association entre la myosine II et les filaments d'actine F permet le glissement des filaments d'actine les uns par rapport aux autres, induisant ainsi une contraction.

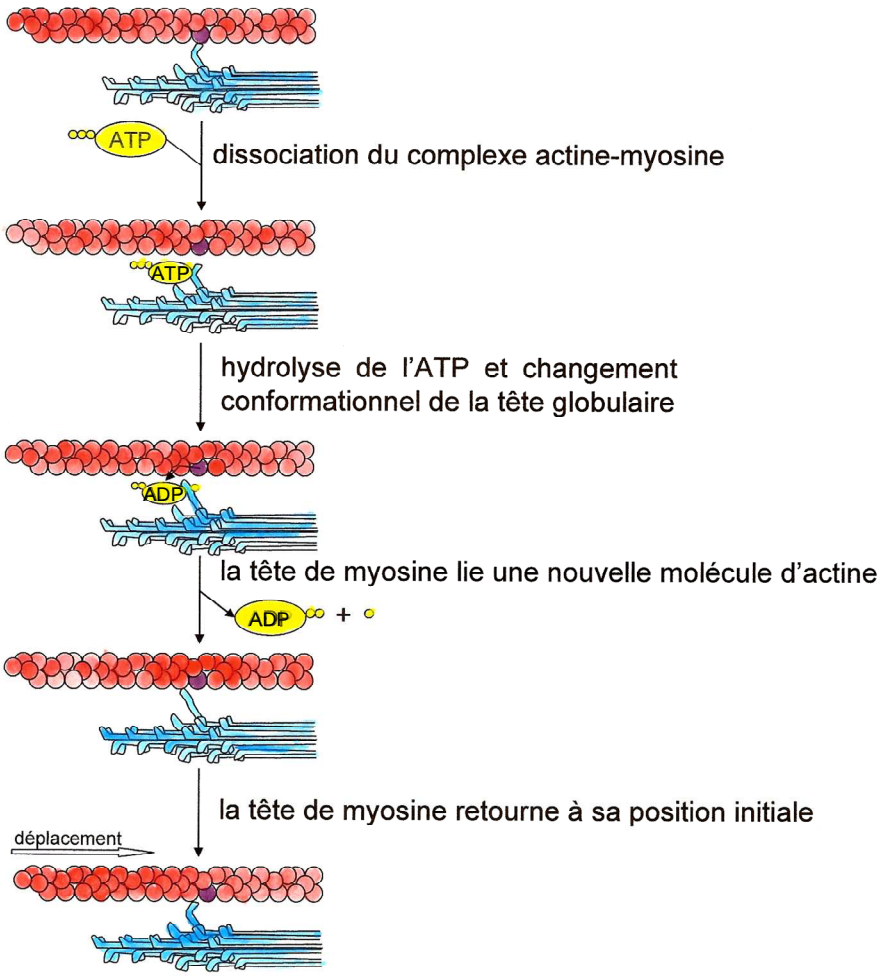

Figure 32 : Modèle d'action de la myosine, d'après Cooper *(2000).* La liaison de l'ATP à la molécule de myosine entraîne la dissociation du complexe actine-myosine. L'hydrolyse de l'ATP induit un changement conformationnel qui permet le déplacement de la tête globulaire. La myosine se lie alors à une nouvelle molécule d'actine et libère l'ADP et un phosphate inorganique. Le retour de la tête de myosine à sa position initiale entraîne le glissement du filament d'actine.

2. La migration cellulaire

La migration cellulaire est un processus fondamental impliqué aussi bien dans les mécanismes physiologiques comme la morphogenèse, la défense immunitaire, la cicatrisation que dans les processus pathologiques tels que l'invasion tumorale et la formation de métastase. Elle peut être divisée en cinq étapes. Sur une matrice en 2D, la cellule forme, lors de la première étape une extension (lamellipode) à l'avant. La deuxième étape correspond à une adhésion à la matrice. Elle est suivie par une contraction du cytosquelette. La quatrième étape consiste en un détachement des adhésions à l'arrière de la cellule. Enfin, lors de la cinquième étape, les récepteurs

membranaires encore liés à la membrane sont recyclés à l'avant de la cellule [Sheetz *et al.*, 1999] (Figure 33). Dans un environnement en 3D, la polarisation de l'actine est initiée par différents stimuli chimiques comme des molécules impliquées dans le chimiotactisme ou mécaniques comme l'adhésion à la matrice extracellulaire. Ces stimuli engendrent lors de la première étape la formation de protrusions à l'avant de la cellule. Lors de la deuxième étape, les intégrines liées aux substrats s'agrègent, les adhésions focales se forment et la contraction du cytosquelette crée à l'avant de la cellule, une force qui est transmise à la matrice extracellulaire qui se déforme. Vers l'arrière de la cellule, le corps cellulaire s'étend grâce au cytosquelette cortical. La protéolyse locale permet le clivage des fibres de la matrice extracellulaire. Ce clivage permet, lors de la troisième étape, de créer des espaces suffisants pour que le noyau puisse glisser le long de la matrice extracellulaire remodelée [Wolf *et al.*, 2007]. La quatrième étape correspond à une contraction du cytosquelette dans l'intégralité de la cellule induisant une tension longitudinale. Lors de la dernière étape, l'adhésion à l'avant de la cellule étant plus importante qu'à l'arrière, la partie arrière de la cellule est traînée vers l'avant, laissant apparaître la matrice extracellulaire remodelée [Friedl et Wolf, 2009].

Que la cellule migre sur une matrice 2D ou en environnement 3D, le processus de migration implique une succession d'étapes d'adhésion et de dé-adhésion.

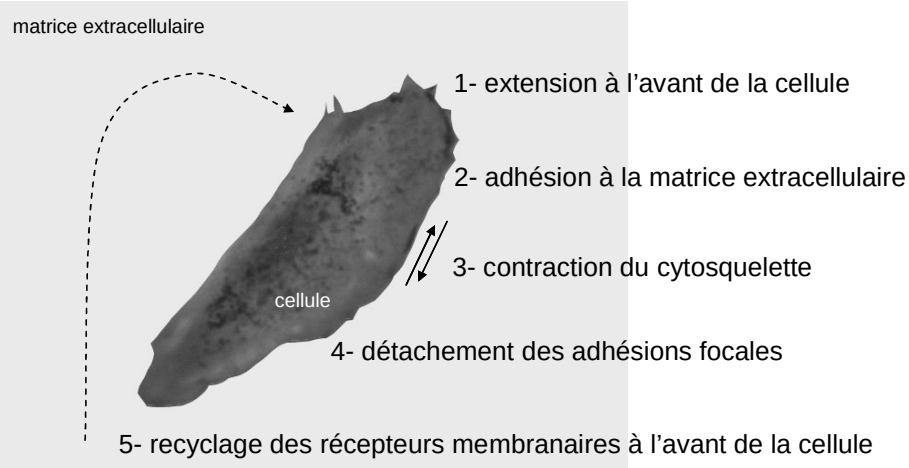

Figure 33 : Représentation schématique des différentes étapes de la migration cellulaire. La cellule prise en exemple est une cellule C2C12 en migration.

2.1. Assemblage et désassemblage des adhésions focales

Parmi les composants structuraux décrits dans la section 1.3 du chapitre 2, la vinculine, la taline, l'α-actinine et la FAK sont nécessaires à la formation et au turn-over des adhésions focales. Au cours des processus dynamiques biologiques, tels que l'adhésion et la migration, les sites d'attachement doivent s'assembler et se désassembler en réponse à l'environnement cellulaire.

2.1.1. Assemblage des adhésions focales

2.1.1.1. Le regroupement des intégrines

Suite à l'interaction avec les éléments de la matrice extracellulaire ou après la stimulation de facteurs de croissance, les intégrines se regroupent à la face ventrale de la cellule pour former des adhésions focales. Après l'initiation de l'adhésion, les différentes protéines cytoplasmiques s'associent avec la partie cytoplasmique des intégrines.

Le rôle du domaine cytoplasmique des intégrines dans la formation des adhésions focales a été plus particulièrement étudié sur les sous-unités β1 et β3 [Wayner et al., 1991]. Une délétion de la partie cytoplasmique du domaine β1 empêche le recrutement des intégrines au niveau de la plaque d'adhésion [Hayashi *et al.*, 1990 ; Solowska *et al.*, 1989]. La région cytoplasmique de la chaîne β contient les informations nécessaires et suffisantes pour la localisation des intégrines au niveau des adhésions focales [La Flamme *et al.*, 1992 ; Lukashev *et al.*, 1994]. Des délétions et des mutations au niveau du domaine cytoplasmique de la sous-unité ont permis la mise en évidence de trois séquences d'acides aminés, cyto-1, cyto-2 et cyto-3, responsables de la localisation des intégrines au niveau des adhésions focales [Reszha *et al.*, 1992].

2.1.1.2. L'association séquentielle des protéines de l'adhésion focale

L'association des protéines au niveau des adhésions focales est un processus ordonné. Un modèle hiérarchique a été proposé pour décrire la séquence de recrutement des protéines ainsi que les signaux de transduction au niveau des

adhésions focales [Miyamoto *et al.*, 1995] (Figure 34). L'agrégation d'intégrines stimule le recrutement de la FAK et de la tensine au niveau des adhésions focales. À la suite de cette association et après phosphorylation de la tyrosine de la FAK, vingt autres protéines s'accumulent. Ces molécules sont des membres de la famille de la kinase Src, RhoA, Rac1, la cortactine et des composants de la cascade de phosphorylation Ras/MAPK.

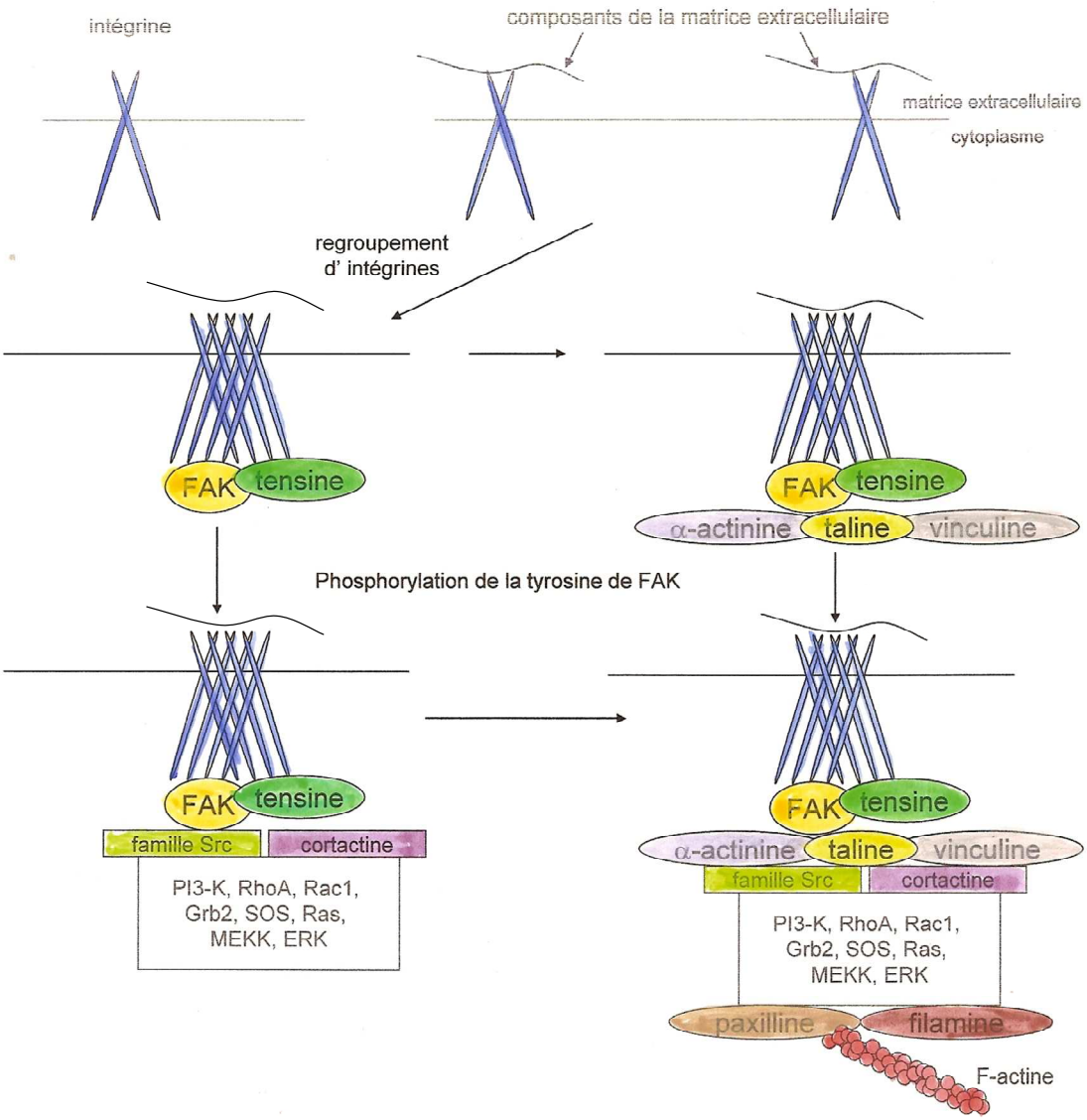

Figure 34 : Modèle hiérarchique de la séquence de recrutement des protéines au niveau des adhésions focales, d'après Petit et Thiery *(2000).* La première étape de la formation de l'adhésion focale est caractérisée par le regroupement d'intégrines liées aux constituants de la matrice extracellulaire. Ce regroupement entraîne le recrutement de la protéine FAK ainsi que de la tensine. À la suite de la phosphorylation de FAK, les autres protéines de l'adhésion focale viennent s'assembler.

2.1.1.3. Le rôle des Rho-GTPases dans la formation des adhésions focales

Les membres de la famille Rho sont les principaux régulateurs de la formation des adhésions focales ainsi que de l'organisation générale du cytosquelette [Hall, 1994]. Les Rho-GTPases se présentent sous forme inactive liée avec le GDP (*guanosine di-phosphate*) et sous forme active, liée avec le GTP (*guanosine tri-phosphate*). Ce cycle est régulé par GEF (*guanine nucleotide exchange factor*). Rho est impliqué dans la formation des fibres de stress et des adhésions focales [Hotchin et Hall, 1995 ; Ridley et Hall, 1992]. Au niveau des adhésions focales, Rho possède trois cibles principales (Figure 35). Il phosphoryle PIP5-K (*phosphatidylinosotol 4-phosphate 5-kinase*) [Chong *et al.*, 1994], les Rho-kinases (ROCKI et ROCKII) [Leung *et al.*, 1995] et m-Dia1 (homologue chez les mammifères du gène *Diaphanous 1* de la drosophile). Les Rho-kinases phosphorylent MBS (*myosin-binding subunit of myosin phosphatase*) et MLC (*myosin light chain*) [Kimura *et al.*, 1996 ; Amano *et al.*, 1996]. La phosphorylation de ces protéines entraîne l'association de la myosine II avec l'actine F. L'activation de m-Dia1 et de PIP5-K par phosphorylation par Rho catalyse la polymérisation d'actine et régule son dynamisme. L'utilisation de stratégies antisens oligodésoxyribonucléotides dirigés contre m-Dia1 montre que ce dernier est nécessaire à la migration orientée des cellules. Il est impliqué dans l'alignement des fibres de stress et dans la polarisation de la cellule ; il induit le turn-over des adhésions focales *via* le recrutement de Src ainsi que la phosphorylation de Cas (induite par Src lors de l'adhésion) [Yamana *et al.*, 2006].

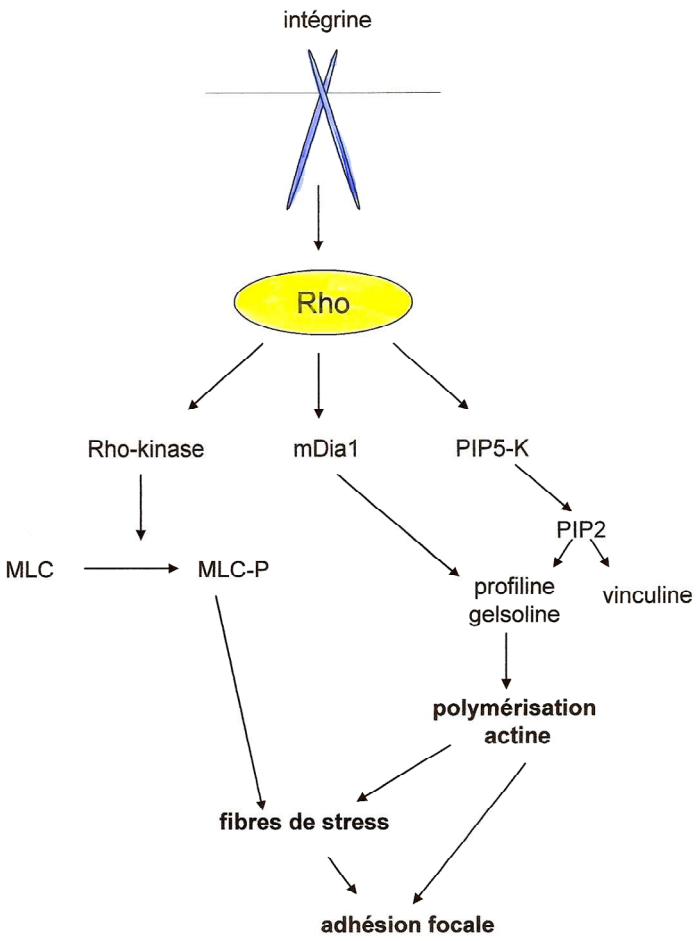

Figure 35 : Représentation schématique du rôle de Rho dans l'assemblage des fibres de stress et des adhésions focales, d'après Petit et Thiery *(2000).* Rho régule la formation des fibres de stress ainsi que celle des adhésions focales par la phosphorylation de trois cibles : des Rho-kinases, m-Dia et PIP5-K.

2.1.2. Désassemblage des adhésions focales

Les mécanismes qui permettent le désassemblage des adhésions focales mettent en jeu une régulation coordonnée de processus physiques et mécaniques. Dans les fibroblastes en migration, une partie des intégrines ainsi que la membrane associée sont physiquement arrachées de la cellule et laissées sur la matrice [Chen, 1981 ; Palecek *et al.*, 1996 ; Regen et Horwitz, 1992]. Les intégrines restantes se dispersent sur la membrane plasmique ou se regroupent à nouveau pour former une nouvelle adhésion focale [Palecek *et al.*, 1996 ; Regen et Horwitz, 1992].

Certains facteurs extracellulaires possèdent des propriétés antiadhésives. La thrombospondine et la ténascine (glycoprotéines extracellulaires) ainsi que SPARC

(protéine secrétée, acide, et riche en cystéine) stimulent le désassemblage des fibres de stress et des adhésions focales, stimulant ainsi la migration [Murphy-Ullrich *et al.*, 1991 ; Murphy-Ullrich *et al.*, 1996].

Les facteurs de croissance sont eux aussi impliqués dans le processus de dissociation des adhésions focales ; ils stimulent ainsi la migration. EGF est impliqué dans le désassemblage des plaques d'adhésion, la diminution des forces adhésives et l'augmentation de la migration [Xie *et al.*, 1998].

Rho stimule la formation des adhésions focales [Cf. Ch.2 *2.1.1.3*] ; inversement, son inactivation par phosphorylation du résidu sérine 188 par PKA [Lang *et al.*, 1996] participe à leur désassemblage.

2.2. Le dynamisme de l'actine

Pour migrer, les cellules réarrangent de manière dynamique leur cytosquelette d'actine formant ainsi des structures protrusives et générant des forces intracellulaires. Ce processus nécessite la formation de nouveaux sites d'adhésion à l'avant ainsi que la rétraction de l'arrière de la cellule. Le déplacement implique une transition de la cellule d'un stade non-polarisé à un stade polarisé. Les cellules polarisées en migration forment des protrusions dans la direction de la translocation. Lors de la migration, le cytosquelette forme deux structures principales : des lamellipodes et des filopodes.

2.2.1. Les lamellipodes

La membrane à l'avant de la cellule en migration se présente sous forme d'un front de migration dont le dynamisme est assuré par l'assemblage des filaments d'actine. Cette structure particulière, le lamellipode, est une fine (épaisseur : 0,1 à 0,2 µm) protrusion à l'avant de la cellule, constituée d'un réseau de ramification d'actine [Ridley *et al.*, 2003]. Les filaments d'actine sont arrangés en réseau orthogonal, leurs terminaisons barbées étant orientées vers la membrane [Small *et al.*, 1978 ; Small, 1981].

Le complexe Arp2/3 est impliqué dans l'architecture des lamellipodes (Figure 36). Rac (membre de la famille de Rho GTPase) intervient aussi dans la formation de cette structure. En effet, une inhibition de Rac (dominant-négatif) dans les fibroblastes inhibe la migration [Jones *et al.*, 1998] ainsi que la formation de lamellipodes [Ridley *et al.*, 1992].

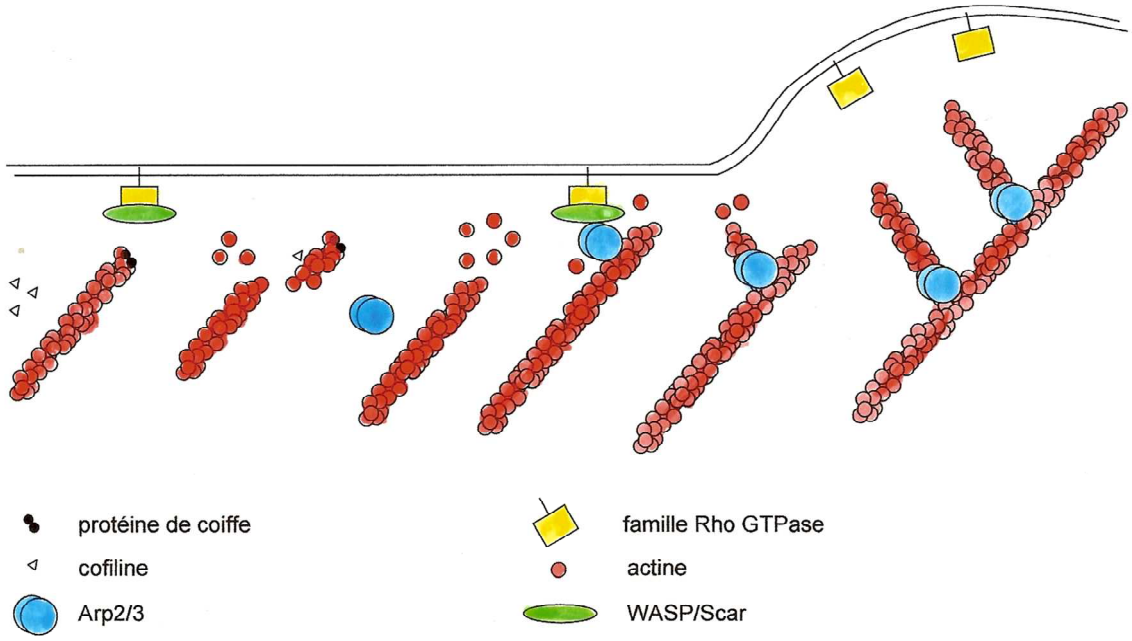

Figure 36 : Représentation schématique du rôle du complexe Arp2/3, des facteurs stimulant la nucléation, de la famille des Rho GTPases et de la cofiline dans la nucléation et l'organisation des filaments d'acine F lors de la formation d'un lamellipode, d'après Welch et Mullins *(2002).*

2.2.2. Les filopodes

Les filopodes sont des structures fines (largeur : 0,1 à 0,3 µm), constituées de paquets de filaments serrés et parallèles d'actine F. Les filopodes sont souvent présents en bordure d'un lamellipode, à l'avant de la cellule [Lewis et Bridgman, 1992 ; Svitkina *et al.*, 2003]. En plus de leur rôle certain dans la migration cellulaire, les filopodes sont impliqués dans un nombre important de processus cellulaires tels que la cicatrisation, la réponse au chimiotactisme, le développement embryonnaire [Faix et Rottner, 2006 ; Gupton et Gertler, 2007]. La formation de ces structures ainsi que leur rétraction sont le résultat d'une balance dynamique entre la

polymérisation de l'actine du côté « barbé » dans la partie terminale du filament et d'un flux rétrograde des filaments d'actine [Mallavarapu et Mitchison, 1999]. Deux modèles de formation des filopodes ont été décrits. Dans le premier modèle les filaments d'actine du filopode dériveraient du réseau d'actine au niveau du front distal d'un lamellipode [Svitkina *et al.*, 2003] (Figure 37) alors que dans le deuxième modèle, les filaments d'actine seraient formés à la base du filopode par une intervention de la formine (protéine de nucléation) [Schirenbeck *et al.*, 2006].

De manière générale, ils ont été décrits comme les « antennes » des cellules servant à tester leur microenvironnement. Dans le processus de migration, les filopodes sont liés au sens directionnel du déplacement cellulaire. Les molécules d'intégrines sont nombreuses à leur extrémité. Leur rôle est de tester la matrice dans la phase précoce d'adhésion et de migration [Galbraith et al, 2007]. Lors de l'adhésion, et par extension lors de la migration, les intégrines, au niveau des filopodes, forment les sites initiaux de fixation. Ce processus est suivi par le recrutement des autres protéines constituant les adhésions focales [Partridge et Marcantonio, 2006].

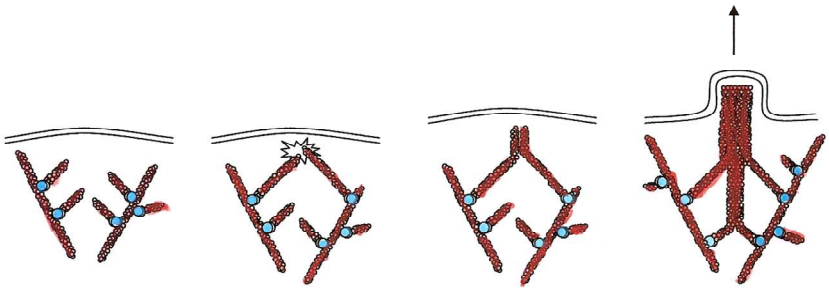

Figure 37 : Représentation schématique de la naissance d'un filopode à l'extrémité d'un lamellipode, d'après Svitkina *(2003).* Arp2/3 forme le réseau de filaments d'actine du lamellipode. L'élongation de certaines extrémités barbées est inhibée par des protéines de coiffe ; d'autres extrémités peuvent continuer de grandir. Certains filaments entrent en contact. Au point de contact, les filaments d'actine changent de direction et créent un réseau parallèle. L'élongation se poursuit, permettant la formation d'un filopode à l'extrémité d'un lamellipode.

3. Implication des calpaïnes ubiquitaires dans la migration cellulaire

L'inhibition pharmacologique des calpaïnes induit une diminution de la migration cellulaire [Dedieu et al., 2004 ; Huttenlocher *et al.*, 1997 ; Palecek *et al.*, 1998]. Cette inhibition entraîne une stabilisation des adhésions focales réduisant ainsi la vitesse de détachement à l'arrière de la cellule ainsi que la vitesse de migration. Ces résultats soulignent l'implication des calpaïnes dans le processus de migration cellulaire (Figure 38).

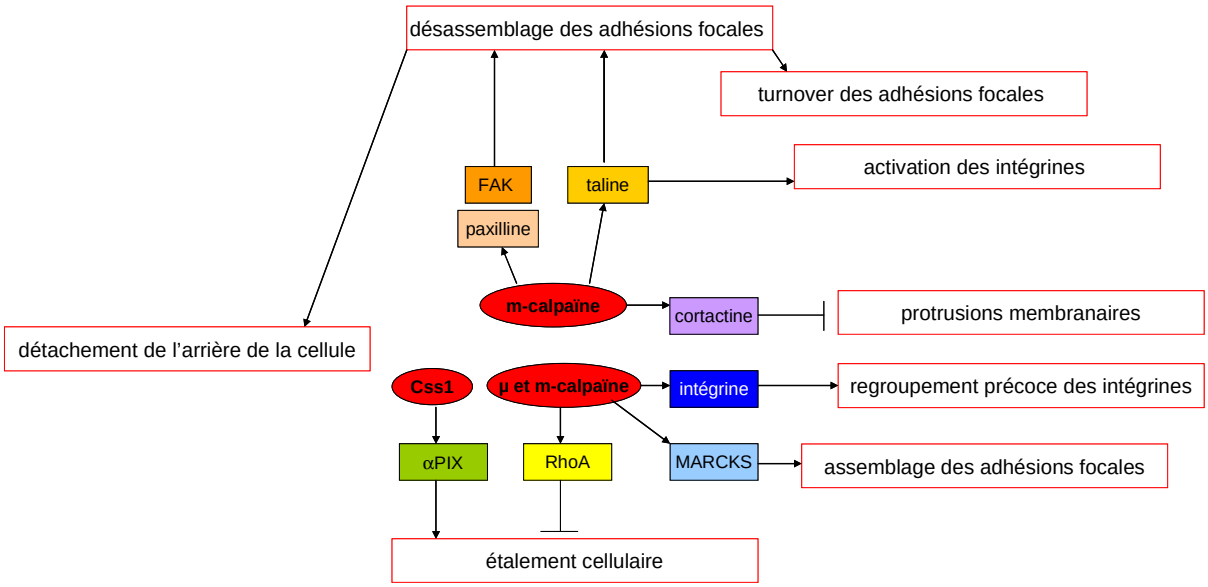

Figure 38 : Implication des calpaïnes ubiquitaires dans les différentes étapes du processus de migration, d'après Franco et Huttenlocher *(2005).* La m-calpaïne peut cliver des protéines constituant les adhésions focales telles que la FAK, la paxilline ou encore la taline. Ces clivages stimulent l'activation des intégrines, le turnover des adhésions focales et le détachement de l'arrière de la cellule. La protéolyse de la cortactine (protéine régulatrice de l'actine) induit une inhibition des protrusions membranaires. Le clivage au niveau des intégrines entraîne une stimulation de leur assemblage au niveau des futures adhésions focales. La protéolyse de la GTPase RhoA régule de manière négative l'étalement cellulaire. Inversement, l'interaction entre la petite sous-unité des calpaïnes, Css1, avec αPIX stimule l'étalement de la cellule. La protéolyse de MARKS stimule aussi la migration cellulaire.

3.1. Implication des calpaïnes dans la formation des adhésions focales

La protéolyse de la taline 1 par les calpaïnes permet l'adhésion de cette dernière à la sous-unité β des intégrines induisant ainsi l'activation des intégrines [Calderwood, 2004a ; Yan *et al.*, 2001]. La protéolyse de MARCKS par les calpaïnes est aussi impliquée dans la formation des adhésions focales. En effet, l'inhibition des calpaïnes dans des myoblastes, induit un défaut de formation d'adhésions focales ainsi qu'une accumulation de MARCKS [Dedieu *et al.*, 2003]. Cependant, l'implication des calpaïnes dans l'adhésion est fonction du type cellulaire.

3.2. Implication des calpaïnes dans l'étalement cellulaire

L'étalement de la cellule sur la matrice extracellulaire met en jeu une réorganisation dynamique du cytosquelette d'actine en réponse à la liaison des intégrines. L'implication des calpaïnes dans ce processus est dépendante du type cellulaire. En effet, l'inhibition de la μ-calpaïne dans les plaquettes induit une diminution de la protéolyse des protéines au niveau des adhésions focales et empêche l'étalement cellulaire [Croce *et al.*, 1999]. Dans les myoblastes de souris, la transfection d'oligonucléotides antisens dirigés contre la μ-calpaïne et la m-calpaïne inhibent l'étalement cellulaire [Mazères *et al.*, 2006]. De même, dans les fibroblastes, l'inhibition de la m-calpaïne induit une diminution de l'étalement cellulaire ainsi qu'une inhibition du réarrangement cytosquelettique [Potter *et al.*, 1998] alors qu'elle induit, dans les neutrophiles, une augmentation de l'étalement cellulaire. Dans les cellules endothéliales bovines (BAE), la surexpression de la μ-calpaïne induit une augmentation de l'étalement cellulaire et son inhibition entraîne une perte pour les cellules de la capacité à s'étaler [Kulkarni *et al.*, 1999]. Cependant, dans le même type cellulaire, la μ-calpaïne peut protéolyser RhoA générant ainsi un dominant négatif qui inhibe l'étalement cellulaire [Kulkarni et al., 2002]. La petite sous-unité régulatrice Css1, quant à elle, est aussi impliquée dans l'étalement

cellulaire de par son interaction avec αPIX (facteur d'échange de nucléotide guanine), régulateur de Rac) [Rosenberger *et al.*, 2005].

3.3. Implication des calpaïnes dans la formation des protrusions membranaires

Les calpaïnes sont impliquées dans les mécanismes conduisant à la formation de protrusions membranaires. L'inhibition de leur activité entraîne la formation de lamellipodes et de filopodes anormaux [Potter *et al.*, 1998]. Les fibroblastes embryonnaires de souris *css1* $^{-/-}$ présentent une morphologie altérée avec de fines projections membranaires [Dourdin *et al.*, 2001]. La m-calpaïne semble être l'isoforme impliquée dans la mise en place des protrusions puisque son inhibition permet de retrouver la morphologie des fibroblastes de souris *css1* $^{-/-}$. A l'inverse, dans les fibroblastes présentant une cortactine calpaïne-résistante, les nombreuses protrusions membranaires transitoires formées, altèrent la capacité migratoire des cellules [Perrin *et al.*, 2006]. En effet, après clivage par la m-calpaïne, la cortactine, protéine régulatrice de l'actine, limite la formation de protrusions membranaires.

3.4. Implication des calpaïnes dans la dissociation des adhésions focales

Les calpaïnes peuvent cliver de nombreuses protéines constituant les adhésions focales et leur inhibition entraîne la formation de larges complexes focaux ainsi qu'un défaut de dé-adhésion de la cellule. Elles sont impliquées dans le processus de désassemblage des adhésions focales. En effet l'inhibition des calpaïnes entraîne un arrêt du turnover cytosquelettique conduisant à une inhibition du processus de dé-adhésion [Bhatt *et al.*, 2002]. L'inhibition de la m-calpaïne (par ARN interférant) diminue la vitesse de dissociation des adhésions focales et entraîne la formation de larges complexes focaux de même que l'expression d'un mutant taline résistant à la protéolyse par les calpaïnes [Franco *et al.*, 2004]. Ainsi, la protéolyse de la taline par la m-calpaïne régule-t-elle le turnover de l'adhésion.

La migration est une des étapes clefs de la dissémination métastatique. L'implication dans les différentes étapes de la migration des calpaïnes ubiquitaires, font de ces dernières et de leurs substrats un sujet d'étude de choix dans le but de déterminer des cibles thérapeutiques visant à enrayer la progression tumorale.

Ainsi, le processus de migration cellulaire est-il complexe. Il fait intervenir la matrice extracellulaire, des récepteurs à cette matrice, de type intégrine ou non-intégrine, des complexes d'adhésion, liés à ces récepteurs et fixé à ces complexes, le cytosquelette d'actine. Tous ces éléments interagissent afin de permettre la motilité cellulaire. Parmi les protéines qui régulent ce processus, la µ-calpaïne et la m-calpaïne interviennent au niveau aussi bien de la formation des adhésions, permettant l'ancrage de la cellule à la matrice extracellulaire, que dans l'étalement cellulaire, la formation de protrusions membranaires ou encore dans la dissociation des adhésions, permettant la libération de l'arrière de la cellule. Ces différentes étapes sont dérégulées dans les cellules tumorales ; cette dérégulation pouvant mener à la dissémination métastatique.

CHAPITRE 3 : L'INVASION TUMORALE ET LA DISSEMINATION METASTATIQUE

Il n'y a que deux façons de vaincre le cancer : aimer et continuer à sourire quoi qu'il advienne. Alice Parizeau.

Dans l'organisme sain, les cellules constituant les différents tissus naissent et meurent de façon à maintenir la forme, l'architecture et les fonctions propres à chaque organe ou système ; la prolifération des cellules est régulée par leurs voisines, pour maintenir l'harmonie de l'ensemble. Les cellules cancéreuses brisent cette harmonie en plusieurs étapes. Au stade hyperplasique, ces cellules ont une apparence normale mais présentent un défaut de régulation de la prolifération. Elles se multiplient de manière excessive par rapport à celle de tissus normaux. Suit le stade dysplasique caractérisé par des cellules présentant des anomalies de forme et d'orientation. Ces deux stades sont qualifiés de stades précancéreux puisqu'ils précédent la formation d'une tumeur. Cette tumeur peut se développer uniquement localement sans franchir les limites (membrane basale) séparant le tissu auquel elles appartiennent des autres. Ce dernier état caractérise un cancer *in situ*. La tumeur peut s'étendre aux tissus voisins et ainsi créer un cancer invasif. Certaines cellules peuvent migrer par voie sanguine et lymphatique pour former des tumeurs secondaires à distance. Le cancer est alors qualifié de cancer métastatique.

L'invasion, définie par la capacité des cellules tumorales à infiltrer les tissus avoisinants ainsi que le processus de métastase, défini par la capacité des cellules cancéreuses à migrer, à s'implanter dans un site distant puis à proliférer, sont caractéristiques des tumeurs malignes. La dissémination métastatique comporte donc plusieurs étapes : une perte d'adhésion des cellules au niveau de la tumeur primaire, une invasion pour traverser la lame basale et rejoindre la circulation sanguine ou lymphatique, un transport dans l'organisme, une seconde étape d'invasion afin d'atteindre le tissu où aura lieu la formation de la tumeur secondaire (Figure 39).

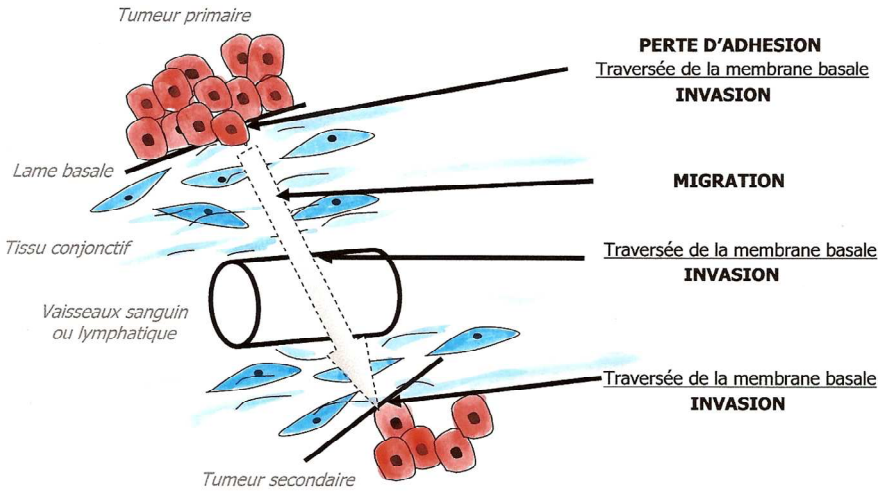

Figure 39 : Représentation schématique des différentes étapes de la dissémination métastatique. Après perte de l'adhérence, les cellules métastatiques traversent la membrane basale, migrent à travers le tissu conjonctif, atteignent les vaisseaux sanguins ou lymphatiques pour être véhiculées vers le lieu de formation de la tumeur secondaire.

1. Les structures impliquées dans l'invasion et la dissémination métastatique

L'invasion et la dissémination métastatique mettent en jeu des structures cellulaires particulières : les podosomes et les invadopodes (Figure 40).

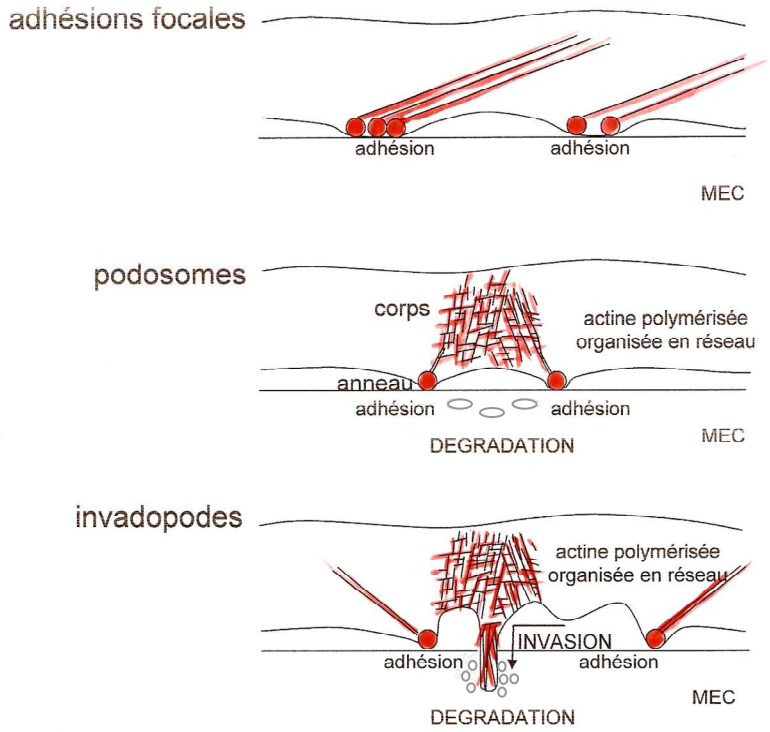

Figure 40 : Représentation schématique des différentes structures d'adhésion entre la cellule et la matrice extracellulaire (MEC), d'après Gimona *et al.* *(2005).* Au niveau des adhésions focales, les filaments d'actine s'ancrent au niveau des amas d'intégrines permettant le contact avec la matrice extracellulaire. Les podosomes et les invadopodes sont caractérisés par une importante activité de polymérisation de l'actine et par la présence d'un corps de réseau d'actine, entouré par un anneau de structures adhésives. Au niveau des podosomes, le contact avec la matrice extracellulaire et accompagné de sa dégradation ponctuelle. Au niveau des invadopodes, la dégradation de la matrice extracellulaire permet l'invasion cellulaire.

1.1. Les podosomes

Les podosomes sont des protrusions membranaires dynamiques [Gavazzi *et al.*, 1989], localisées à l'interface entre la cellule et la matrice extracellulaire. Ils sont constitués d'un corps d'actine F entouré d'un anneau riche en vinculine et taline ; leur diamètre est d'environ 0,5 µm. Le corps du podosome a un diamètre d'environ 0,3 µm et une hauteur de 0,5 µm [Gavazzi *et al.*, 1989 ; Destaing *et al.*, 2003].

Un nombre important de molécules a été mis en évidence au niveau des podosomes. Ces protéines sont des protéines du cytosquelette et des protéines régulatrices, des kinases, des intégrines et des Rho-GTPases. La plupart de ces molécules sont localisées soit au niveau du corps soit au niveau de l'anneau du podosome (Tableau

2). Cependant, les intégrines présentent une localisation spécifique selon les isoformes. La chaîne β1 est localisée au niveau du corps [Marchisio *et al.*, 1988] alors que les chaînes β2 et β3 sont localisées préférentiellement au niveau de l'anneau [Marchisio *et al.*, 1988 ; Zambonin-Zallone *et al.*, 1989 ; Duong et Rodan, 2000].

Tableau 2 : Molécules présentes au niveau des podosomes et leur localisation, d'après Linder et Aepfelbacher *(2003).*

	Localisation
F-actine	corps
protéines régulatrices de l'actine	
CDC42	corps
WASp/N-WASP	corps
Arp2/3	corps
protéines associée à l'actine	
α-actinine	corps + anneau
cortactine	corps
gelsoline	corps + anneau
intégrines	
β1, β2, β3, α_Mβ2, α_Vβ3	corps + anneau
protéines associées aux intégrines	
paxilline	anneau
taline	anneau
vinculine	anneau
kinases	
Src	autour du podosome
PI3K	anneau
Pyk2 (tyrosine kinase)	anneau
Phosphotyrosines	corps + anneau
protéines associées aux filaments intermédiaires	
fimbrine	corps
vimentine	corps
métalloprotéases	
MT1-MMP, MMP9	corps
protéines motrices	
dynamine 2	corps
myosine	corps + anneau

La plupart des composants de l'anneau des podosomes sont aussi présents au niveau des adhésions focales. Cet anneau protéique forme un complexe permettant la liaison entre les intégrines, l'actine et les molécules associées à l'actine au niveau du corps (Figure 41).

Les podosomes sont des structures présentes au niveau des cellules devant traverser les membranes basales. Ils sont notamment présents dans les macrophages [Linder *et al.*, 1999], les ostéoclastes [Destaing *et al.*, 2003] et les cellules dendritiques [Burns *et al.*, 2001]. Ce sont des sites de dégradation de la matrice extracellulaire [Chen *et al.*, 1984 ; Mizutani *et al.*, 2002]. La dégradation de la matrice extracellulaire est due à la présence de métalloprotéases telles que MT1-MMP [Sato *et al.*, 1997] et MMP-9 [Delaissé *et al.*, 2000], localisées au niveau de ces structures.

Les podosomes seraient impliquées dans l'adhésion et la migration de par leur recrutement à l'avant de la cellule aux abords des protrusions membranaires. Ils permettraient de créer de nouveaux sites de contact, et d'ancrer ainsi l'avant de la cellule lors de sa translocation [Burns *et al.*, 2001]. Ils ont une demi-vie de 2 à 12 minutes [Chen *et al.*, 1984 ; Destaing *et al.*, 2003] et sont le plus souvent regroupés en amas. Leur mouvement semble résulter d'un assemblage à l'avant de la cellule et un désassemblage à l'arrière [Destaing *et al.*, 2003].

Les podosomes permettent la dégradation de la matrice extracellulaire et donc son remaniement (Figure 42).

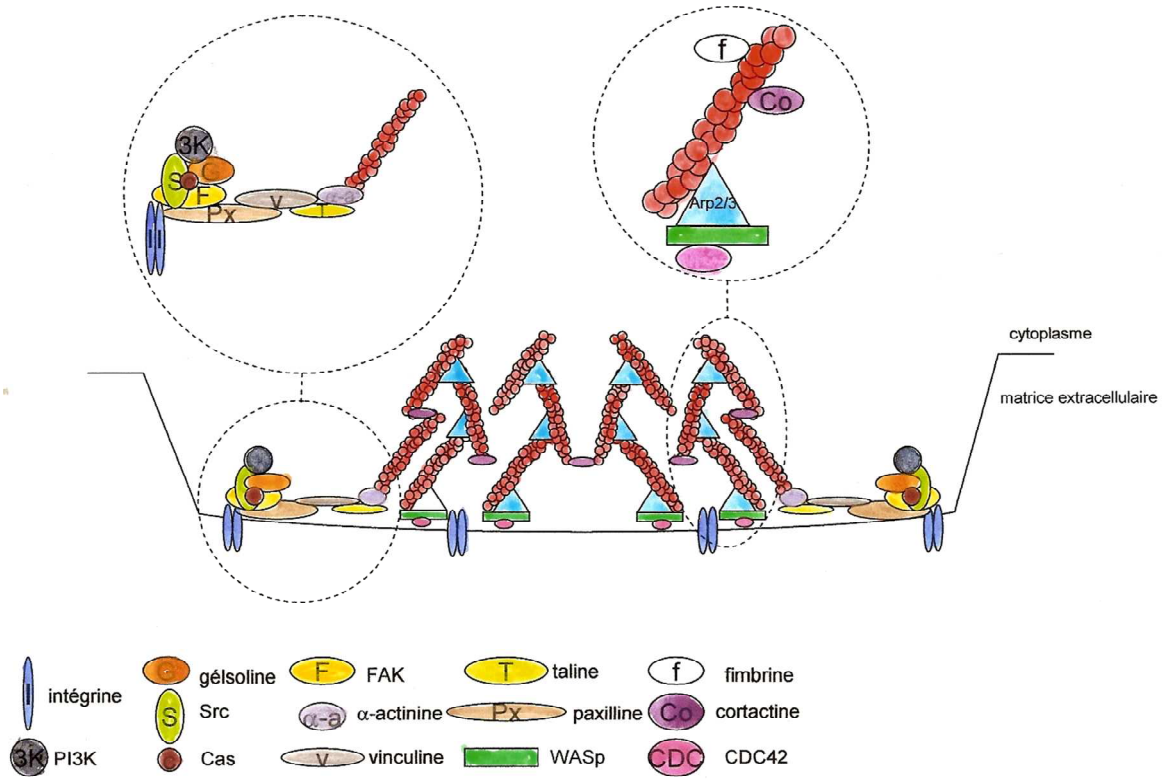

Figure 41 : Modèle de la structure d'un podosome, d'après Linder et Aepfelbacher *(2003).* Dans ce modèle, les intégrines assurent la liaison avec la matrice extracellulaire. La paxilline sert d'ancrage au complexe Src-FAK-gelsoline-PI3K-p130cas. Ce complexe est lié par la vinculine, la taline et l'α-actinine au corps de F-actine du podosome. Les filaments d'actine sont nucléés au niveau de la membrane *via* l'activation de WASp/N-WASp par CDC42 ainsi que par l'intermédiaire du complexe Arp2/3. Les filaments sont liés les uns aux autres par la cortactine et la fimbrine.

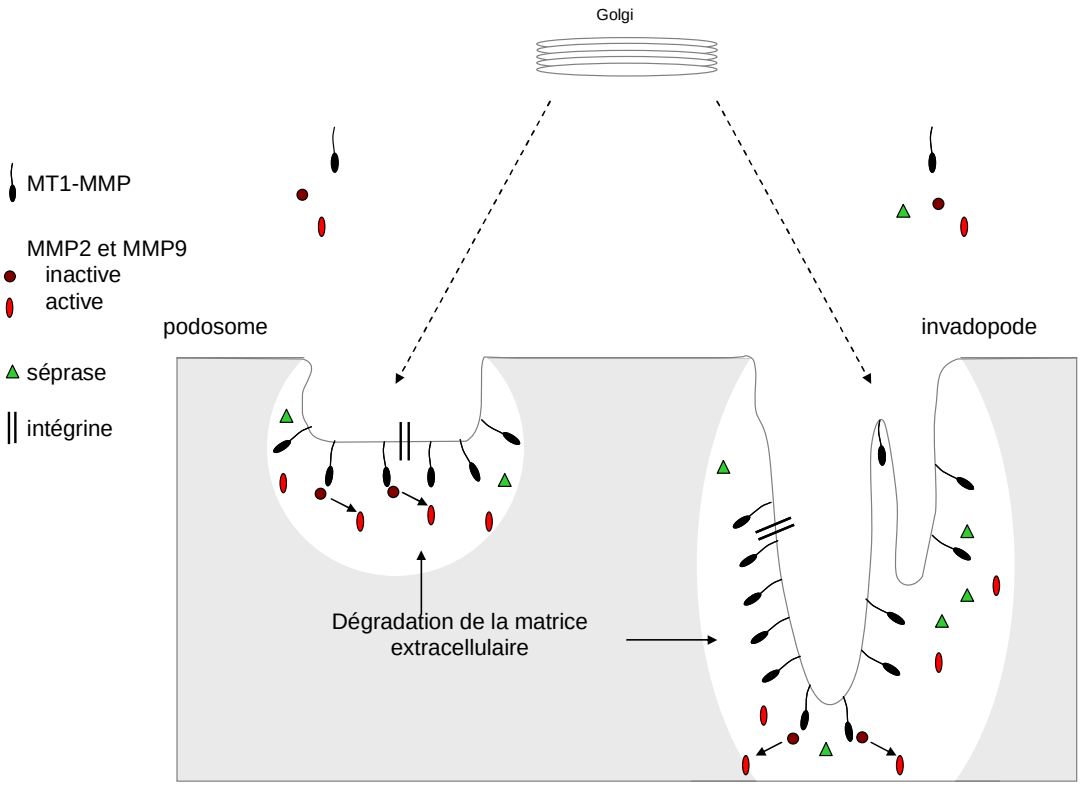

Figure 42 : Représentation schématique de la dégradation de la matrice extracellulaire au niveau d'un podosome et d'un invadopode, d'après Linder *(2007).* Les métalloprotéases (MT1-MMP et MMP2) ainsi que les séprases seraient transportées de l'appareil de golgi vers le point de contact entre la cellule et la matrice extracellulaire (podosome ou invadopode), dans des vésicules, le long des microtubules. Après insertion dans la membrane (MT1-MMP) ou sécrétion (MMP2 et séprase), les protéases dégradent la matrice extracellulaire.

1.2. Les invadopodes

1.2.1. Structure des invadopodes

Les invadopodes sont des protrusions membranaires riches en actine, Src, Arp2/3, N-WASP et en cortactine [Buccione *et al.*, 2004 ; Chen *et al.*, 1989 ; Clark *et al.*, 2007 ; Lorenz *et al.*, 2004]. Ils sont caractéristiques des cellules tumorales et transformées. Ils sont responsables de la protéolyse de la fibronectine, de la laminine, du collagène, constituants de la matrice extracellulaire [Chen, 1989 ; Kelly *et al.*, 1998]. Ces structures ont un diamètre de 0,1 à 0,8 µm et peuvent avoir une hauteur minimale de 2 µm [Mueller et Chen, 1991]. Les invadopodes actifs, dégradant la matrice extracellulaire, peuvent être mis en évidence par la colocalisation de phosphotyrosines et de la cortactine [Bowden *et al.*, 2006]. Les

invadopodes présentent quatre étapes distinctes de maturation : lors de la première étape, la cortactine s'accumule, seule, ponctuellement, au niveau de la membrane ventrale de la cellule ; la deuxième étape est caractérisée par le recrutement de la métalloprotéase MT1-MMP au niveau de ces sites. Lors de la troisième étape, des foyers de dégradation de la matrice apparaissent. La quatrième étape correspond à une dissociation de la cortactine ; seule MT1-MMP reste localisée au niveau des foyers de dégradation de la matrice [Artym *et al.*, 2006]. La demi-vie des invadopodes est plus longue que celle des podosomes puisqu'elle est d'environ 1 heure.

1.2.2. Régulation des invadopodes

1.2.2.1. Implication des intégrines dans la régulation des invadopodes

Les intégrines, se liant à la matrice extracellulaire, sont le point d'initiation de cascades de transduction du signal qui modulent l'organisation du cytosquelette. La FAK et les tyrosine-kinases de la famille des Src sont des médiateurs importants de cette signalisation au niveau des adhésions focales ainsi qu'au niveau des invadopodes. Les intégrines interviennent de plusieurs façons dans la régulation des invadopodes. Ainsi, l'intégrine $\alpha5\beta1$, localisée principalement en périphérie des invadopodes, stabilise la protrusion [Mueller *et al.*, 1999]. La stimulation de la sous-unité $\beta1$ ou $\beta6$ augmente l'activité des invadopodes ainsi que le pouvoir invasif des cellules comme l'ont montré Nakahara *et al.* sur le mélanome [Nakahara *et al.*, 1996]. De plus, l'activation de l'intégrine $\alpha5\beta1$ entraîne une augmentation de la phosphorylation de p190RhoGAP et participe à son recrutement au niveau des invadopodes [Nakahara et al., 1998]. Ainsi, la liaison de la chaîne $\beta1$ de la molécule d'intégrine avec la matrice extracellulaire serait-elle un stimulus important dans l'initiation de la formation de ces structures. De plus, l'inhibition de la chaîne $\beta1$ supprime l'adhésion, la migration et l'invasion de cellules de gliome [Rooprai *et al.*, 1999].

1.2.2.2. Implication des protéines kinases dans la régulation des invadopodes

Les cellules traitées avec des inhibiteurs de tyrosine kinase présentent un déficit dans la formation d'invadopodes, engendrant une inhibition de la dégradation de la matrice extracellulaire. De même, la transfection de kinases Src actives ou inactives induit respectivement une augmentation ou une diminution de la dégradation matricielle [Bowden *et al.*, 2006 ; Hauck *et al.*, 2002]. L'activité constitutive de Src stimule la formation d'invadopodes, dans les fibroblastes (qui de manière naturelle, ne présentent pas d'invadopode), ainsi que dans les cellules de cancer du sein [Artym *et al.*, 2006 ; Chen, 1989 ; Chen *et al.*, 1984 ; Chen *et al.*, 1985]. Cette stimulation entraîne dans les cellules de cancer du sein une augmentation du nombre d'invadopodes de 4 à 7 fois par rapport aux témoins ainsi qu'une augmentation de la dégradation de la matrice extracellulaire [Artym *et al.*, 2006].

PKD (protéines kinases D) est une famille de sérine/thréonine kinases ubiquitaires, impliquées dans de nombreuses fonctions telles que l'exocytose, la régulation de la morphologie, l'adhésion et la motilité cellulaire [Rykx *et al.*, 2003 ; Wang 2006]. PKD est impliquée dans l'activité des invadopodes. Elle se lie au niveau des sites de dégradation de la matrice extracellulaire, avec la paxilline et la cortactine [Bowden *et al.*, 1999] ; son rôle dans le fonctionnement des invadopodes reste à éclaircir. Les sérine/thréonine kinases ERK1/2 participent, elle-aussi, à la biogenèse des invadopodes. Les protéines ERK sont activées par divers stimulus dont les facteurs de croissance *via* des récepteurs tyrosine kinases [Kolch, 2005]. Le rôle de la protéine ERK dans la formation de ces structures reste à clarifier. Cependant, elle serait activée par la petite GTPase ARF6. Cette activation entraînerait la phosphorylation de la cortactine.

1.2.2.3. Implication des petites GTPases dans la régulation des invadopodes

Les GTPases Rho, Rac, Cdc42 sont impliquées dans la polarité, la migration et l'invasion cellulaire ainsi que dans la formation de métastases [Hall, 2005]. Ces protéines passent cycliquement de la forme inactive (liée à une molécule de GDP) à une forme active (liée à une molécule de GTP), cette conversion étant régulée par des protéines telles que les GEFs et les GAPs (*GTPase-activating proteins*). Plus particulièrement, Cdc42 et Rac régulent la formation des invadopodes. L'inhibition de

Cdc42 (par ARN interférant ou transfection de mutants inactifs) entraîne une inhibition de la formation d'invadopodes [Yamaguchi *et al.*, 2005]. De plus, l'inhibition de Cdc42 et Rac entraîne un défaut de dégradation de la matrice extracellulaire [Nakahara *et al.*, 2003]. Au contraire, l'inhibition de Rho n'altère pas la dégradation. Rho serait impliqué de manière indirecte dans la formation des invadopodes : la phosphorylation de p190RhoGAP stimulerait la formation de protrusions membranaires nécessaire à la formation des invadopodes [Nakahara *et al.*, 1996], [Cf. Ch.3 *1.2.2.1*].

1.2.2.4. Implication de la cortactine dans la régulation des invadopodes

Les cancers du sein, de la tête et de la nuque sont caractérisés par une surexpression de la cortactine. Cette surexpression est corrélée avec la capacité invasive de la tumeur et est associée à un mauvais pronostic [Daly, 2004]. Le domaine SH3 de la cortactine peut se lier avec plusieurs protéines dont N-WASP, ce qui permettrait le recrutement de la cortactine au niveau des invadopodes. Ensemble, la cortactine et N-WASP activent le complexe Arp2/3, créant ainsi des sites de nucléation pour la synthèse de nouveaux filaments d'actine F. La cortactine lie simultanément l'actine F et le complexe Arp2/3 et stabilise ainsi le réseau d'actine F. Ce processus stabilise donc les structures d'actine existantes et permet l'assemblage de nouveaux réseaux [Weaver *et al.*, 2001]. Ce rôle de la cortactine augmente la stabilité des lamellipodes et stimule la migration dirigée [Bryce *et al.*, 2005]. Ce rôle de stabilisation des protrusions membranaires pourrait être similaire lors de la formation d'invadopodes.

2. Les acteurs protéiques de l'invasion et de la dissémination métastatique

2.1. Les métalloprotéases

Plusieurs MMP et sérines protéases sont associées aux invadopodes et sont impliquées dans la dégradation de la matrice par les cellules tumorales.

Les MMP constituent une large famille de protéases impliquées dans la dégradation protéique de nombreuses molécules de la matrice extracellulaire mais aussi de protéines non matricielles. La famille des MMP est composée de plus de 20 endopeptidases, dénommées par un nom descriptif ou par un numéro. Les spectres protéolytiques des différentes MMP sont larges et se recouvrent, permettant ainsi la dégradation de l'ensemble des composants de la matrice extracellulaire. Toutes les MMP sont constituées d'au moins trois domaines : un pré-domaine, impliqué dans leur acheminement intracellulaire jusqu'à la surface cellulaire, un pro-domaine et un domaine catalytique. Le pré-domaine est rapidement éliminé après la sécrétion et est absent de la forme enzymatique active. Le pro-domaine (environ 80 acides aminés), constitué d'une séquence peptidique comprenant un résidu cystéine qui interagit avec le site catalytique, maintient l'activité enzymatique latente [Becker *et al.*, 1995 ; Van Wart et Birkedal-Hansen, 1990]. Le domaine catalytique (environ 170 acides aminés) contient un atome de zinc maintenu par trois résidus histidine au fond d'une structure peptidique tridimensionnelle en forme de poche. Le résidu cystéine du pro-domaine agit comme le quatrième ligand de l'ion métallique. Le clivage protéolytique du pro-domaine, libérant l'atome de zinc, entraîne l'activation du site catalytique qui peut alors se lier à son substrat. Ce clivage se fait soit dans le milieu extracellulaire, soit à la surface cellulaire, soit dans le cytoplasme. La plupart des MMP possède un quatrième domaine en position carboxy-terminale. Cette chaîne est un homologue de l'hémopexine (environ 210 acides aminés) et intervient dans la reconnaissance du substrat des MMP. Elle est rattachée au domaine catalytique par une région riche en proline. Ce domaine est nécessaire pour que les collagénases puissent cliver le collagène interstitiel [Bode, 1995] ; pour les autres

substrats, le domaine catalytique seul conserve l'activité protéolytique [Clark et Cawston, 1989].

Les MMP peuvent être classées en six groupes : les matrilysines (MMP7 et MMP26), les collagénases interstitielles (MMP1, MMP8, MMP13 et MMP18), les stromélysines (MMP3, MMP10, MMP11 et MMP27), les gélatinases (MMP2 et MMP9), les métalloprotéases de type membranaire (MMP14, MMP15, MMP16, MMP17, MMP24 et MMP25 ou de MT1-MMP à MT6-MMP) et un dernier groupe composé de sept membres [Nagase et Woessner, 1999]. Les MMP2 et MMP9 possèdent trois séquences peptidiques répétitives analogues aux motifs de la fibronectine de type II, insérée au niveau du domaine catalytique. Cette répétition permet une interaction avec le collagène ou la gélatine [Allan *et al.*, 1995 ; Steffensen *et al.*, 2002].

L'activité des MMP dans l'espace extracellulaire dépend de la balance entre leur activation et leur inhibition. Quatre inhibiteurs endogènes (21-30 kDa) ont été identifiés : TIMP-1 (*tissue inhibitors of matrix metalloproteinases*) à TIMP-4 [Gomez *et al.*, 1997]. Les TIMP forment un complexe (ration 1/1) avec les MMP actives. Dans ces complexes, le domaine N-terminal des TIMP (autour du pont disulfure entre Cys^1 et Cys^{70}) se lie au domaine catalytique des MMP et bloque ainsi l'accès à la structure en poche contenant l'atome de zinc [Bode *et al.*, 1999].

Les MMP jouent un rôle dans la progression cancéreuse. Les MMP3 et MMP7 sont impliquées dans la perte d'adhésion par la digestion de la cadhérine E. Cette lyse entraîne une perte d'adhérence intercellulaire [Crawford *et al.*, 1999 ; Lochter *et al.*, 1997]. Ces protéases sont aussi impliquées dans l'invasion locale. Les gélatinases (MMP2 et MMP9), ont une activité protéolytique dirigée contre les protéines de la membrane basale [Cf. Ch.2 *1.1.2*] ; la MMP1 et la MT1-MMP digèrent le collagène interstitiel. Les MMP sont aussi impliquées dans les autres processus de la progression tumorale tels que la prolifération des cellules tumorales ou l'angiogenèse.

2.2. Les sérine-protéases

La séprase ainsi que son homologue DPP4 sont deux sérine-peptidases impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire. DPP4 est exprimée ubiquitairement dans les cellules épithéliales et endothéliales [Chen et Kelly, 2003].

La séprase (*surface expressed protase* ; 170 kDa) est exprimée spécifiquement à la surface des invadopodes des cellules de mélanomes et du cancer du poumon [Aoyama et Chen, 1990 ; Chen *et al.*, 1994 ; Monsky *et al.*, 1994]. Son expression est corrélée avec le pouvoir invasif des cellules cancéreuses [Pineiro-Sanchez *et al.*, 1997]. La forme active de la séprase est un homodimère de deux sous-unités de 97 kDa, glycosylées en N-terminal. Le monomère de séprase possède 5 sites potentiels de glycosylation, 13 résidus cystéine, 3 segments correspondant au domaine catalytique des sérine-protéases, un segment transmembranaire hydrophobe et une petite queue cytoplasmique [Chen et Kelly, 2003].

DPP4 (110 kDa) est active sous forme d'homodimère [Pineiro-Sanchez *et al.*, 1997]. Elle présente 6 acides-aminés cytoplasmiques très conservés, une région transmembranaire hydrophobe de 22 acides-aminés et un domaine extracellulaire de 738 résidus aminés. Ce dernier domaine peut être divisé en trois régions : une région amino-terminale glycosylée comprenant sept sites de glycosylation, une région riche en cystéine et une région carboxy-terminale composée de 260 acides aminés et contenant la triade catalytique (Ser^{624}, Asp^{709}, His^{741}, chez l'homme) [Ogata *et al.*, 1989]. DPP4 serait impliquée dans la dégradation du collagène [Bermpohl *et al.*, 1998].

La séprase et DPP4 lient les sous-unités $\beta 1$ des intégrines, de manière collagène-dépendante [Mueller *et al.*, 1999]. Cette association stimule la dégradation du collagène, de la matrice extracellulaire, à l'avant des invadopodes [Artym *et al.*, 2002]. L'inhibition de la sous-unité $\beta 1$ des intégrines empêche le recrutement de la séprase au niveau des invadopodes ainsi qu'une perte de l'activité protéasique permettant la dégradation de la matrice extracellulaire.

2.3. La protéine FAK

La FAK est un des composants des adhésions focales [Cf. Ch.2 *1.3.2.2*] dont le rôle évolue, lors de l'invasion tumorale. Dans de nombreux cancers humains (poumon, colon, prostate, ovaire, sein), son expression ou sa phosphorylation sont augmentées, ce qui entraîne une augmentation de son activité enzymatique [Hsia *et al.*, 2003 ; Kahana *et al.*, 2002 ; Owens *et al.*, 1995]. Ces modifications sont corrélées avec une augmentation du pouvoir invasif cellulaire, faisant de la protéine FAK un marqueur du potentiel invasif et métastatique [Cance *et al.*, 2000 ; Kornberg, 1998]. Comme décrit précédemment, FAK joue un rôle important dans la dynamique du cytosquelette lors de la migration. Elle est responsable de la dissociation des contacts focaux et donc stimule leur turnover ; sa surexpression dans les cancers a pour conséquence d'augmenter la vitesse de migration cellulaire. De même, elle stimule l'activité de Ras ; l'augmentation de son activité enzymatique caractéristique de nombreux cancers entraîne aussi une stimulation du processus de migration [Burridge et Wennerberg, 2004 ; Tilghman et Parsons, 2008]. De plus, FAK intervient aussi dans le processus d'invasion puisqu'elle stimule l'expression et la sécrétion de MMP9 ainsi que l'activation de MMP2 [Hsia *et al.*, 2003], ce qui a pour conséquence d'augmenter la dégradation de la matrice extracellulaire. Au niveau des invadopodes, FAK se lie avec Src et p130-Cas. Ce complexe interagit avec la protéine Dock 180 (*guanine-nucletide exchange factor*), permettant ainsi la stimulation de la petite protéine G, Rac. Rac active à son tour la protéine JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) qui permettrait la stimulation par Jun de l'expression de MMP2 et MMP9 (Figure 43).

Comme FAK intervient dans la stimulation de la migration ainsi que dans l'invasion des cellules tumorales, sa surexpression dans une population cellulaire est associée à un phénotype tumoral agressif (Figure 44).

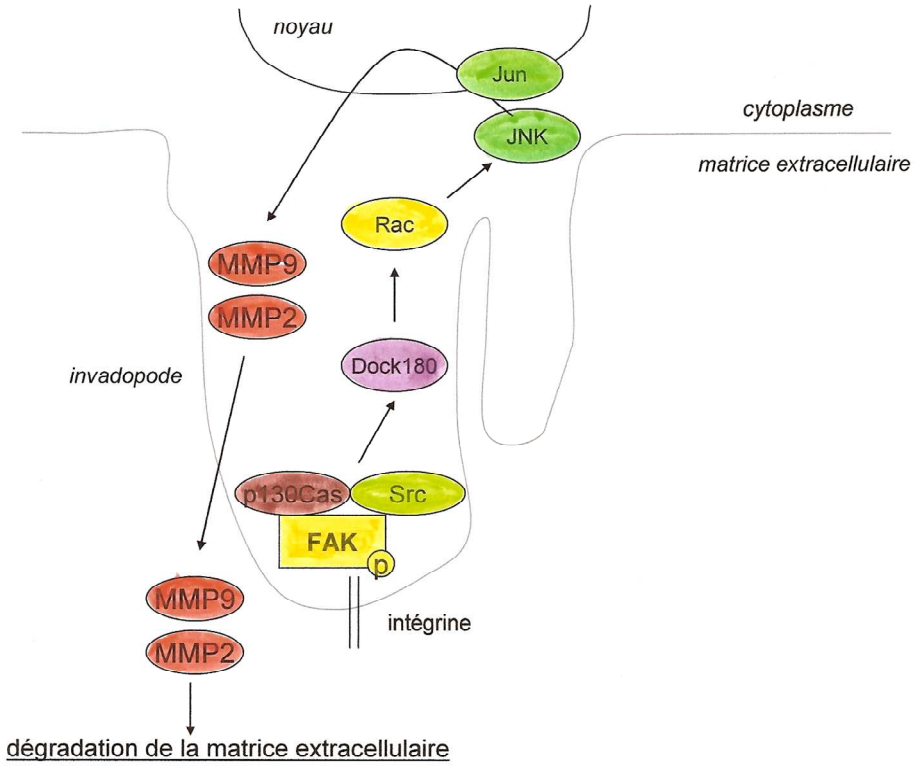

Figure 43 : Représentation schématique de l'implication de la protéine FAK dans la promotion du phénotype invasif, d'après Schlaepfer *et al.* *(2004).* Le complexe FAK-Src-p130Cas stimule l'activation de Rac par Dock180. Une fois activée, Rac active la protéine JNK permettant ainsi l'expression, régulée par le facteur de transcription Jun, des métalloprotéases MMP2 et MMP9. Cette stimulation de l'expression de MMP2 et MMP9 entraîne la dégradation de la matrice extracellulaire.

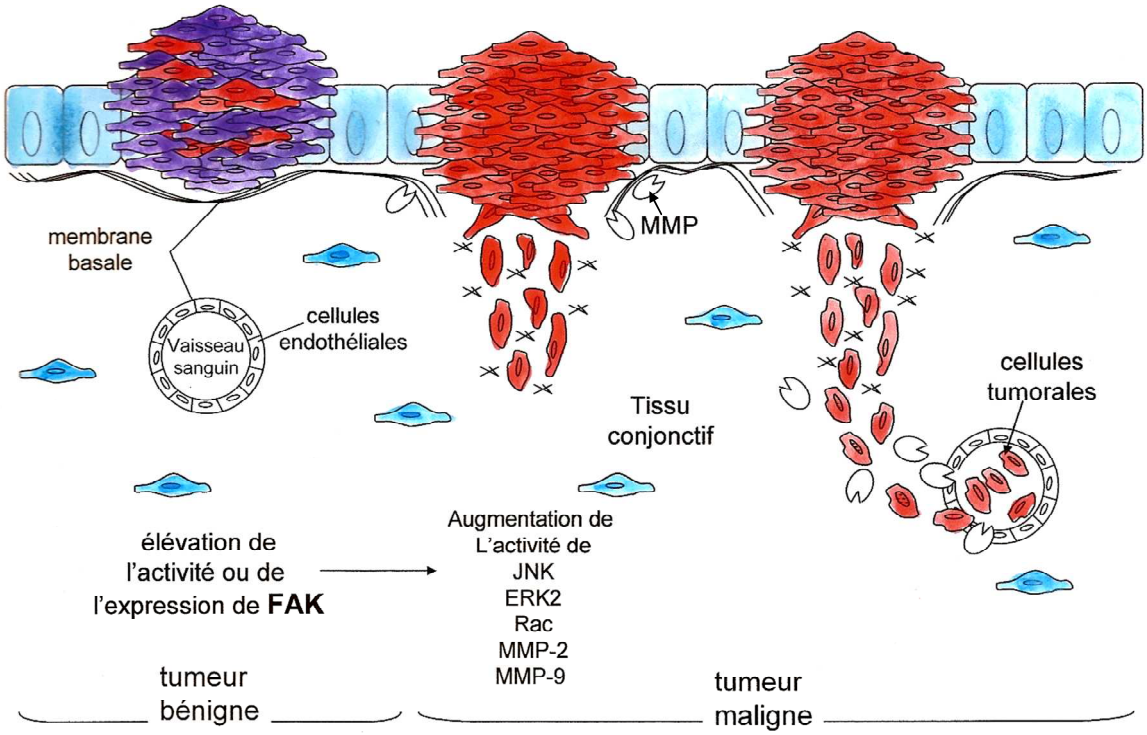

Figure 44 : Représentation schématique du rôle de FAK dans la progression de la tumeur maligne, Schlaepfer *et al.* (*2004).* Le passage d'une tumeur du stade pré-invasif au stade invasif est souvent accompagné d'une élévation de l'expression de FAK. Cette élévation de l'expression entraîne une élévation de la sécrétion de métalloprotéases (MMP-2 et MMP-9). La surexpression entraîne aussi l'activation de JNK, ERK2, Rac. FAK stimule la migration et l'invasion ; sa surexpression est donc associée à un phénotype tumoral agressif.

2.4. Les calpaïnes

De nombreuses cellules de cancers métastatiques présentent une surexpression des calpaïnes, comparées aux cellules de cancers non-métastatiques [Carragher *et al.*, 2003].

2.4.1. FAK et la m-calpaïne

Les interactions entre les cellules tumorales et la matrice extracellulaire influencent le développement des tumeurs. La fibronectine [Cf. Ch.2 *1.1.1.3*] régule de nombreux processus cellulaires tels que la migration et l'invasion [Sawai *et al.*, 2005 ; Shibata *et al.*, 1998]. La fibronectine, se liant à la molécule d'intégrine, active la protéine FAK par l'induction de la phosphorylation des résidus tyrosine 397, 861 et

925. De plus, l'inhibition de FAK (par ARN interférant), entraîne une diminution importante de la migration et de l'invasion induites par la fibronectine. L'activation de FAK joue donc un rôle important dans la signalisation induite par la fibronectine. Cette voie de signalisation fait aussi intervenir les protéines Src, ERK1/2, PI3K, Akt et JNK. L'inhibition de ERK1/2 entraîne une diminution de l'expression de la métalloprotéase MMP-9 ainsi que de la m-calpaïne. La protéine FAK stimule donc la migration et l'invasion des cellules tumorales *via* la régulation de l'expression de MMP-9 et de la m-calpaïne par ERK1/2. En plus de cette régulation, FAK stimule aussi ces processus de migration et d'invasion *via* la régulation de MMP-9 et RhoA par PI3K [Meng *et al.*, 2009]. La m-calpaïne intervient donc dans la voie de signalisation de FAK induite par la fibronectine, entraînant la migration et l'invasion des cellules tumorales (Figure 45).

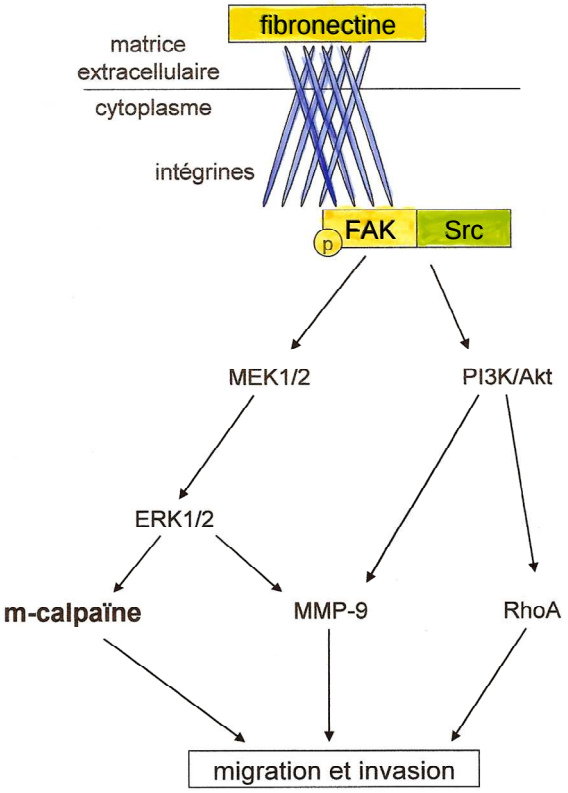

Figure 45 : Implication de la m-calpaïne dans la voie de signalisation induite par la liaison des intégrines avec la fibronectine, d'après Meng *et al.* (*2009).* La fibronectine stimule la migration et l'invasion cellulaire par l'activation de FAK. FAK stimule l'expression de la m-calpaïne, de MMP-9 et de RhoA *via* les voies ERK1/2 et PI3K/Akt.

2.4.2. Caspase-8 et la m-calpaïne

La caspase-8 est une protéase pro-apoptotique. Elle inhibe la capacité métastatique des cellules tumorales en induisant la mort cellulaire [Cf. Ch.1 **1.3**] [Stupack et al., 2006]. Paradoxalement, elle peut aussi stimuler la prolifération [Gilot *et al.*, 2005 ; Lemmers et al., 2007 ; Lens et al., 2002 ; Salmena et Hakem, 2005] ainsi que la migration des cellules non-apoptotiques [Frisch, 2008 ; Helfer *et al.*, 2006 ; Senft *et al.*, 2007]. Cette stimulation de la migration est due à sa localisation à la périphérie cellulaire ainsi qu'à l'activation de petites GTPases et des calpaïnes [Frisch, 2008].
Au niveau des adhésions focales, la caspase-8 induit le clivage par la m-calpaïne de la taline produisant ainsi des fragments N-terminaux [Yan *et al.*, 2001]. Ce domaine contient une région pouvant lier l'intégrine : le domaine FERM. La liaison de ce domaine aux molécules d'intégrines stimule la liaison de ces molécules à leurs substrats, régulant ainsi la migration cellulaire [Calderwood, 2004b].
De plus, la m-calpaïne, la caspase-8 et la FAK s'associent, au niveau des plaques d'adhésion [Barbero *et al.*, 2009]. FAK jouerait un rôle dans la localisation en périphérie cellulaire de la caspase-8. À ce niveau, la caspase-8 se liant à la m-calpaïne empêche l'interaction de cette dernière avec son inhibiteur, la calpastatine et stimule ainsi l'activité protéasique, notamment envers la taline. Ainsi, la stimulation de la migration et de la capacité métastatique par la caspase-8 est-elle induite par la m-calpaïne [Barbero *et al.*, 2009] (Figure 46).

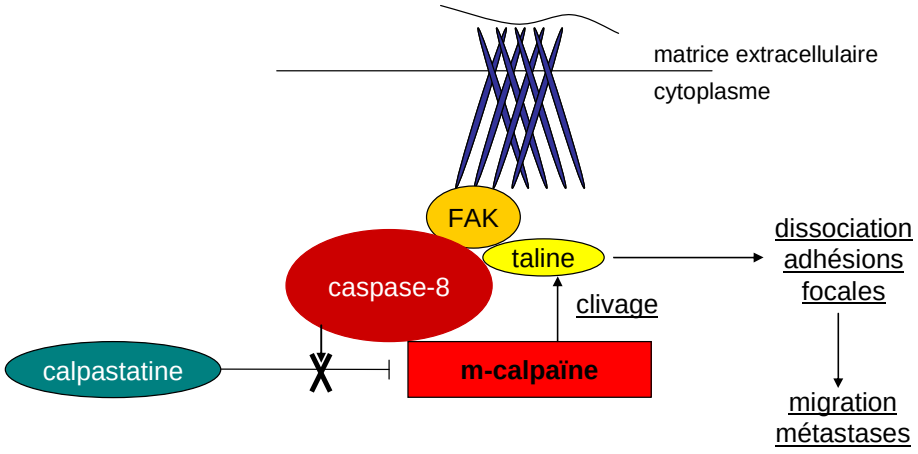

Figure 46 : Représentation schématique de l'implication de la m-calpaïne dans la migration et la capacité métastatique induite par la caspase-8. La FAK permet le recrutement de la caspase-8 au niveau des adhésions focales. La caspase-8 active la m-calpaïne en empêchant l'interaction entre la calpaïne et la calpastatine. La stimulation du clivage de la taline, conduisant à la dissociation des adhésions focales est effectuée par la m-calpaïne.

2.4.3. Implication de Capn4 dans l'invasion

Les cellules de carcinome hépatique présentent une augmentation de l'expression de Capn4 (petite sous-unité régulatrice des calpaïnes [Cf. Ch.1 *2.1.1.1.1*]). L'inhibition de Capn4 (par ARN antisens) entraîne une diminution du pouvoir invasif ainsi qu'une diminution de la migration des cellules tumorales en comparaison des cellules non-traitées [Bai *et al.*, 2009]. De plus, l'expression de Capn4 est corrélée avec le nombre de tumeurs, leur taille, leur pouvoir invasif ainsi qu'avec leur capacité métastatique. Ainsi, la petite sous-unité régulatrice des calpaïnes pourrait-elle être impliquée dans l'invasion tumorale et la dissémination métastatique et serait ainsi un indicateur du phénotype tumoral malin.

2.4.4. Implication des calpaïnes dans l'invasion tumorale via l'inhibition des facteurs suppresseurs de tumeur

NORE1A lie la protéine Ras de manière GTP-dépendante. Cette protéine est exprimée dans de nombreuses cellules mais son expression est absente dans les cellules tumorales [Van der Weyden et Adams, 2007]. La sous-expression de NORE1A dans les cellules tumorales peut-être due à une hyperméthylation au niveau

de son promoteur [Hesson *et al.*, 2003 ; Tommasi *et al.*, 2002]. Le rétablissement de son expression dans les cellules tumorales entraîne un arrêt de la prolifération cellulaire ainsi que le déclenchement du programme de mort cellulaire [Aoyama *et al.*, 2004 ; Moshnikova *et al.*, 2006]. De même, RASSF1A (*Ras-associated domain familly 1A*), dont la séquence présente 41% d'identité avec NORE1, lie la protéine Ras [Stieglitz *et al.*, 2008]. Cette protéine n'est pas exprimée dans les cellules tumorales du fait de l'hyperméthylation de son promoteur [Van der Weyden et Adams, 2007] et le rétablissement de son expression entraîne une inhibition de la prolifération ainsi que de l'invasion et stimule l'apoptose [Donninger *et al.*, 2007]. Bien que l'hyperméthylation des promoteurs de NORE1A et RASSF1A soit le principal mécanisme de régulation de ces deux protéines, il existe une autre régulation faisant intervenir un clivage de ces protéines. En effet, NORE1A et RASSF1A peuvent être clivés par les calpaïnes et devenir ainsi inactives [Kuznetsov et Khokhlatchev, 2009]. Les calpaïnes, en inactivant NORE1A et RASSF1A, stimulent la migration et l'invasion des cellules tumorales.

Elles clivent aussi d'autres suppresseurs de tumeur tels que p53 [Kubbutat et Vousden, 1997] [Cf. Ch.1 *2.3.2.2*], ou la Merlin/Schwannomin, protéine impliquée dans l'association du cytosquelette avec la membrane et dont la mutation entraîne le développement de la neurofibromatose de type 2 [Kimura *et al.*, 2000].

2.4.5. Implication des calpaïnes dans la perte d'adhésion intercellulaire : stimulation de l'invasion et de la formation de métastases.

Les Rho-GTPases, dont Cdc42, Rac et Rho, sont impliquées dans la régulation des jonctions adhérentes (adhésion cellule-cellule) [Braga et Yap, 2005]. Au niveau de ces jonctions adhérentes, la protéine Rac est régulée par Tiam1 (*Ras-specific guanine nucleotide exchange facteur*). L'activation de Rac par Tiam1 stimule les adhésions entre les cellules, diminue la migration et l'invasion cellulaire [Hordijk *et al.* 1997 ; Sander *et al.*, 1999]. Lors de la transition épithélio-mésenchymale [Cf. Ch.3 **3**] qui est associée à une augmentation de la migration cellulaire, de l'invasion et des métastases, la protéine Src phosphoryle la tyrosine 384 de la protéine Tiam1, localisée au niveau des jonctions adhérentes. Cette phosphorylation de Tiam1

entraîne l'activation de Grb2 [Cf. Ch.2 *1.3.2.2*] ainsi que le recrutement de MEK (kinase de ERK) qui peut ainsi activer la protéine ERK. Par cette cascade de phosphorylations impliquant la voie MEK/ERK, la protéine Src induit l'activation des calpaïnes qui clivent Tiam1 (Figure 47). Ce clivage inactivant Tiam1 stimule le désassemblage des jonctions adhérentes entraînant une stimulation de la migration, de l'invasion et des métastases.

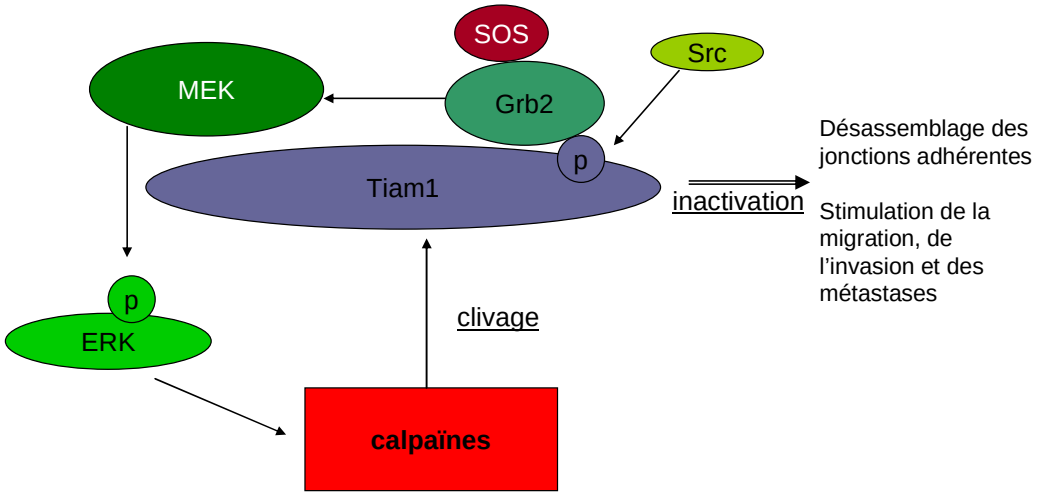

Figure 47 : Implication des calpaïnes dans la dissociation des adhésions focales, entraînant une stimulation de la migration, de l'invasion et de la formation des métastases, d'après Woodcock *et al.* *(2009).* La protéine Src phosphoryle la protéine Tiam1 (protéine régulatrice de Rac, impliquée dans la stabilisation des jonctions adhérentes). Cette phosphorylation entraîne l'activation de la voie MEK/ERK. ERK active ainsi l'activité protéasique des calpaïnes. La lyse de la protéine Tiam1 par les calpaïnes induit son inactivation, facilite le désassemblage des jonctions adhérentes, inhibant ainsi les adhésions entre cellules et permettant l'invasion tumorale et la dissémination métastatique.

3. La dissémination métastatique

Afin de se détacher de la tumeur primaire et envahir les tissus avoisinants, les cellules tumorales rompent les contacts cellule-cellule, remodèlent la matrice extracellulaire par la sécrétion de protéases et suivent les gradients chimio-attractifs. L'acquisition de ces processus mène à la dissémination métastatique. Lors de cette transition, les cellules non-mobiles, liées aux autres par des jonctions intercellulaires, se libèrent et adopte un phénotype mésenchymal, mobile et invasif. Cette transition est induite par des signaux intrinsèques tels que des mutations de gènes ou par des signaux extrinsèques dont la composition de la matrice extracellulaire elle-même ou

des facteurs de croissance. En effet, TGFβ (transforming growth factor) [Zavadil et Bottinger, 2005], HGF (*hepatocyte growth factor*) [Savagner *et al.*, 1997], EGF [Lo *et al.*, 2007], IGF (*insulin growth factor*) [Graham *et al.*, 2008], et FGF (*fibroblastic growth factor*) [Acevedo *et al.*, 2007] sont capables d'induire une telle transition.

La transition épithélio-mésenchymale (Figure 48) est caractérisée par l'acquisition par la cellule d'un phénotype mésenchymal au détriment de son phénotype initial épithélial. Ce processus est complexe ; ainsi, seules quelques étapes seront-elles détaillées.

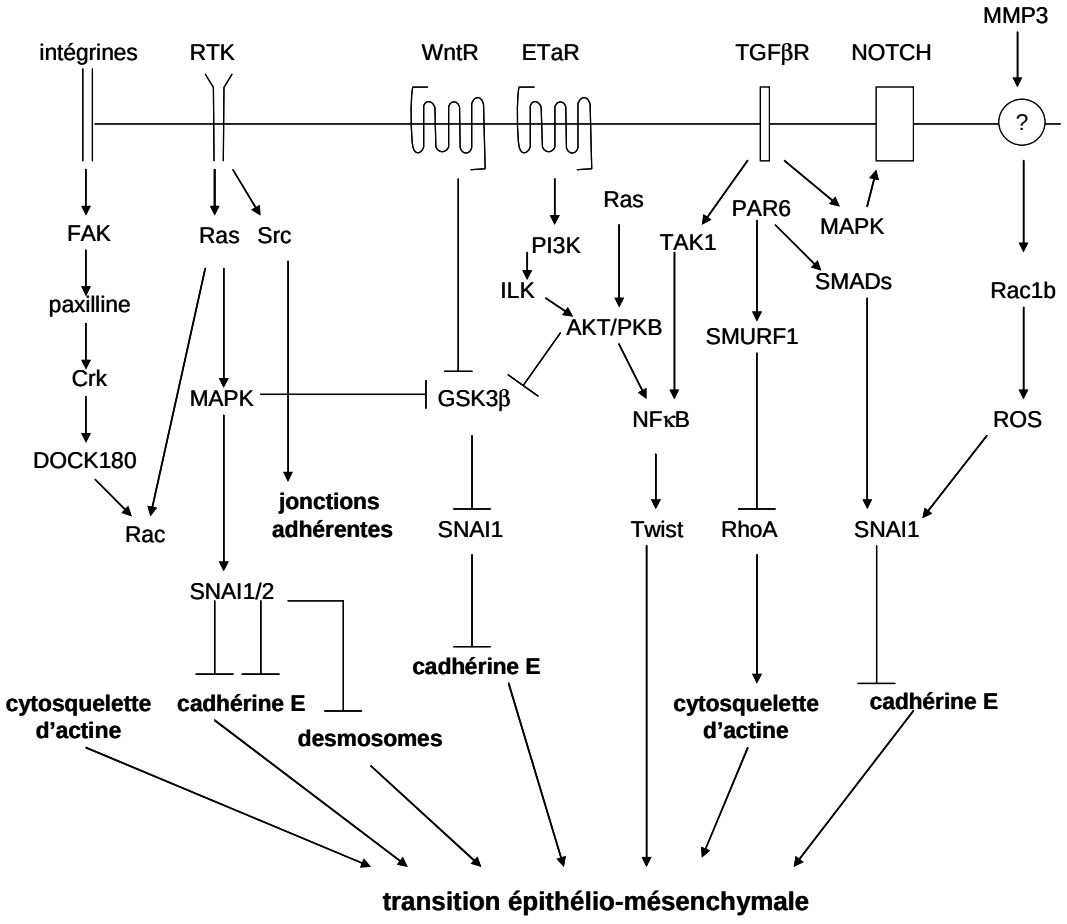

Figure 48 : Vue d'ensemble des interactions moléculaires impliquées dans la régulation de la transition épithélio-mésenchymale, d'après Thiery et Sleeman *(2006)*. La sélection de voies de signalisation activées lors de la transition épithélio-mésenchymale illustre la complexité de ce phénomène. ETaR : endothelin-A receptor ; GSK3β : glycogen-synthase kinase-3β ; ILK : interleukin-linked kinase ; PAR6 : partitioning-definitive protein-6 ; ROS : reactive oxygen species ; TAK1 : TGFβ-activated kinase-1 ; WntR : Wnt receptor.

3.1. Implication des adhésions intercellulaires dans la transition épithélio-mésenchymale

La formation d'un épithélium stable et polarisé nécessite des interactions entre les cellules ainsi que des interactions entre les cellules et la matrice. La cadhérine E est un des composants majeurs des jonctions adhérentes, permettant l'adhésion intercellulaire. Dans la cellule, cette glycoprotéine transmembranaire interagit de manière calcium-dépendante avec la E-cadhérine de la cellule voisine. Ces complexes d'adhésion sont liés du côté cytoplasmique au cytosquelette d'actine par l'intermédiaire de l'α- et de la β-caténine [Cavey *et al.*, 2008]. La p120-caténine se lie aussi au complexe ; elle est impliquée dans la stabilisation des adhésions, inhibant RhoA et activant Rac et Cdc42 [Wildenberg *et al.*, 2006] (Figure 49). Lors de la progression tumorale de cancers épithéliaux, l'expression de la cadhérine E est inhibée. Cette perte est précurseur de la formation de métastases [Perl *et al.*, 1998]. Durant la transition épithélio-mésenchymale, la perte de la cadhérine E entraîne la libération des protéines du complexe cytoplasmique ainsi que leur accumulation dans le cytoplasme. La β-caténine entre alors dans le noyau et, interagissant avec des facteurs de transcription, module l'expression de nombreux gènes impliqués dans la prolifération, la migration, l'invasion (MMP) et la morphogenèse [Arce *et al.*, 2006 ; Wong et Pignatelli, 2002]. La perte de l'expression de la cadhérine E est associée à une surexpression de la cadhérine N mésenchymale. Ce changement induit un changement dans le phénotype cellulaire d'épithélial à mésenchymal, provoquant ainsi une augmentation de la capacité migratoire et invasive de la cellule [Nieman *et al.*, 1999 ; Hulit *et al.*, 2007]. La cadhérine N peut interagir avec FGFR (*FGF receptor*) entraînant ainsi l'activation de la voie MAPK, l'augmentation de la capacité migratoire et de la capacité invasive *via* la stimulation de la sécrétion de MMP.

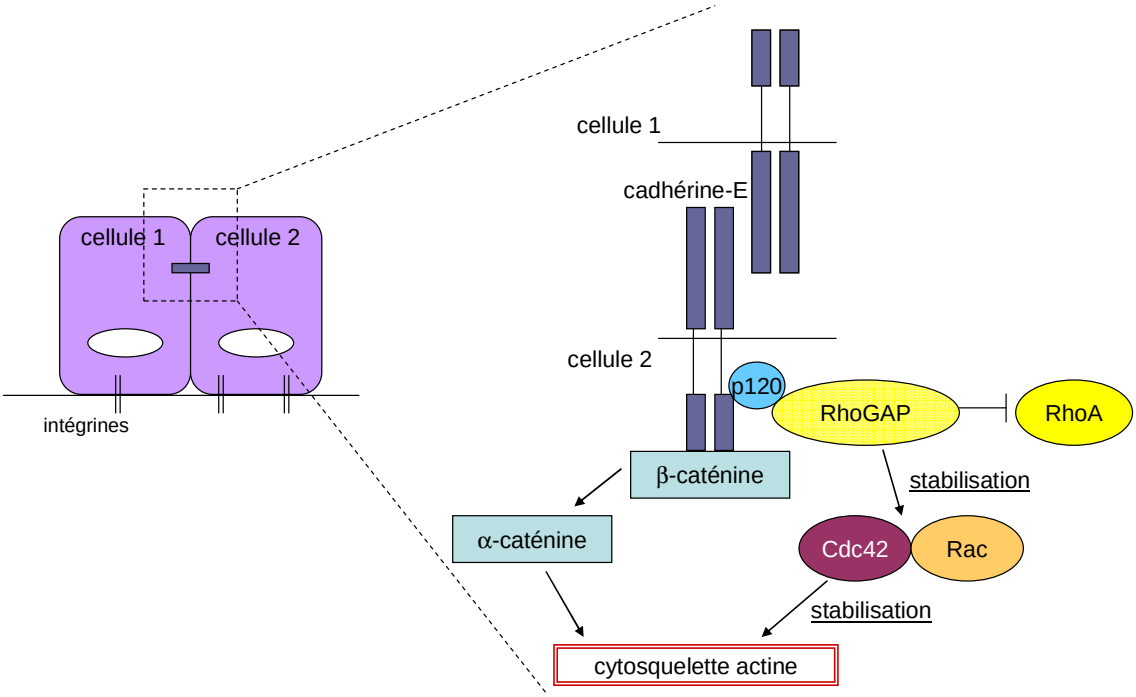

Figure 49 : Représentation schématique de l'adhésion intercellulaire, d'après Yilmaz et Christofori *(2009).* L'α- et la β-caténine permettent l'ancrage du cytosquelette d'actine avec les cadhérines E. La protéine p120 stabilise l'assemblage en inhibant RhoA et en activant Cdc42 et Rac.

3.2. Implication des intégrines dans la transition épithélio-mésenchymale

Les intégrines peuvent initier, stimuler la transition épithélio-mésenchymale et l'invasion cellulaire. En effet, la liaison des intégrines α1β1 et α2β1 avec le collagène de type I entraîne la perte de l'expression de la cadhérine E [Koenig *et al.*, 2006]. Cette liaison au collagène de type I induit aussi la surexpression de la cadhérine N [Shintani *et al.*, 2008]. Le répresseur de la transcription de la cadhérine E (*Snail1*) induit l'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta3$ qui possède des fonctions pro-invasives et qui est localisée au niveau du front invasif de la cellule tumorale [Haraguchi *et al.*, 2008 ; Sharma et Henderson, 2007]. La coopération entre la chaîne β1 de l'intégrine et la métalloprotéase MT1-MMP stimule la transition épithélio-mésenchymale et est nécessaire à l'invasion des cellules cancéreuses au travers d'une matrice de collagène [Cao *et al.*, 2008].

D'autres intégrines dont l'expression est augmentée lors de la transition épithélio-mésenchymale, telles que l'intégrine $\alpha_v\beta6$, induisent l'augmentation de l'expression

de protéases (MMP) ainsi que la libération et l'activation de TGFβ, conduisant à une stimulation de la progression tumorale et de l'invasion [Bates *et al.*, 2005 ; Araya *et al.*, 2006].

3.3. Implication des Rho-GTPases dans la transition épithélio-mésenchymale.

L'activation de la famille des Rho-GTPases (70 membres) est contrôlée par trois types de protéines régulatrices : les GEF (70 membres), les GAP (60 membres) et les GDI (*guanine dissociation inhibitor*, 3 membres). Les GEF permettent l'activation des Rho-GTPases en induisant l'échange du GDP lié à la protéine avec une molécule de GTP. Contrairement aux GEF, les protéines GAP entraînent l'inactivation des Rho-GTases en hydrolysant la GTP en GDP. Quant aux protéines GDI, elles lient les Rho-GDPases inactives et empêchent leur liaison avec leurs activateurs, GEF. Les Rho-GTPases activent des protéines effectrices qui sont souvent des sérine/thréonine kinases. La protéine Rac est impliquée dans la formation des lamellipodes et la protéine Cdc42, dans la formation des filopodes [Hall, 2005 ; Ridley, 2006]. De par leur implication dans le remaniement du cytosquelette d'actine [Cf. Ch.3 *1.2.2.3*] et de par leur implication dans la régulation de l'expression des MMP, les Rho-GTPases jouent un rôle important dans la transition épithélio-mésenchymale [Lozano *et al.*, 2003].

En fonction de la présence de cadhérines E (épithéliales) ou N (mésenchymales), la localisation et le rôle de p120-caténine diffèrent tout comme l'activité des Rho-GTPases. L'activation et l'inactivation de RhoA nécessite, le recrutement p120-caténine-dépendant des Rho-GEF ou des Rho-GAP. Le recrutement de Rho-GAP entraîne l'activation de Rac qui stabilise les jonctions entre les cellules ainsi que le cytosquelette d'actine [Anastasiadis, 2007]. Lors de la transition épithélio-mésenchymale, la p120-caténine cytoplasmique fonctionne comme une RhoA-GDI en liant et inactivant RhoA [Bellovin *et al.*, 2005]. Au niveau membranaire, la p120-caténine se lie aussi aux cadhérines N et active Rac induisant la formation de protrusions membranaires telle que les lamellipodes [Cf. Ch.2 *2.2.1*]. De ce fait, la

p120-caténine cytoplasmique ainsi que la forme membranaire coopèrent pour stimuler la motilité cellulaire et la formation de métastases.

3.4. Les différents modes de déplacement des cellules tumorales lors de la dissémination métastatique

Afin de migrer sur de longues distances, les cellules passent *via* une transition épithélio-mésenchymateuse, qui implique que les cellules perdent les fortes interactions jonctionnelles et deviennent individuellement polarisées [Montell, 2008]. Cette transition mène à un mode de migration cellulaire mésenchymateux (vitesse 0,1 à 2 µm/min [Painter, 2009]). Ce mode de déplacement est caractéristique de la dissémination métastatique. Ainsi, individuellement, les cellules migrent par une alternance d'assemblages et de désassemblages d'adhésions focales et dégradent la matrice extracellulaire par la production et la sécrétion de métalloprotéases et de sérines-protéases [Cf. Ch.3 ***2.1***]. Suite à ce remodelage, la matrice extracellulaire présente la trace du passage des cellules.

Durant le développement embryonnaire, la réponse immunitaire ou encore la dissémination métastatique, en vue de former des métastases [Christiansen et Rajasekaran, 2006 ; Friedl et Weigelin, 2008 ; Weijer, 2009], les cellules ayant un mode de déplacement mésenchymateux peuvent migrer en cohorte de manière collective jusqu'à leur destination. Cette capacité est souvent orchestrée par un signal collectif, qui nécessite que toutes les cellules soient sensibles aux informations de guidance et puissent les interpreter de manière individuelle. Une alternative à ce processus réside dans la compréhension du signal uniquement par quelques cellules qui communiquent aux autres membres du groupe l'information fournie par des sigaux chimiques ou mécaniques [Garcia et Parent, 2008 ; Goswami *et al.*, 2005]. Tout comme la migration mésenchymateuse isolée, les mouvements de cellules collectifs résultent de la polymérisation et de la contraction d'acto-myosine dans la cellule polarisée. Cependant il existe des différences entre les deux modes de migration. La migration collective diffère de la migration mésenchymateuse isolée dans la coordination simultanée de la polymérisation de plusieurs cellules à l'avant du front de migration, la translocation de cellules par des force physiques, l'activité

des lamellipodes de plusieurs cellules, le remodelage secondaire de la matrice extracellulaire le long de la voie de migration entrainant la formation de membrane basale ainsi qu'une rétraction coordonnée de cellules à l'arrière du groupe [Friedl et Gilmour, 2009].

Toutes les cellules cancéreuses ne subissent pas de transition épithélio-mésenchymateuse. Dans certains cancers, les cellules se déplacent *via* une migration amiboïde ne faisant pas intervenir de dégradation de la matrice extracellulaire. Ces cellules se déplacent par une alternance d'expansions et de contractions morphologiques. La migration amiboïde n'implique pas les molécules d'intégrines [Brakebusch *et al.*, 2002] les contacts focaux matures ainsi que les fibres de stress sont absents [Friedl *et al.*, 1998 ; Wolf *et al.*, 2003]. Les cellules forment des contacts rapides avec la matrice extracellulaire et se déplacent en changeant souvent de direction et en modifiant leur morphologie pour se faufiler au travers des petits espaces de la matrice. Ce mode de déplacement est rapide comparé à la stratégie mésenchymale (vitesse 2 à 30 µm/min [Painter, 2009]).

Les cellules tumorales peuvent présenter une plasticité : elles peuvent se déplacer, suivant le contexte, par le biais d'une stratégie amiboïde ou mésenchymale. En effet, les cellules de fibrosarcome migrent de manière MMP et intégrine-dépendante au travers d'un gel de collagène. En présence d'inhibiteur des MMP, ces cellules poursuivent leur invasion. Elles subissent une transition mésenchymateuse-amiboïde. Cette invasion amiboïde est indépendante de l'ancrage à la matrice extracellulaire, des intégrines et de la dégradation matricielle due aux MMP [Wolf *et al.*, 2003]. Cette transition est marquée par une inhibition de la protéolyse de la matrice extracellulaire, par la stimulation de la voie de signalisation Rho/ROCK et la diminution des interactions cellule-matrice extracellulaire [Friedl, 2004]. La transition mésenchymateuse-amiboïde tout comme son inverse, la transition amiboïde-mésenchymateuse impliquent de rapides changements dans le mode migratoire, en réponse aux spécificités de l'environnement extracellulaire. Ces transitions semblent jouer un rôle à différents niveaux du processus métastatique, lorsque certains microenvironnements nécessitent une adaptation phénotypique des cellules tumorales.

3.5. Implication des calpaïnes dans les différentes stratégies de migration et invasion, lors de la dissémination métastatique

L'activation de la m-calpaïne est indispensable au turnover des intégrines et au processus de migration [Carragher *et al.*, 2001 ; Dourdin *et al.*, 2001 ; Palecek *et al.*, 1998]. Ainsi, la présence d'inhibiteur des calpaïnes entraîne-t-elle une inhibition de l'invasion mésenchymale mais n'altère-t-elle pas l'invasion amiboïde [Carragher *et al.*, 2006]. De plus, l'inhibition de la m-calpaïne (ARN antisens) entraîne un arrêt de la migration mésenchymale mais n'a aucun effet sur la stratégie migratoire et invasive amiboïde [Carragher *et al.*, 2006]. L'invasion mésenchymale est donc m-calpaïne-dépendante, contrairement à l'invasion amiboïde qui est calpaïne-indépendante.

4. Un cas particulier de cancer : Les Rhabdomyosarcomes

4.1. Généralités

Le Rhabdomyosarcome (du grec : *rhabdo* : tige ; *mys* : muscle ; *saorkos* : chair) est la principale tumeur maligne de l'enfant et de l'adolescent (Figure 50) qui dérive du mésenchyme embryonnaire avec la capacité de se différencier en muscle squelettique. Ces cellules expriment donc des protéines spécifiques du muscle telles que les MRFs (*Myogenic regulatory factors*) ou la myoglobine [Dias *et al.*, 1990 ; Hosoi *et al.*, 1992]. Ces cellules présentent la particularité d'avoir une ploïdie anormalement élevée, les ERMS sont généralement tétraploïdes et les ARMS présentent une hyperploïdie [Stuart et Radhakrishnan, 2004].
Ce cancer représente plus de 33% des sarcomes de l'enfant. Les sarcomes de l'adulte se localisent surtout au niveau des extrémités contrairement au rhabdomyosarcome qui peut se déclarer dans toutes les parties de l'organisme possédant ou non du muscle squelettique, excepté au niveau du tissu osseux. Néanmoins, ce cancer se développe préférentiellement au niveau de la région du cou et de la tête ainsi qu'au niveau du tractus génito-urinaire. Il présente seulement

20% de localisation au niveau des extrémités. La forme clinique des rhabdomyosarcomes (RMS) dépend du site d'origine de la première tumeur, de l'âge du patient et de la présence ou non de métastases. Les principaux symptômes sont une compression locale des structures et une douleur légère. Il n'existe pas de symptômes paranéoplastiques associés aux RMS [Hayes-Jordan et Andrassy, 2009].

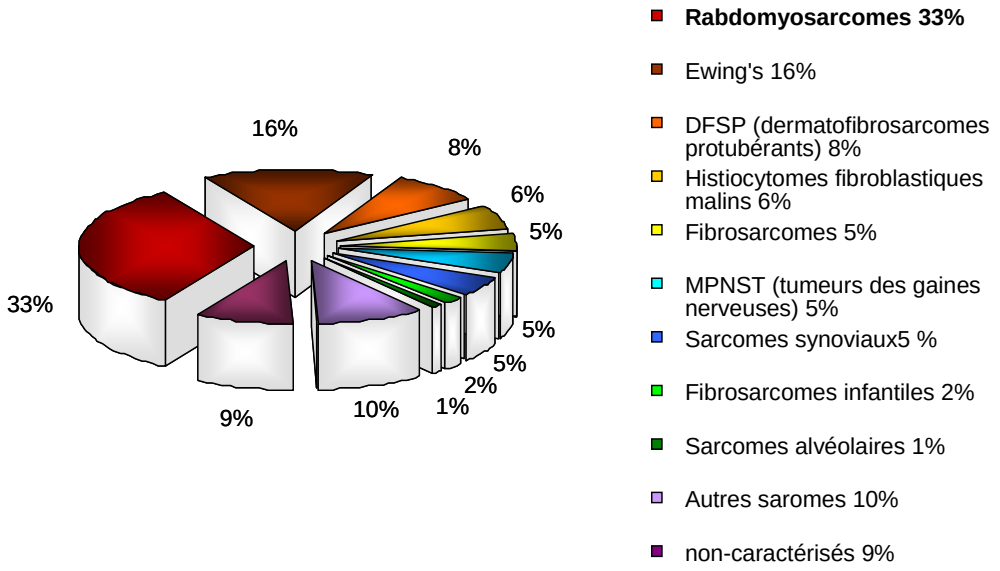

Figure 50 : Distribution des différents sarcomes de l'enfant, d'après Slater et Shipley. *(2007).*

4.2. Les altérations génétiques caractéristiques des Rhabdomyosarcomes

Le rhabdomyosarcome a été décrit pour la première fois en 1854 par Webner [Ruymann, 1987], chez un patient de 21 ans atteint d'une tumeur de la langue. Ce cancer se répartit en quatre sous-groupes : embryonnaire, alvéolaire, botryoïde (pouvant être considérés comme un sous-groupe des ERMS) et pléomorphique [Praham et Ellison, 2006]. Les deux principaux sous-groupes histologiques de Rhabdomyosarcomes, embryonnaires (ERMS) et alvéolaires (ARMS), présentent des altérations génétiques propres. Les ARMS sont caractérisés par une translocation entre le bras long du chromosome 2 et le bras long du chromosome 13. Cette translocation t(2 ;13) (q35 ;q14) entraîne la fusion du gène codant PAX3 (impliqué dans la régulation de la transcription durant le développement neuromusculaire

précoce) avec le gène codant pour la protéine FKHR (facteur de transcription de la famille forkhead) [Shapiro *et al.*, 1993]. Cette fusion entre les deux facteurs de transcription induirait l'activation aberrante de gènes contribuant ainsi à la constitution du phénotype ARMS. Un variant de cette translocation, entre le chromosome 1 et le chromosome 13, entraîne la fusion du gène codant PAX7 avec FKHR. Cette translocation affecte des patients plus jeunes, au niveau de leurs extrémités, permettant de définir un phénotype clinique [Kelly *et al.*, 1997]. La première translocation (PAX3/FKHR) entraîne un phénotype plus agressif [Sorensen *et al.*, 2002]. Pax3 est un régulateur myogénique et peut induire la différenciation de cellules souches dans le lignage myogénique en stimulant les gènes myogéniques MyoD, Myf5 et Myogénine [Gang *et al.*, 2008]. En présence de Pax3 les cellules mésenchymateuses entrent dans la différenciation myogénique, il est ainsi possible que la fusion des gènes PAX3-FKHR atténue la fonction physiologique de PAX3 empêchant un processus de différenciation complet.

Le phénotype ERMS est caractérisé par une perte de l'hétérozygotie affectant le chromosome 11 (11q15). La conséquence de cette délétion est une perte de l'information maternelle et la duplication de l'information génétique paternelle [Scrable *et al.*, 1987 ; Scrable *et al.*, 1989]. Ce locus correspond au gène codant IGF-2. En dehors de toute modification génétique, le gène maternel localisé au niveau du locus 11q15 est réprimé. Seul le gène paternel s'exprime. Dans le phénotype ERMS, le gène paternel est représenté deux fois ce qui entraîne une surexpression de IGF-2. La surexpression de IGF-2 a été impliquée dans la croissance dérégulée de nombreuses tumeurs, notamment dans les cancers de RMS [El Badry *et al.*, 1990 ; Kalebic *et al.*, 1994]. Le système IGF est composé de trois ligands (IGF-1, IGF-2 et l'insuline), de quatre récepteurs membranaires (IR-A (*insulin recepteur isoform A*), des récepteurs hybrides, IGF-1R et IGF-2R (récepteur de type 1 et 2 à l'IGF)). Chez l'homme, IGF-2 est la principale forme circulante d'IGF, avec une concentration plasmatique trois à sept fois plus importante que IGF-1 [Samani *et al.*, 2007]. IGF-1R, récepteur pouvant lier IGF-1, tout comme IGF-2 est exprimé de manière importante dans de nombreux cancers, dont les sarcomes. Cette augmentation de l'expression d'IGF-1R est causée par une perte de répresseurs tels que p53, ou par l'augmentation de l'expression d'activateurs transcriptionnels, dans

le cas par exemple des ARMS [Werner et Roberts, 2003]. De plus, IGF-1R est impliqué dans l'induction de transformations malignes, la régulation de l'adhésion et la migration ainsi que dans la stimulation de la différenciation [Valentinis et Baserga, 2001].

Les ERMS pourraient dériver des cellules satellites puisque l'expression de PAX7 est élevée dans ce sous-type, alors que l'expression de PAX3 est inchangée. Les ERMS auraient donc pour origine des cellules satellites musculaires [Charytonowicz *et al.*, 2009], connues pour exprimer PAX7 dans les conditions normales [Tiffin *et al.*, 2003]. Les cellules satellites ne sont pas considérées comme des cellules souches mais plutôt comme des cellules progénitrices du muscle, durant la croissance post-natale ou lors du processus de cicatrisation. Cependant, des cellules souches pluripotentes sont aussi présentes au niveau du muscle squelettique [Asakura *et al.*, 2002]. Alors que les cellules satellites s'engagent obligatoirement dans la voie myogénique, ces cellules souches pluripotentes peuvent non seulement s'engager dans la voie myogénique mais aussi dans les voies myéloïde ou lymphoïde. De plus, les cellules satellites expriment des marqueurs de la voie myogénique tels que la desmine ou Pax7. À l'inverse, les cellules pluripotentes n'expriment pas ces marqueurs myogéniques mais des marqueurs de cellules souches hématopoïétiques tels que Sca-1 ou CD45 [Seale *et al.*, 2000].

Quant aux ARMS, Keller *et al.* démontrent chez la souris que l'expression de Pax3-FKHR dans des cellules satellites n'entraîne pas leur transformation en ARMS, mais entraîne la formation d'un petit nombre de myoblastes post-nataux [Keller *et al.*, 2004a]. Alors que l'expression de Pax3-FKHR dans des myoblastes différenciés, exprimant myf6, entraîne la formation de cellules similaires aux ARMS humains [Keller *et al.*, 2004b]. Ces résultats suggèrent que les ARMS ne proviendraient ni de cellules souches ni cellules satellites, mais de cellules musculaires matures et différenciées. Cependant si tel est le cas, les caractéristiques anatomiques et morphologiques des ARMS sont difficilement explicables. En effet, les ARMS forment des tumeurs peu différenciées avec des structures de différenciation musculaires limitées, malgré l'expression de marqueurs de différenciation musculaires [Tonin *et al.*, 1991].

Plus récemment, Ren *et al.*, montrent que les ARMS auraient pour origine des cellules souches mésenchymateuses [Ren *et al.*, 2008]. Ils montrent que PAX3-FKHR peut activer la myogenèse dans les cellules souches mésenchymateuses transfectées avec cette construction, en induisant l'expression de MyoD et de myogénine. Cependant Myf5, qui est le premier marqueur spécifique du muscle de la différenciation terminale, dans la voie myogénique, n'est pas transactivé [Lindon *et al.*, 1998]. Ces résultats sont en accord avec la mise en évidence de l'expression de MyoD et myogénine ainsi qu'avec l'absence de l'expression de Myf5 dans les ARMS [Tonin *et al.*, 1991].

L'origine des deux principaux sous-groupes de RMS serait donc différente : les ARMS dériveraient de cellules souches mésenchymateuses, quant aux ERMS, ils dériveraient de cellules satellites.

Par ailleurs, certains marqueurs permettant de différencier les sous-types alvéolaire et embryonnaire ont été décrits. Makawita *et al.* ont montré que l'expression de IGF2 est associée à la translocation-négative de PAX/FKHR et peut servir d'outil de diagnostic pour distinguer les ERMS, présentant une expression élevée de IGF2, des ARMS. De plus, les données obtenues présument d'un rôle de la fusion des gènes PAX3/FKHR, dans l'inhibition de l'expression de IGF2, caractéristique des ARMS [Makawita *et al.*, 2009]. De même, la détection immunologique de la myogénine a été décrite comme un marqueur du sous-type alvéolaire et comme un outil permettant de distinguer le sous-type alvéolaire, du sous-type embryonnaire. La myogénine nucléaire des ARMS est beaucoup plus importante que celle des ERMS [Morgenstern *et al.*, 2008].

L'expression de la γ-caténine est aussi un marqueur permettant d'une part de distinguer les ARMS, des ERMS et d'autre part d'expliquer en partie la plus grande agressivité des ARMS. La γ-caténine ainsi que la β-caténine sont des composants majeurs des jonctions adhérentes intercellulaires, liant les cadhérines au cytosquelette d'actine. La surexpression de la β-caténine est impliquée dans la prolifération et la formation de tumeur [Polakis, 1999]. À l'inverse, un niveau élevé de γ-caténine supprime la croissance cellulaire ainsi que la formation de tumeur [Simcha *et al.*, 1996], alors que la réduction de son expression a été détectée dans des tumeurs à fort potentiel invasif et métastatique. La γ-caténine est exprimée dans

les ERMS mais absente ou faiblement détectée dans les ARMS. [Gastaldi *et al.*, 2005]. Ces résultats sont en accord avec une agressivité plus grande des ARMS en comparaison des ERMS.

4.3. Développement métastatique des Rhabdomyosarcomes

Les Rhabdomyosarcomes peuvent acquérir un pouvoir invasif et former des métastases (dans au moins 25% des cas) notamment au niveau des poumons, de la moelle osseuse, du tissu lymphatique, réduisant ainsi le taux de guérison à moins de 20% [Dagher et Helman, 1999]. Le traitement des RMS repose sur la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie. La chirurgie seule n'entraîne qu'un taux de 20% de guérison. Le faible taux de guérison en présence de métastases souligne l'importance des études visant à enrayer ce processus.

En résumé, l'invasion tumorale et la dissémination métastatique font intervenir des structures particulières, les podosomes et les invadopodes, qui permettent la dégradation de la matrice extracellulaire puis l'envahissement des tissus périphériques. Au niveau protéique, l'invasion et la dissémination impliquent un certain nombre de protéases telles que :

- **les métalloprotéases et les sérines-protéases qui sont responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire,**
- **la protéine FAK dont l'augmentation de l'activité enzymatique est responsable de l'augmentation du pouvoir invasif et les calpaïnes.**

La m-calpaïne est un médiateur de l'augmentation du pouvoir invasif induit par FAK. De même, l'association de la m-calpaïne avec la caspase 8 stimule la capacité métastatique, en augmentant le clivage de la taline. Les calpaïnes sont aussi responsables du clivage de certains suppresseurs de tumeur, tels que les protéines NORE1A, RASSF1A ou p53, stimulant ainsi indirectement la migration et l'invasion tumorale. Enfin, elles jouent aussi un rôle dans la perte d'adhésion intercellulaire, caractéristique des

phases précoces de la dissémination métastatique. L'ensemble de ces dérégulations mène la cellule tumorale à se détacher de la tumeur primaire pour envahir les tissus avoisinants par le biais d'une transition dite épithélio-mésenchymale. L'acquisition de la capacité métastatique réduit fortement le taux de guérison ; la détermination de protéines impliquées dans ce processus présente donc un intérêt majeur en vue de définir de nouvelles stratégies thérapeutiques.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

On ne peut se passer d'une méthode pour se mettre en quête de la vérité des choses. René Descartes.

1. Culture cellulaire

1.1. Cellules

Plusieurs modèles biologiques ont été utilisés : une lignée de cellules humaines (LHCN-M2) non-tumorale pour servir de contrôle, deux lignées humaines de Rhabdomyosarcomes (ARMS, Rh30 et ERMS, RD) et une lignée de souris (C2C12).
Les LHCN-M2 sont issues d'une biopsie musculaire d'une personne saine de 41 ans. Elles ont été immortalisées par l'expression de la sous-unité catalytique télomérase hTERT et cdk4 (une kinase cycline-dépendante). Leur dénomination « LHCN » provient des facteurs d'immortalisation qu'elles possèdent (*lox-hTERT hygromycin et cdk4-neo*). Le clone « *LHCN-myogenic clone no.2* » présentant une capacité forte à former des myotubes, en conditions de différenciation, a été isolé et a donné naissance à la lignée LHCN-M2 [Zhu *et al.*, 2007].
Les deux lignées de Rhabdomyosarcomes, dont les caractéristiques génétiques sont décrites au chapitre 3, sont issues de patients atteints de cancer du muscle. Leur nom provient de la morphologie que prend la tumeur lors de son développement : alvéolaire ou embryonnaire.
Les C2C12 sont une lignée de cellules musculaires de souris obtenue à partir de muscles de patte arrière de souris adultes C3H.

1.2. Milieux de culture

Les différents types cellulaires sont manipulés en conditions stériles.
Les C2C12 ainsi que les RMS sont cultivés dans les mêmes milieux de culture. Leur milieu est composé de DMEM contenant de la glutamine (*Dulbecco's Modified Eagle Medium Glutamax* – GIBCO-BRL) avec du pyruvate, supplémenté de 10% de FBS

(*fœtal bovine serum*– GIBCO-BRL). Les LHCN-M2, quant à elles sont cultivées dans du DMEM sans pyruvate (60%), complété de milieu 199 (GIBCO-BRL) (20%) et supplémenté en FBS (20%). 50 mg/L de pénicyline/streptomycine (GIBCO-BRL) sont ajoutés aux différents milieux de culture.

1.3. Conditions de culture

Les différents types cellulaires sont ensemencés à raison de 3000 cellules/cm^2, dans des boîtes de pétri de 78 cm^2, dans leur milieu de culture respectif. Les cellules sont incubées à 37°C dans une atmosphère humide contenant du CO_2 (5% de saturation). Lorsque les cellules atteignent un taux de 80% de confluence, les boîtes de culture sont rincées avec du PBS (phosphate buffered saline : $Na_2PO_4^-$ (10mM), KCl (2,7mM), NaCl (138mM), pH 7,4)) et les cellules sont décollées de leurs supports par ajout de 2 mL de trypsine/boîte (trypsine 0,25% (v/v), ESA 0,03% (v/v)). Une incubation de 3 minutes pour les C2C12 et les RMS à 5 minutes, pour les LHCN-M2 est effectuée à 37°C. L'action de cette protéase est ensuite arrêtée par l'addition de 2 mL de DMEM supplémenté en SVF (10% ou 20%). Les cellules sont alors dénombrées, à l'aide d'une cellule de Malassez et centrifugées durant 7 minutes à 1000 g.

Le surnageant est évacué, le culot cellulaire est repris dans du milieu de prolifération riche en sérum et subit un nouvel ensemencement. Le culot peut aussi être repris dans du milieu de congélation (DMEM 50%, FBS 40%, DMSO 10%) afin d'être stocké à -80°C, puis dans l'azote liquide.

2. Activité des calpaïnes

2.1. Activité globale des calpaïnes ubiquitaires

L'activité des calpaïnes est observée et quantifiée sur des cellules vivantes par l'utilisation du t-BOC-LM-CMAC (*7-amino-4-chloromethylcoumarin, t-BOC-L-leucyl-L-methionine amide* (*Molecular Probes*)). Cette molécule pénètre passivement dans les

cellules, sans affeter leur viabilité et devient fluorescente après clivage par les calpaïnes.

Les différents types cellulaires sont ensemencés sur verre ou gélatine (4.10^3 cellules/cm^2), dans du milieu de culture supplémenté avec 0,1% de FBS.

Après 48 heures d'incubation, le milieu est remplacé par du DMEM sans sérum contenant 50 µM de t-BOC-LM-CMAC. Les cellules sont incubées pendant 30 minutes, à l'abri de la lumière. L'activité des calpaïnes est ensuite observée avec un microscope inversé à épifluorescence (Leica AF DMI6000) en atmosphère contrôlée. Les résultats sont quantifiés par le logiciel *Metamorph* (*Molecular device*).

2.2. Activité de la µ-calpaïne

L'activité de la µ-calpaïne est observée et quantifiée au moyen du *Calpain 1 Substrate* sur cellules fixées. Ce réactif est un substrat fluorogène spécifique de la µ-calpaïne. Il est constitué d'un fluorochrome et de son quencher reliés par la séquence de la spectrine correspondant au site de clivage de cette protéine par la µ-calpaïne. Les cellules sont cultivées pendant 48h sur des lamelles de verre gélatinisées, dans un milieu de quiescence puis fixées au paraformaldéhyde (PAF) 4 % (15 minutes) et rincées au PBS. Les cellules sont alors perméabilisées dans du PBS-Triton X-100 (1%) pendant 3 minutes, puis rincées 3 fois. Elles sont ensuite mises en présence du *Calpain 1 Substrate* (50 µM) pendant 40 minutes, à l'abri de la lumière. Après rinçages, les lamelles sont montées sur lame et la fluorescence est observée avec un microscope à épifluorescence (Leica AF DMI6000). Les résultats sont quantifiés par le logiciel *Metamorph* (*Molecular device*).

3. Inhibition des calpaïnes

L'inhibition des calpaïnes a été réalisée de différentes manières : en utilisant deux inhibiteurs chimiques, la calpeptine ainsi que le calpain inhibitor III, plus spécifique ou en utilisant des oligonucléotides antisens dirigés contre la µ-calpaïne ou la m-calpaïne. Lors d'une inhibition avec des inhibiteurs chimiques, les cellules témoins

sont cultivés dans les mêmes conditions que les cellules traitées et du DMSO est ajouté à la place de l'inhibiteur dans le milieu de ces cellules.
Les cellules témoins des transfection des oligonucléotides antisens sont transfectées avec un oligonucléotide *random*.

3.1. Calpeptine

L'inhibiteur chimique des calpaïnes, la calpeptine (Z-Leu-Nle-CHO, *Calbiochem*), a été utilisé à des concentrations de 40 µM et 60 µM pour les tests d'adhésion, 100 µM pour l'analyse de l'expression de l'α-actine, de la β-actine et de la vinculine, et 50 µM pour l'étude des caractéristiques cinétiques ainsi que pour les tests d'invasion en chambre de Boyden.
La calpeptine peut lier de manière spécifique le résidu cystéine de la triade catalytique des calpaïnes et ainsi inhiber leur activité [Schoenwaelder *et al.*, 1999].

3.2. Calpain-inhibitor III

Un deuxième inhibiteur chimique des calpaïnes, le *calpain inhibitor III* (Z-Val-Phe-CHO, *Calbiochem*), a été utilisé à une concentration de 50 µM.

3.3. Oligonucléotides antisens

La technique des traitements antisens permet d'obtenir une inhibition de protéines cibles (µ-calpaïne et m-calpaïne).
Les cellules (LHCN-M2 et ARMS) sont transfectées avec des oligonucléotides antisens (contre la µ-calpaïne ou contre la m-calpaïne) ou random (Tableau 3). Ces transfections sont réalisées en utilisant un lipide carrier, l'*Oligofectamine Reagent* (*Invitrogen*). *L'Oligofectamine Reagent* (0,5 µL/cm²) est incubé, à température ambiante, pendant 5 minutes dans du DMEM sans sérum. Les oligonucléotides sont alors ajoutés au mélange, à une concentration de 300 nM. Cette solution est incubée une seconde fois, à température ambiante, pendant 15 minutes. Cette deuxième incubation permet à *l'Oligofectamine Reagent* de s'associer aux oligonucléotides. Le

mélange transfectionnel est ensuite appliqué sur les cellules pour une durée de 24 heures.

Tableau 3 : Composition des oligonucléotides antisens.

antisens	séquence
Random ASR	5'ATGCCCGCACCCCAGGCGGTC3'
ASµC	5'TGACATCAGTTCCGTAGGCCG3'
ASmC	5'ATGCGACCCCAGCCCCTCGCG3'

4. Tests d'adhésion

Dans le but de mesurer la cinétique d'adhésion des différentes lignées cellulaires, les cellules sont ensemencées dans du milieu de quiescence (DMEM, 0,1% FBBS) dans des boîtes 96 puits, à une densité de 5.10^{-3} cellules/cm^2. À différents temps après ensemencement, les cellules sont lavées trois fois avec du PBS et fixées avec du PAF 4% (paraformaldéhyde) pendant 15 minutes. Les cellules subissent ensuite une déshydratation à l'éthanol 70° sur la nuit. La déshydratation achevée, elles sont colorées à l'hémalun de Hansen et comptées.

Le taux d'adhésion, exprimé en pourcentage, est défini par le nombre de cellules ayant adhérées par rapport au nombre de cellules ensemencées.

L'implication des calpaïnes dans l'adhésion des différentes lignées est évaluée en inhibant leur activité avec de la calpeptine, à des concentrations de 40 et 60 µM, dès l'ensemencement.

5. Tests de migration

L'évaluation des différentes caractéristiques cinétiques des quatre lignées cellulaires a été effectuée par vidéo-microscopie.

Les cellules sont ensemencées à une densité de 4.10^3 cellules/cm^2, dans des boîtes de culture de 35 mm de diamètre, à fond en verre, contenant du milieu de quiescence. Pour les études de migration sur gélatine, les boîtes à fond en verre sont au préalable gélatinisées (1 mg/mL, 1 heure).

Huit heures après l'ensemencement, les cellules sont placées dans une chambre d'incubation (37°C, saturation CO_2 : 5%) et observées en contraste de phase, en vidéo-microscopie, à l'aide d'un microscope inversé Leica AF DMI6000. Les images sont prises avec un intervalle de 15 minutes pendant une durée d'expérimentation de 18 heures (soit 73 prises de vue).

La vitesse de migration des cellules est définie comme la moyenne de 73 déplacements du centroïde/intervalle de temps entre deux images (15 minutes). Cette analyse a été faite avec le logiciel *Metamorph* (*Molecular device*).

Ces enregistrements suivis de l'utilisation du logiciel *Metamorph* ont aussi permis de déterminer la répartition des cellules en fonction de leur vitesse de migration, l'aire de dispersion des cellules ainsi que leur capacité dispersive Δ. Δ est définie comme la distance séparant le point de départ de la cellule au début de l'enregistrement et sa localisation finale, 18 heures après.

L'implication des calpaïnes sur la migration est évaluée en inhibant leur activité avec de la calpeptine, à une concentration de 50 µM, ajoutée au milieu de quiescence au début de l'enregistrement.

6. Tests d'invasion

La capacité invasive des RMS, C2C12 et LHCN-M2 a été mesurée en utilisant des chambres de Boyden (*BD Biosciences*). La base des inserts de culture utilisés est une membrane PET percée de pores de 8 µm de diamètre.

Les cellules sont ensemencées, à une densité de 10^5 cellules/cm^2, sur la membrane, dans du milieu de quiescence (DMEM supplémenté avec 0,1% FBS). Du milieu de quiescence est aussi ajouté sous la membrane.

Après 48 heures d'incubation, les cellules restées au-dessus de la membrane sont éliminées par grattage. Les cellules localisées sous la membrane sont fixées avec du PAF (4%), et déshydratées sur la nuit, dans de l'éthanol 70°. Passé ce délai, les cellules sont colorées à l'hémalun de Hansen et dénombrées.

La même expérience est réalisée avec des inserts de culture dont la membrane PET est recouverte de Matrigel (collagène, laminine et entactine). De même, les cellules ayant traversé la membrane sont colorées puis dénombrées. Pour traverser la

membrane PET, les cellules ont dégradé le matrigel ; ces cellules sont donc invasives.

Le taux d'invasion est défini par le nombre de cellules invasives par rapport au nombre de cellules ayant traversé la membrane sans matrigel (par simple migration sans dégradation de matrice).

L'indice d'invasion, permettant de comparer les capacités invasives des différents types cellulaires est défini par le rapport entre le taux d'invasion des cellules testées et le taux d'invasion des cellules prises pour témoins (LHCN-M2).

L'implication des calpaïnes dans la capacité invasive des différents types cellulaires est évaluée en inhibant leur activité avec de la calpeptine, à une concentration de 50 µM, ajoutée lors de l'ensemencement.

7. Marquage du cytosquelette d'actine

Les différents types cellulaires sont ensemencés sur des lamelles de verre gélatinisées (1 mg/mL, 1 heure) dans des boîtes de culture contenant du milieu de quiescence. Quarante-huit heures après l'ensemencement, les cellules sont lavées avec du PBS puis fixées au PAF (4%) pendant 15 minutes (Figure 51). Elles sont ensuite perméabilisées, 3 minutes, avec du PBS-Triton X-100 (1%).

L'actine F polymérisée est marquée avec de la phalloïdine couplée FITC ou TRITC (0,5 µM), en fonction des besoins, pendant 40 minutes. Les cellules sont ensuite lavées trois fois avec du PBS. Après montage sur lame, les cellules sont observées avec un microscope à épifluorescence (Leica AF DMI6000).

L'implication des calpaïnes sur le cytosquelette d'actine est mise en évidence en présence de calpeptine, à une concentration de 50 µM. La calpeptine est ajoutée au milieu de culture 4 heures avant la fixation.

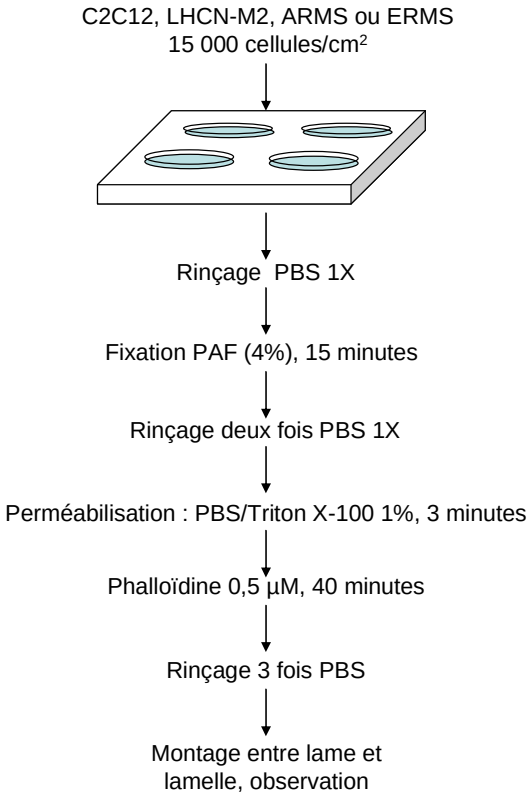

Figure 51 : Étapes du marquage du cytosquelette d'actine dans les différentes lignées cellulaires.

8. Immuno-localisation cellulaire

Pour les immuno-localisations, les différents types cellulaires sont cultivés sur des lamelles en verre gélatinisées, dans du milieu de quiescence, pendant 48 heures. Les cellules sont ensuite fixées avec du PAF 4% pendant 15 minutes puis, elles sont perméabilisées avec du PBS-Triton X-100 (1%), pendant 3 minutes. Les sites de fixation aspécifiques pour les anticorps primaires sont bloqués par une incubation d'une heure dans du PBS-BSA (3%).

Les cellules incubent ensuite 3 heures avec les anticorps primaires dirigés contre la m-calpaïne, la µ-calpaïne, la calpastatine ou la vinculine (tableau 4). À la fin de cette période d'incubation, les cellules sont rincées trois fois avec du PBS-BSA (3%) puis, elles sont incubées avec les anticorps secondaires appropriés (tableau 4), pendant 1 heure. Les cellules sont lavées trois fois et montées sur lames. Les localisations des diverses protéines sont réalisées avec un microscope à épifluorescence (Leica AF DMI6000).

Tableau 4 : Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés pour l'immuno-localisation de la µ-calpaïne, de la m-calpaïne, de la calpastatine et de la vinculine, dans les différentes lignées cellulaires.

	anticorps I	anticorps II
µ-calpaïne	anti-µ-calpaïne (souris) *Chemicon* MAB3104 dilution : 1/50	*anti-mouse-Alexa594-conjugated* *Molecular Probes* dilution : 1/3000
m-calpaïne	anti-m-calpaïne (chèvre) *Santa-Cruz Biotechnology* N-19 sc-7533 dilution : 1/50	*anti-goat-Alexa594-conjugated* *Molecular Probes* dilution : 1/1000
calpastatine	anti-calpastatine (lapin) *Santa-Cruz Biotechnology* H-300 sc-20779 dilution 1/50	*anti-rabbit-Alexa488-conjugated* *Molecular Probes* dilution : 1/3000
vinculine	anti-vinculine (souris) *Sigma Aldrich* V-9131 dilution : 1/50	*anti-mouse-Alexa594-conjugated* *Molecular Probes* dilution : 1/1000

9. Transfection de la tropomyosine

Les différents types cellulaires sont ensemencés la veille dans du DMEM supplémenté avec 10% FBS, pour les RMS et les C2C12 et avec 20% FBS pour les LHCN-M2.

L'ADN codant pour la tropomyosine (plasmide : pEGFPC2-TMα) est transfecté en utilisant l'*Effectene transfection Reagent* (Quiagen) (Figure 52). Les cellules sont observées 48 après la transfection.

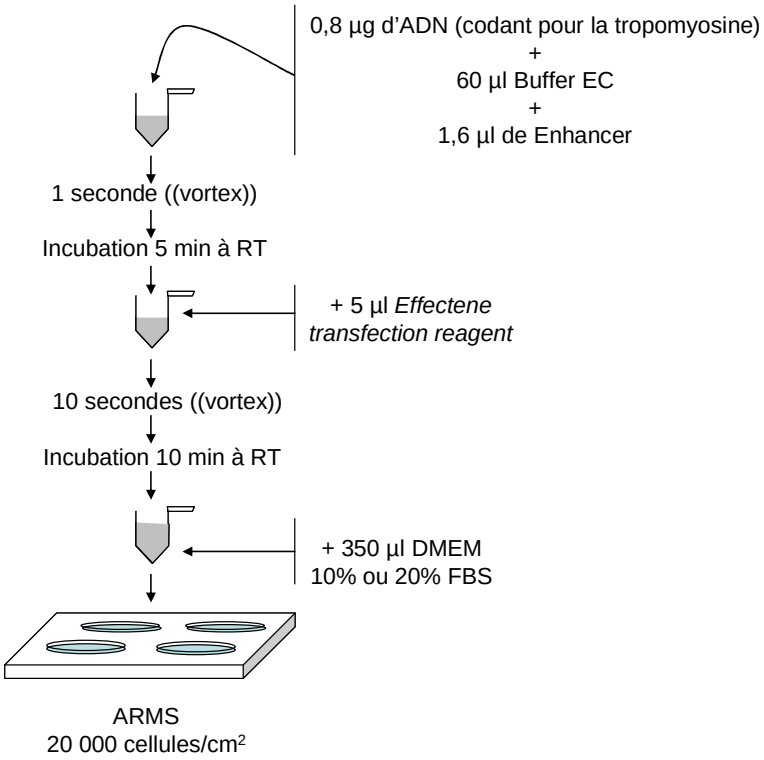

Figure 52 : Étapes de la transfection de la tropomyosine dans les ARMS.

10. RT QPCR

Le niveau d'expression des ARNm de la µ-calpaïne et de la m-calpaïne des LHCN-M2, ARMS et ERMS a été étudié par RT QPCR (*Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction*).
L'extraction des ARN totaux des LHCN-M2, ARMS et ERMS est réalisée à l'aide du kit *SV Total RNA Isolation* (*Promega*). Les ARN extraits sont ensuite dosés.

10.1. Transcription inverse

La transcription inverse permet la transcription des ARN en ADNc (ADN complémentaire) *via* l'utilisation de random primers (Promega) et de dNTP (dATP (désoxy adénine tri-phosphate), dCTP (désoxy cytosine tri-phosphate), dGTP (désoxy guanine tri-phosphate), dTTP (désoxy thymine tri-phosphate)). Les ARN sont incubés 5 minutes, à 65°C, en présence de ces deux composants puis, refroidis rapidement à 4°C. Le tampon de la transcriptase inverse (1X), du DTT et de la RNasin (inhibiteur de RNase) sont ensuite ajoutés. Après 2 minutes d'incubation, à 37°C, la M-MLV RT est ajoutée. L'ensemble est incubé 10 minutes à 25°C, 50 minutes à 37°C puis 15 minutes à 70°C.

10.2. QPCR

La QPCR est réalisée avec un thermocycleur *LightCycler* (Roche) à air pulsé couplé à un microspectrofluoromètre et piloté par un ordinateur qui permet l'acquisition en temps réel des données ainsi que leur traitement.
La détection des ADNc est possible grâce à la présence du *SYBR Green* (fluorophore) qui est capable de lier l'ADN double brin. Sous forme libre, le *SYBR Green* n'est pas fluorescent. Il le devient lors de sa liaison à l'ADNc.
Les programmes suivants ont été utilisés :

- dénaturation : 1 cycle de 10 minutes à 90°C
- amplification : 40 cycles : 10 secondes à 95°C, 5 secondes à 58°C, 10 secondes à 72°C

- fusion : 1 cycle de 0 seconde à 95°C, 15 secondes à 65°C, 0 seconde à 95°C
- refroidissement : 1 cycle de 30 secondes à 40°C.

11. Western-Blot

Les extraits protéiques sont préparés à partir de cellules incubées pendant 48h dans du milieu de quiescence. Après retrait du milieu de culture, les cellules sont rincées avec du PBS puis décollées des boîtes de culture par grattage dans du tampon de lyse 1X (Tris-phosphate (25mM); DTT (2mM), CDTA (2mM); Glycérol (10%) ; Triton X 100 (1%), pH 7,8) (à 4°C). Les lysats sont récupérés, soniqués quelques secondes, puis sont centrifugés, à 4°C, pendant 10 minutes, à 12000 rpm (rotations par minute) afin d'éliminer les débris cellulaires.

Les extraits protéiques sont ensuite dosés selon la méthode de l'acide bicinchoninique (BCA).

Du tampon de charge (β mercaptoéthanol (2,5%), Tris HCl (0,05mM), SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) (1%), bleu de bromophénol (0,01%), glycérol (30%)) est ajouté dans 30 µg de protéines. Les protéines sont ensuite dénaturées à 95°C pendant 5 minutes. La séparation des protéines est réalisée par SDS-PAGE (gel contenant 10% d'acrylamide), dans du tampon de migration (TG-SDS 10X (Tris 25mM, glycine 25mM, SDS 0,1%) (10%), H_2O (90%)). Les protéines séparées par électrophorèse sont transférées sur une membrane Immobilon-P (Millipore). Les membranes doivent au préalable être réhydratées (méthanol puis eau). Le transfert s'effectue en milieu semi-sec dans du tampon de transfert (TG-SDS 10X (10%), Méthanol (15%), H_2O (75%)), à0,8mA/cm^2 de membrane. Puis les membranes sont saturées à température ambiante pendant 60 min avec du TBS (Tris buffer saline : Tris (50mM), NaCl (138mM), KCl (2,7mM), pH 8) contenant 5% de lait demi-écrémé (p/v). Les membranes sont incubées avec les anticorps primaires (Tableau 5) dilués dans du TBS 1% lait, à 4°C, sur la nuit.

Les membranes sont rincées trois fois avec du TBS et incubées pendant 60 min dans du TBS 1% lait contenant des anticorps secondaires appropriés (Tableau 5) couplés à la phosphatase alcaline, dilués au 1/10000. Après rinçage (3 fois avec du TBS), la

révélation est réalisée avec du NBT/BCIP, à l'abri de la lumière (Tampon de révélation : Tris (100mM), NaCl (100mM), $MgCl_2$ (5mM)).

La densité apparente des bandes est quantifiée à l'aide du logiciel *Totalab* (*Progenesis*).

Tableau 5 : Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés pour l'étude de l'expression de la vinculine, de μ-calpaïne, de la m-calpaïne, de l'α-actine et de la β-actine, dans les différentes lignées cellulaires.

	anticorps I	anticorps II
vinculine (130 kDa)	anti-vinculine (souris) *Sigma-Aldrich* V-9131 dilution : 1/200	*anti-mouse*, conjugué à la phosphatase alkaline *Sigma-Aldrich* dilution 1/10000
μ-calpaïne (80 kDa)	anti-μ-calpaïne (souris) *Sigma-Aldrich* C-0355 dilution : 1/2500	*anti-mouse*, conjugué à la phosphatase alkaline *Sigma-Aldrich* dilution 1/10000
m-calpaïne (80 kDa)	anti-m-calpaïne (mouton) Brustis *et al.*, 1994 Mouton dilution : 1/1000	*anti-sheep*, conjugué à la phosphatase alcaline *Sigma-Aldrich* dilution 1/10000
α-actine	anti-α-actine (souris) *Sigma-Aldrich* A-2172 dilution : 1/800	*anti-mouse*, conjugué à la phosphatase alcaline *Sigma-Aldrich* dilution 1/10000
β-actine	anti-β-actine (souris) *Sigma-Aldrich* A-1978 dilution : 1/500	*anti-mouse*, conjugué à la phosphatase alcaline *Sigma-Aldrich* dilution 1/10000
β-tubuline	anti-β-tubuline (lapin) *Santa Cruz Biotechnology* H-235 sc-9104 dilution : 1/500	*anti-rabbit*, conjugué à la phosphatase alcaline *Sigma-Aldrich* dilution 1/10000

12. Analyse protéomique

L'analyse protéomique bidimensionnelle a pour but de séparer les protéines d'un extrait cellulaire en fonction de leur charge (axe horizontal) et de leur masse moléculaire (axe vertical). L'analyse de la position des spots obtenus permet de mettre en évidence les variations d'expression protéique en fonction des différentes conditions. L'analyse des spots eux-mêmes permet l'identification des protéines par spectrométrie de masse.

Les cellules sont placées, pendant 48 heures, en condition de quiescence.
Pour les cellules traitées, la calpeptine ou l'inhibiteur III sont ajoutés, à la concentration de 100 µM et 50 µM, respectivement, pendant 4 heures.
Le protéome des RMS traités avec la calpeptine ou l'inhibiteur III est comparé à celui des ARMS non-traités avec un inhibiteur des calpaïnes.

12.1. Extraction et dosage des protéines

Le tapis cellulaire est rincé deux fois, avec un tampon non-salin, Tampon Tris-Sucrose (Tris 30mM, Sucrose 250mM). Puis les cellules sont détachées du support de culture par grattage dans du Tris-Sucrose. Elles sont ensuite centrifugées à 1000 g, pendant 5 minutes, à 4°C. Le culot est repris par une solution de réhydratation contenant du tampon de lyse (Urée (7M), Thiourée (2M), CHAPS (4%), DTT (1%), de l'IPG buffer (0,5%) ainsi que des inhibiteurs de protéases (0,05%)) et est incubé 30 minutes à température ambiante. La préparation est ensuite centrifugée à 10000 g, pendant 15 minutes, à 20°C. Les protéines contenues dans le surnageant sont dosées selon la technique du kit de quantification *Amersham Biosciences* pour 2D.

12.2. Première dimension

L'électrofocalisation se fait sur des gels précoulés (strips de 24 cm) présentant un gradient de pH non-linéaire (pH 3 à 10). 480µg de protéines repris par du tampon

d'hydratation (volume final : 460 µl) contenant du bleu de bromophénol à l'état de trace, sont déposés sur les gels, de manière uniforme entre les deux électrodes. Le gel est ensuite placé dans l'IPGPhore (*Amersham*) (migration des protéines en fonction de leur point isoélectrique) et suit le programme suivant :

- réhydratation pendant 12 heures
- 200V pendant 1 heure
- 500V pendant 1 heure
- 1000V pendant 1 heure
- 30 minutes en gradient de 1000 à 8000 V
- 2 heures à 8000V.

12.3. Deuxième dimension

Les gels ayant servi à la première dimension sont équilibrés. Ils sont baignées de manière successive pendant 15 à 30 minutes dans une solution d'équilibration pH 8,8 (Tris (50mM), Urée (6M), SDS (2%), Glycérol (30%)) contenant du DTT (5µM) pour le premier bain et de l'iodoacétate (231,1 mg) pour le second bain. Les gels avec les protéines séparées selon leur point isoélectrique sont ensuite déposés horizontalement sur un gel SDS-PAGE (12,5%) (Acrylamide/bis acryl 40%, tampon de séparation tris 1,5M pH 8,8, SDS et agents polymérisants (Temed et APS). Les *strips* sont recouverts d'une solution d'agarose *Low Melting Point* (1%) pour permettre un contact complet entre la *strip* et le gel. Lors de la deuxième dimension les protéines migrent en fonction de leur masse moléculaire ((*Amersham*) 5W/gel pendant 30 minutes puis, 17W/gel pendant 4 heures).

12.4. Révélation

Les gels sont démoulés et plongés, sur la nuit, dans un bain de coloration contenant du persulfate d'ammonium (0,4M), du bleu de coomassie (1%), de l'acide orthophosphorique (10%) et de l'éthanol. Les gels sont ensuite révélés par une série de bains de décoloration à l'acide acétique (5%, jusqu'à obtention d'un fond transparent (environ 24 heures).

12.5. Traitement des données

Les gels sont scannés grâce au logiciel *MagicImage*, puis les données numériques sont traitées par le logiciel *Samespot* (*Progenesis*).

12.6. Identification des spots

Les spots représentant les protéines d'intérêt sont prélevés et analysés. Cette partie du travail a été confiée au pôle protéomique de l'Université Bordeaux 2.

13. Analyses statistiques

Les valeurs présentées correspondent aux moyennes obtenues après un minimum de trois manipulations indépendantes, accompagnées de leur erreur standard à la moyenne (e.s.m.). Les résultats sont comparés en utilisant le test-t de Student. Ils sont significativement différents lorsque $p<0,05$.

RÉSULTATS

Un fait n'est rien par lui-même, il ne vaut que par l'idée qui s'y rattache ou par la preuve qu'il fournit. Claude Bernard.

Comme souligné précédemment, les Rhabdomyosarcomes (RMS) peuvent acquérir un pouvoir invasif et former des métastases. Ainsi, dans le cadre de ces cancers du muscle, la compréhension des mécanismes régulant la capacité migratoire et invasive de ces cellules, conduisant à la formation de métastases, est-elle une étape importante dans la recherche de nouvelles thérapies visant à augmenter les chances de survie des patients.

Parmi les nombreuses protéases impliquées dans la motilité cellulaire, il a été montré que les calpaïnes sont impliquées dans l'adhésion, la migration et l'invasion, trois processus indispensables à la dissémination métastatique et que ce système protéolytique est dérégulé dans de nombreux cancers.

De nombreuses études ciblant le rôle des calpaïnes dans les processus migratoires ont été effectuées sur les fibroblastes ou encore sur les C2C12, myoblastes de souris. À l'heure actuelle, aucune étude n'a été réalisée sur les LHCN-M2, myoblastes humains qui semblent être un bon modèle de phénotype non-invasif pour l'étude du rôle des calpaïnes dans le phénotype tumoral de RMS.

Les résultats obtenus ont mis en évidence une dérégulation du système protéolytique neutre calcium-dépendant dans les RMS, comparé aux LHCN-M2. L'impact de cette dérégulation au niveau de l'adhésion, de la morphologie et de l'agencement du cytosquelette d'actine, ainsi qu'au niveau de la migration et du pouvoir invasif a été étudié, en comparant les données obtenues dans les RMS à celles obtenues dans les LHCN-M2 ainsi qu'en inhibant l'activité calpaïne par le biais de la calpeptine (inhibiteur synthétique des calpaïnes) ou par la transfection d'oligonucléotides antisens. Enfin, une approche protéomique a été entamée afin de définir des cibles potentielles des calpaïnes pouvant être responsable du phénotype tumoral des RMS.

Certaines expérimentations ont été réalisées uniquement avec la lignée tumorale présentant le phénotype le plus agressif, les ARMS.

CHAPITRE 1 : ACTIVITE DES CALPAÏNES DANS LES RHABDOMYOSARCOMES

1. Mise en évidence de la dérégulation de l'activité du système protéolytique neutre calcium-dépendant dans les RMS

L'utilisation du t-Boc-LM-CMAC permet l'observation de l'activité calpaïne globale dans les différentes lignées cellulaires. Son entrée passive dans la cellule permet l'observation de l'activité calpaïne sur des cellules vivantes, à des concentrations calciques physiologiques.

La fluorescence du t-Boc-LM-CMAC est plus forte dans les deux lignées de RMS (ERMS et ARMS) que dans les LHCN-M2 et les C2C12 (Figure 53A). Cette différence met en évidence une activité calpaïne plus forte dans les cellules tumorales. La quantification de la fluorescence et par extension, de l'activité calpaïne globale, des différents types cellulaires montre que les ARMS et les ERMS présentent, respectivement, une activité 2,6 et 2,1 fois supérieure à celles des LHCN-M2 (Figure 53B).

L'activité calpaïne des C2C12 bien que largement inférieure à celle des RMS, est néanmoins significativement supérieure à celle des cellules témoins.

De même, l'activité de la µ-calpaïne, mise en évidence par l'utilisation du *calpain 1 substrate*, est significativement supérieure dans les RMS, comparée à celle des cellules non-tumorales (Figure 53C). Les ARMS et les ERMS présentent, respectivement, une activité µ-calpaïne 2,3 fois et 2,7 fois supérieure à celle des LHCN-M2

Cette activité calpaïne élevée peut être, entre autre, induite par une augmentation de l'expression de la µ-calpaïne et de la m-calpaïne ou une diminution de l'expression de leur inhibiteur endogène spécifique, la calpastatine.

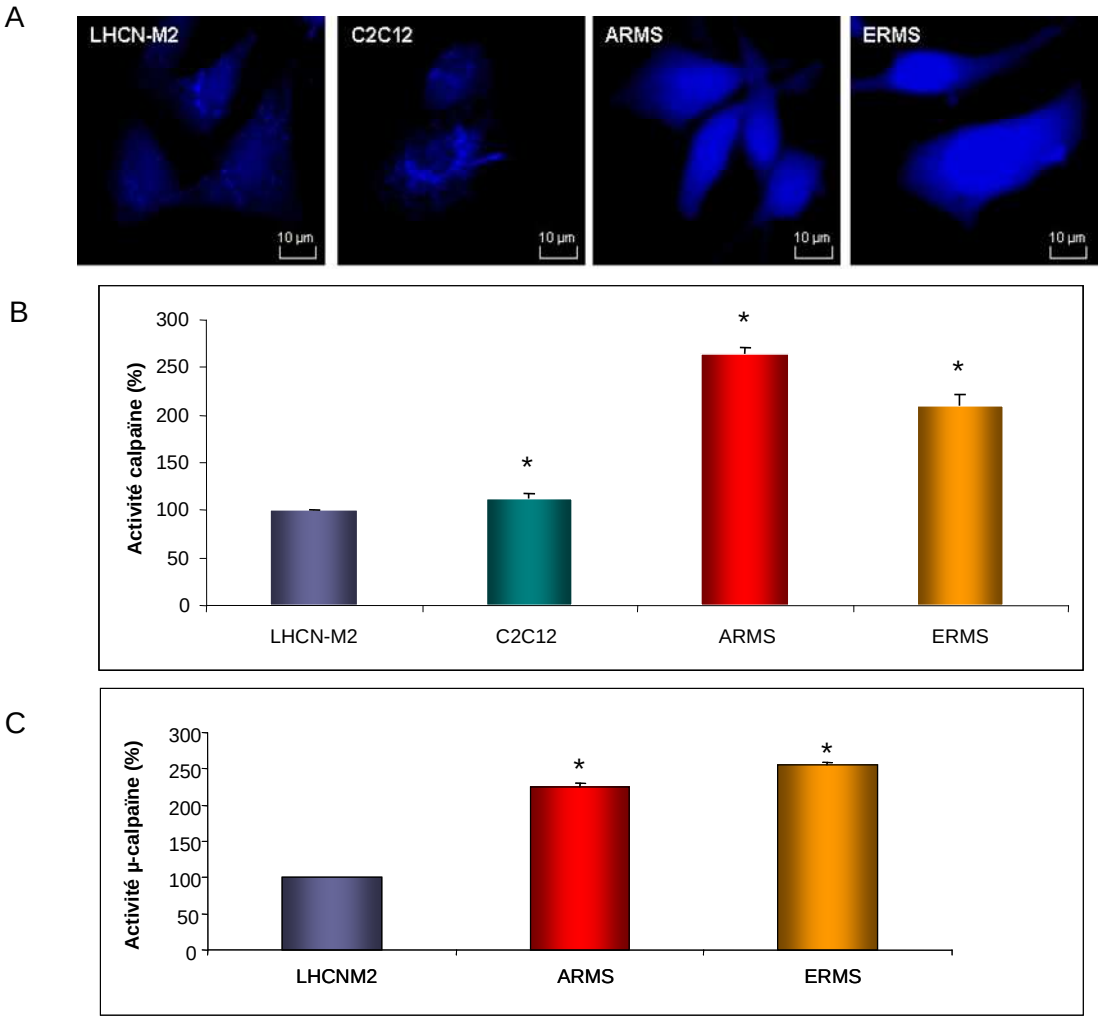

Figure 53 : Observation (A) et quantification (B) de l'activité des calpaïnes ubiquitaires et de la µ-calpaïne (C) dans les LHCN-M2, les C2C12, les ARMS et les ERMS. L'utilisation du t-BOC-LM-CMAC permet l'observation de l'activité calpaïne globale, sur cellules vivantes (A) ainsi que sa quantification (B). Le calpain 1 substrat permet la quantification de l'activité de la µ-calpaïne sur cellules fixées (C). L'acquisition des images (représentatives de la population cellulaire) a été réalisée à l'aide d'un microscope à épifluorescence (Leica AF DMI6000). L'activité calpaïne a été quantifiée avec le logiciel *Metamorph*.
Les échelles de taille représentent 10 µm. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité par rapport aux cellules témoins LHCN-M2. Les barres d'erreurs représentent les e.s.m. calculées sur au moins trois expériences indépendantes.
*: significativement différent du témoin ($p<0,05$).
Les valeurs numériques des résultats des figures 54A et B ainsi que des t-tests sont présentées dans le chapitre Annexes, Tableaux 6 et 7.

2. Quantification de l'expression des différents composants du système neutre protéolytique calcium-dépendant

L'expression protéique des différents composants du système protéolytique neutre calcium-dépendant a été quantifiée en vue d'expliquer la forte activité calpaïne observée dans les ARMS et dans les ERMS (Figure 54).

La μ-calpaïne est significativement moins exprimée dans les deux lignées de RMS, comparée aux LHCN-M2 (Figure 54A). Son expression est diminuée de 70% dans les ARMS et de 60% dans les ERMS (expression de la μ-calpaïne dans les ARMS : 29,73±2,03 et dans les ERMS : 39,53±3,32, par rapport à l'expression de la μ-calpaïne dans les cellules témoins LHCN-M2).

De même, la m-calpaïne est significativement moins exprimée dans les deux lignées de RMS, comparée à son expression dans les LHCN-M2 (Figure 54B). Elle est diminuée de 42% dans les ARMS et de 47% dans les ERMS (expression de la m-calpaïne dans les ARMS : 58,43±2,90 et dans les ERMS : 52,80±2,69, par rapport à l'expression de la m-calpaïne dans les cellules témoins LHCN-M2).

D'autre part, l'expression de la calpastatine est elle aussi très fortement diminuée, de 86% dans les ARMS et de 74% dans les ERMS (expression de la calpastatine dans les ARMS : 14,60±0,92 et dans les ERMS : 26,19±2,84, par rapport à l'expression de la calpastatine dans les cellules témoins LHCN-M2).

La synthèse protéique de calpaïnes est fortement diminuée dans les cellules tumorales ce qui devrait conduire à une activité calpaïne plus faible que dans les cellules saines mais l'effondrement de la synthèse de leur inhibiteur, la calpastatine, conduit à une activité calpaïne globalement plus élevée dans les cellules tumorales comparativement à leurs homologues saines. Ainsi, la forte activité calpaïne dans les RMS n'est-elle pas due à une augmentation de la synthèse protéique des calpaïnes mais à une diminution de la quantité de calpastatine.

Afin de définir à quel niveau (transcriptionnel ou traductionnel) à lieu la dérégulation de l'expression de la μ-calpaïne et de la m-calpaïne, l'expression des ARNm de ces dernières a été quantifiée (Figure 55).

Bien que le taux d'expression des ARNm de la μ-calpaïne soit plus faible dans les cellules tumorales que dans les cellules saines, il n'y a pas de différence significative entre l'expression des ARNm de la μ-calpaïne entre les différents types cellulaires (Figure 55A). La diminution de sa synthèse protéique serait donc due à une dérégulation post-transcriptionnelle. Contrairement à la μ-calpaïne, la m-calpaïne présente une diminution significative de la quantité d'ARNm dans les deux lignées de RMS (Figure 55B). Cette diminution est de 41% dans les RMS et de 54% dans les ERMS. La dérégulation de la m-calpaïne affecte donc l'étape de transcription du gène codant pour cette protéine.

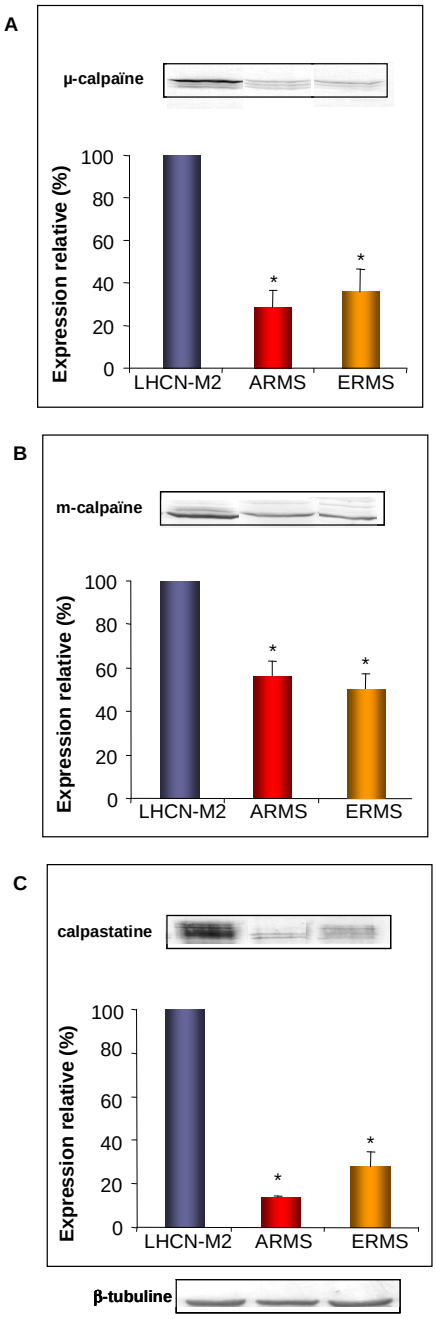

Figure 54 : Expression de la μ-calpaïne (A), de la m-calpaïne (B) et de la calpastatine (C) dans les LHCN-M2, les ARMS et les ERMS, en migration. Les protéines sont extraites 48h après ensemencement en milieu de quiescence et sont séparées par SDS-PAGE.
Les résultats, corrigés par la β-tubuline, sont exprimés en pourcentage d'expression par rapport aux témoins LHCN-M2. Les barres d'erreurs représentent les e.s.m. calculées sur trois expériences indépendantes.
* : significativement différent du témoin ($p<0,05$).
Les valeurs numériques des résultats ainsi que des t-tests sont présentées dans le chapitre Annexes, Tableau 8.

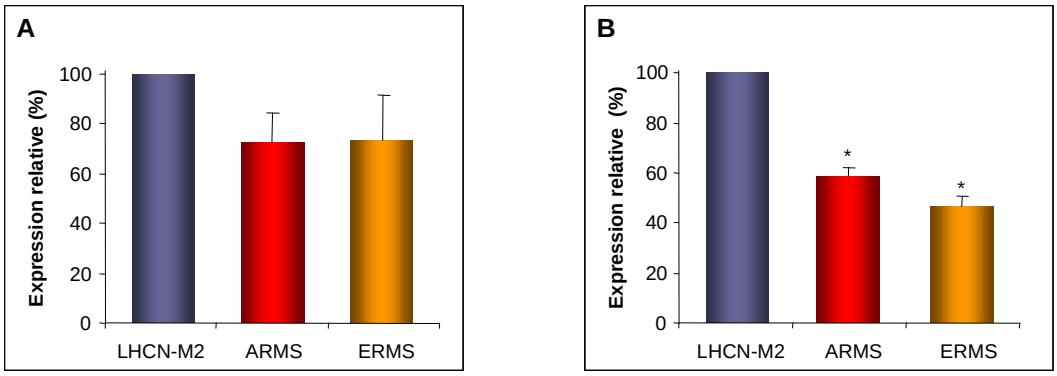

Figure 55 : Niveau d'expression des ARNm de la µ-calpaïne (A) et de la m-calpaïne (B) dans les LHCN-M2, les ARMS et les ERMS, en migration. Les niveaux d'expression des ARNm ont été déterminés par RT-qPCR.
Les résultats sont exprimés en pourcentage d'expression par rapport aux témoins LHCN-M2. Les barres d'erreurs représentent les e.s.m. calculées sur au moins trois expériences indépendantes.
* : significativement différent du témoin ($p<0,05$).

3. Localisation des composants du système protéolytique neutre calcium-dépendant

Les composants du système protéolytique neutre calcium-dépendant ont été localisés dans les LHCN-M2, ARMS et ERMS (Figure 56). Une localisation avait déjà été effectuée, au laboratoire, dans les C2C12 [Mazères *et al.*, 2006]. Dans ces cellules de souris, la µ-calpaïne présente un gradient de concentration décroissant du centre de la cellule vers la périphérie, de même que la calpastatine. La m-calpaïne quant-à elle est concentrée dans les extensions membranaires.

Dans les myoblastes humains, la µ-calpaïne est localisée dans tout le cytoplasme (Figure 56A). Plus précisément, elle se présente sous forme de structures rectilignes parallèles à l'axe principal de la cellule. Dans les deux lignées de cellules tumorales, la µ-calpaïne est aussi localisée dans le cytoplasme et présente un gradient de concentration du centre de la cellule vers la périphérie (Figure 56D et 56G). Aucun agencement particulier n'a été mis en évidence ni dans les ARMS, ni dans les ERMS.

La m-calpaïne a une localisation identique dans les trois types cellulaires : elle est cytoplasmique, concentrée autour du noyau. Elle se présente sous forme de spots individualisés (Figure 56B, 56E et 56H).

Tout comme la m-calpaïne, la calpastatine possède la même localisation dans les LHCN-M2 et dans les deux lignées de RMS (Figure 56C, 56F et 56I). Elle est cytoplasmique et est observée sous forme d'un gradient de concentration du centre de la cellule vers les extrémités.

Ainsi, parmi les composants du système protéolytique neutre calcium-dépendant, seule la µ-calpaïne présente-t-elle une différence de localisation entre les myoblastes humains et les cellules tumorales.

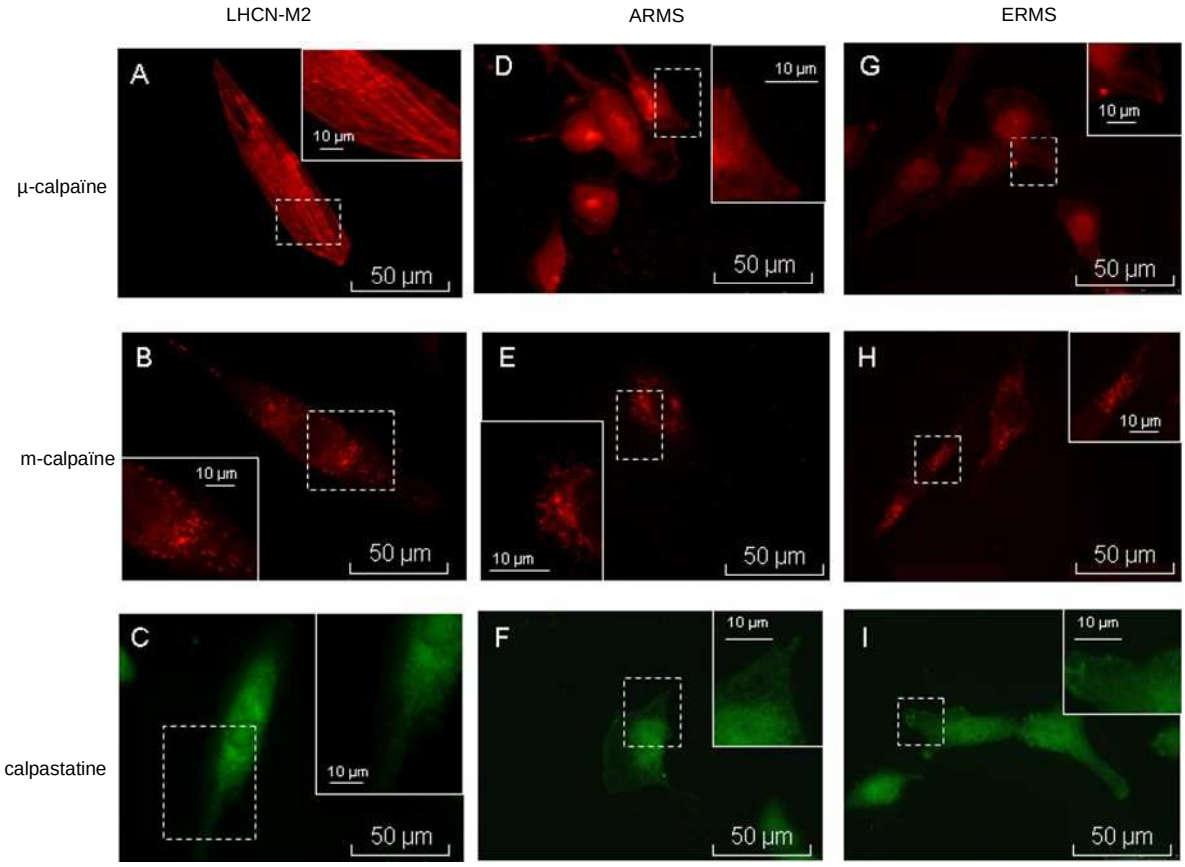

Figure 56 : Localisation des composants du système protéolytique neutre calcium-dépendant dans les différents types cellulaires. Après 48 heures de culture dans du milieu de quiescence, les cellules sont fixées et perméabilisées. La localisation protéique est obtenue par immunofluorescence de la µ-calpaïne, de la m-calpaïne et de la calpastatine dans les LHCN-M2 (A, B et C, respectivement), dans les ARMS (D, E et F, respectivement) et dans les ERMS (G, H et I, respectivement).
Les échelles de taille représentent 10 et 50 µm. Les résultats sont représentatifs d'au moins trois expériences indépendantes.

Cette activité calpaïne globale plus élevée dans les RMS, doit avoir des répercussions au niveau morphologique, cytosquelettique ainsi que sur les capacités adhésive, migratoire et invasive de ces cellules.

CHAPITRE 2 : IMPLICATION DES CALPAÏNES DANS L'ADHESION

1. Les RMS présentent un défaut d'adhésion

Les tests d'adhésion effectués sur les LHCN-M2, les C2C12, les ARMS et les ERMS mettent en évidence un défaut d'adhésion des RMS (Figure 57).

Les LHCN-M2 et les C2C12 ont une cinétique d'adhésion similaire. Elles présentent un taux d'adhésion supérieur à 50%, 2 heures après ensemencement. Huit heures après ensemencement, 100% des cellules ont adhéré. Contrairement aux cellules non-tumorales, seulement moins de 40% des RMS ont adhéré, 8 heures après ensemencement (36,90±3,03% et 34,57±3,81 pour les ARMS et les ERMS, respectivement).

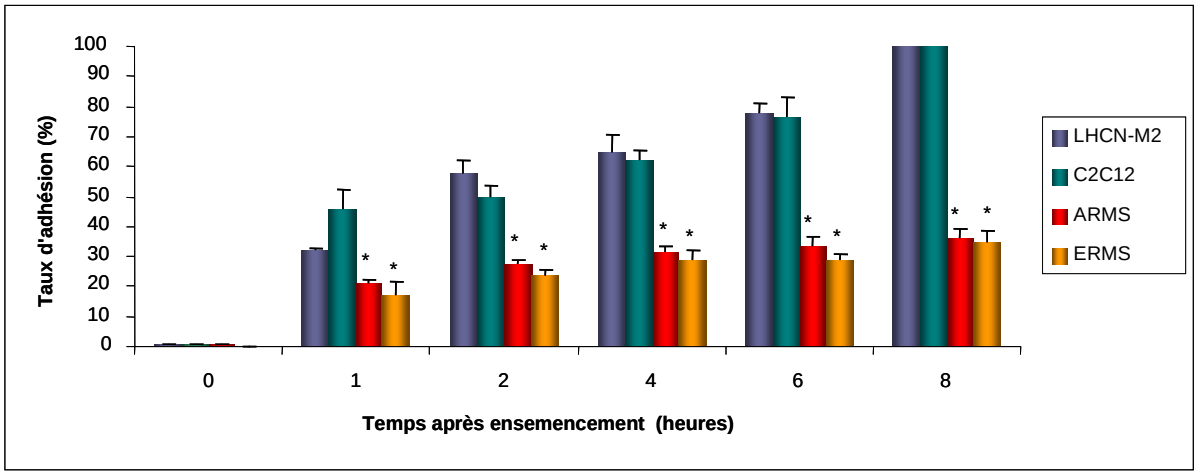

Figure 57 : Cinétique d'adhésion des LHCN-M2, C2C12, ARMS et ERMS, de 0 à 8 heures après ensemencement. Les cellules sont ensemencées dans du DMEM supplémenté avec 0,1% de FBS. Après différents temps d'incubation, les cellules sont fixées avec du PAF 4%. Après coloration à l'hémalun de Hansen, elles sont dénombrées. Le taux d'adhésion représente le rapport entre le nombre de cellules ayant adhéré et le nombre de cellules ensemencées.
Les barres d'erreurs représentent les e.s.m. calculées sur trois expériences indépendantes.
* : significativement différent des LHCN-M2 ($p<0,05$).

2. Les calpaïnes sont impliquées dans l'adhésion cellulaire

L'inhibition de l'activité calpaïne par ajout de calpeptine, à des concentrations de 40 ou 60 µM entraîne une diminution du taux d'adhésion des cellules non-tumorales, LHCN-M2 et C2C12 (Figure 58A et 58B). Huit heures après ensemencement, cette diminution est de 40% pour les LHCN-M2 et de 46% pour les C2C12 avec une concentration en calpeptine de 40 µM et de 55% avec une concentration de 60 µM. Lorsque leur activité calpaïne est inhibée, les LHCN-M2 et les C2C12 présentent une cinétique d'adhésion comparable.

L'inhibition des calpaïnes, dans les ARMS tend à induire une diminution du taux d'adhésion (Figure 58C). Cette diminution n'est cependant significative qu'à 2 heures et 4 heures après ensemencement en présence de calpeptine à une concentration de 40 µM ainsi qu'en présence de calpeptine à une concentration de 60 µM, à partir de 2 heures. À cette concentration, 8 heures après ensemencement, les ARMS présentent une diminution de leur taux d'adhésion de 18% par rapport aux conditions standards.

Dans les ERMS, l'inhibition des calpaïnes n'a pas d'effet sur la cinétique d'adhésion, ni avec 40 µM, ni avec 60 µM de calpeptine (Figure 58D).

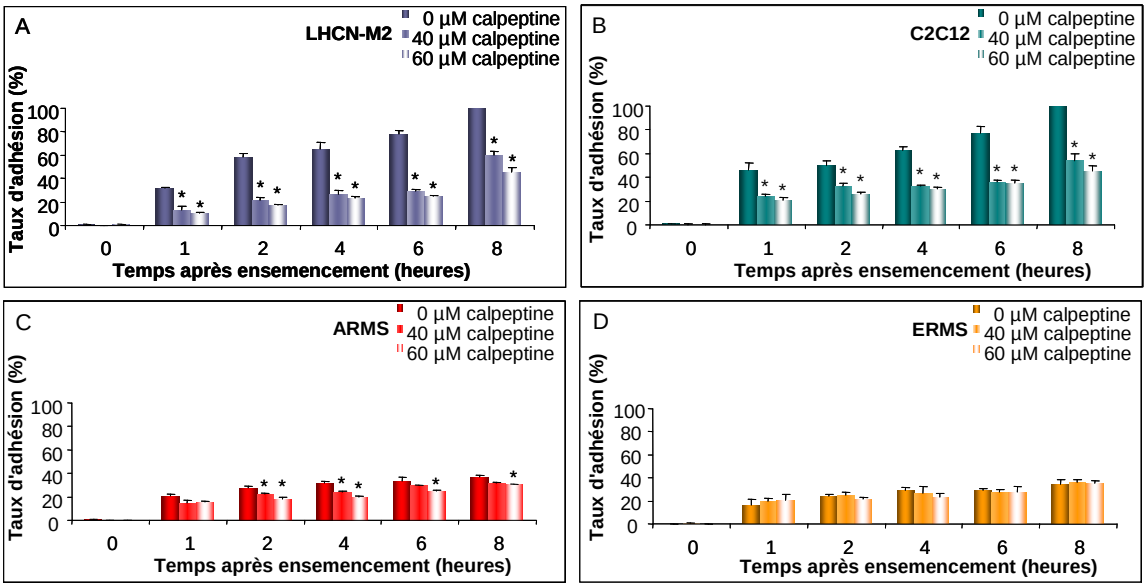

Figure 58 : Cinétique d'adhésion des LHCN-M2, C2C12, ARMS et ERMS, en fonction de la concentration en calpeptine, de 0 à 8 heures après ensemencement. Les cellules sont ensemencées dans du DMEM supplémenté avec 0,1% de FBS. Les cellules sont traitées avec de la calpeptine (ajoutée lors de l'ensemencement) à des concentrations de 0, 40 et 60 µM.
Après différents temps d'incubation, les cellules sont fixées avec du PAF 4%. Après coloration à l'hémalun de Hansen, elles sont dénombrées. Le taux d'adhésion représente le rapport entre le nombre de cellules ayant adhéré et le nombre de cellules ensemencées.
Les barres d'erreurs représentent les e.s.m. calculées sur trois expériences indépendantes.
* : significativement différent du témoin non traité ($p<0,05$).

3. Localisation de la vinculine, marqueur des plaques d'adhésion

Le défaut d'adhésion mis en évidence dans les RMS a conduit à comparer la localisation de la vinculine, molécule caractéristique des plaques d'adhésion, dans les différentes lignées cellulaires (Figure 59). Cette localisation est observée par immunofluorescence, dans les cellules en migration, 48 heures après ensemencement dans du milieu de quiescence.

De manière générale, la vinculine se situe à la face ventrale de la cellule, notamment aux extrémités des fibres de stress (au niveau des adhésions focales), comme illustré dans l'exemple des LHCN-M2, dans la figure 59A.

Dans les LHCN-M2, la vinculine est répartie sur toute la face ventrale de la cellule (Figure 59B). De même, dans les C2C12, la vinculine est présente sur toute la face ventrale cellulaire (Figure 59C). Dans ces deux lignées, une plus forte concentration de la vinculine est observée à la périphérie cellulaire.

Dans les ARMS, la vinculine est aussi localisée à la face ventrale de la cellule. Elle présente une concentration particulière au centre ainsi qu'au niveau des limites du pourtour de la cellule (Figure 59D). Cette localisation est identique dans les ERMS (non illustré).

L'inhibition des calpaïnes avec de la calpeptine, à une concentration de 50 µM, induit une modification de la localisation de la vinculine, la concentrant en périphérie cellulaire, dans les différents types cellulaires (Figure 59 E, F, G).

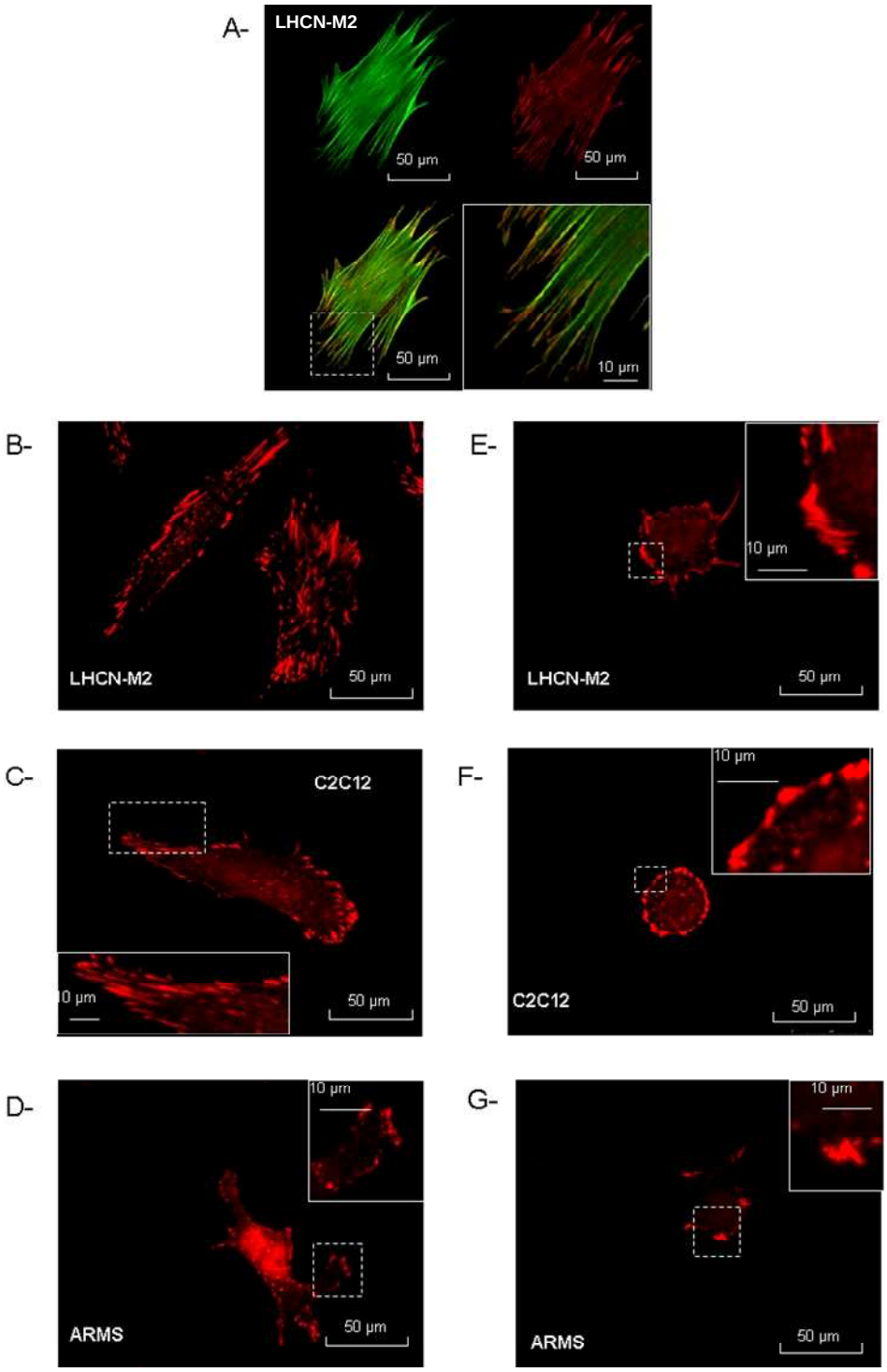

Figure 59 : Localisation de la vinculine, marqueur des plaques d'adhésion, dans les différentes lignées cellulaires (LHCN-M2, C2C12 et ARMS), traitées ou non avec de la calpeptine (50 µM). Localisation de la vinculine aux extrémités des fibres de stress dans les LHCN-M2 (A). Le cytosquelette d'actine est marqué en vert et la vinculine, en rouge.
Localisation de la vinculine dans les LHCN-M2 (B), C2C12 (C) et ARMS (D) non traitées ainsi que dans les LHCN-M2 (E), C2C12 (F) et ARMS (G) traitées avec 50 µM de calpeptine.
Les échelles de taille représentent 10 et 50 µm. Les résultats sont représentatifs de la population cellulaire d'au moins trois expériences différentes.

4. Expression de la vinculine

L'inhibition des calpaïnes réduisant l'adhésion cellulaire et/ou modifiant la localisation des adhésions focales, l'expression de la vinculine est quantifiée dans les LHCN-M2 et les ARMS, en présence et en absence de calpeptine (Figure 60A) ainsi qu'après un traitement avec des oligonucléotides antisens dirigés contre la µ-calpaïne ou la m-calpaïne (Figure 60B et C).

Dans les LHCN-M2, l'inhibition des calpaïnes par l'ajout de calpeptine, à une concentration de 50 µM, induit une multiplication de la quantité de vinculine par deux.

L'inhibition des calpaïnes induit une diminution significative, statistiquement, de l'expression de la vinculine, de 14%. Cependant, cette diminution est faible et ne saurait refléter une forte régulation de cette protéine par les calpaïnes. (Figure 60A). Ces résultats semblent donc indiquer l'existence d'une seconde voie de régulation de l'expression de la vinculine, plus dominante que celle impliquant les calpaïnes.

Les résultats obtenus après traitement avec des oligonucléotides dirigés contre la µ-calpaïne ou la m-calpaïne confirment, dans les LHCN-M2, que l'inhibition des calpaïnes induit une augmentation de la quantité de vinculine (augmentation de 14%). Dans les ARMS, les résultats obtenus après traitement avec les oligonucléotides antisens dirigés contre la µ-calpaïne indiquent que cette dernière n'intervient pas dans la régulation de l'expression de la vinculine. L'inhibition de la m-calpaïne entraîne une diminution significative de l'expression de la vinculine. Cependant pour les raisons citées ci-dessus, les résultats semblent indiquer que la m-calpaïne n'intervient pas, ou faiblement dans l'expression de la vinculine.

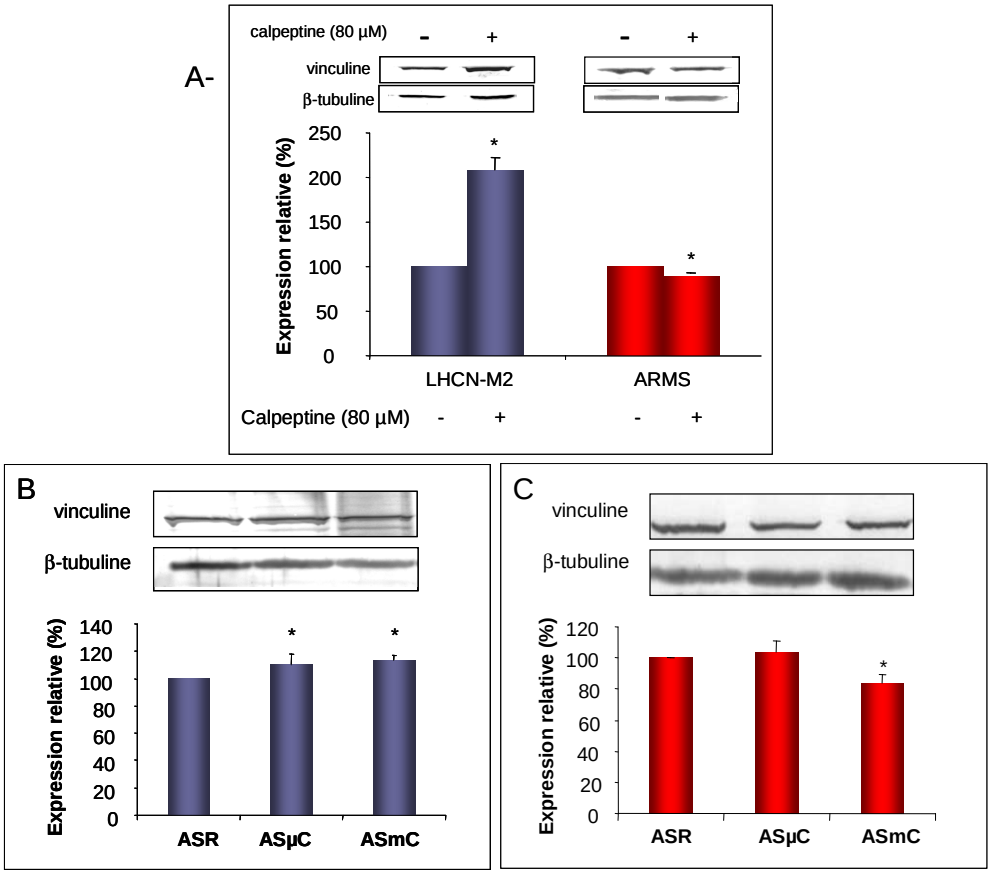

Figure 60 : Expression de la vinculine dans les LHCN-M2 et les ARMS en présence ou non de calpeptine (A) et après traitement avec des antisens oligonucléotides dirigés contre la µ-calpaïne ou la m-calpaïne (B, LHCN-M2 ; C, ARMS). Le niveau d'expression de la vinculine a été quantifié et exprimé en pourcentage d'expression par rapport au niveau d'expression des cellules témoins non traitées avec la calpeptine ou transfectées avec l'oligonucléotide *Random*.
Les barres d'erreurs représentent les e.s.m. calculées sur trois expériences indépendantes.
* : significativement différent du témoin non traité ($p<0,05$).

CHAPITRE 3 : IMPLICATION DES CALPAÏNES DANS LA MORPHOLOGIE ET LE CYTOSQUELETTE D'ACTINE

1. Implication des calpaïnes dans la morphologie des cellules

La morphologie des différents types cellulaires, en migration, a été observée sur verre et sur gélatine (Figure 61).
La morphologie des LHCN-M2, C2C12 ainsi que des ERMS ne sont pas affectées par le substrat de migration.
Les LHCN-M2 et les C2C12 présentent une morphologie allongée. Elles présentent des extensions membranaires de type filopode et lamellipode. À la différence de ces dernières, les ERMS sont plus pauvres en cytoplasme et possèdent un noyau plus volumineux. Les extensions membranaires des ERMS sont moins distinctes et plus petites.
Sur verre, les ARMS ont une morphologie peu différente des ERMS. Cependant, contrairement aux autres types cellulaires, les ARMS présentent, sur gélatine, de larges extensions membranaires de type lamellipode et filopode (Figure 61G).

L'inhibition des calpaïnes, par l'ajout au milieu de culture de calpeptine, à une concentration de 50 µM, induit une modification de la morphologie des différents types cellulaires (Figure 62). Les cellules s'arrondissent et les protrusions membranaires, plus petites, sont plus trapues.
L'impact de cette inhibition est identique pour les quatre lignées cellulaires.

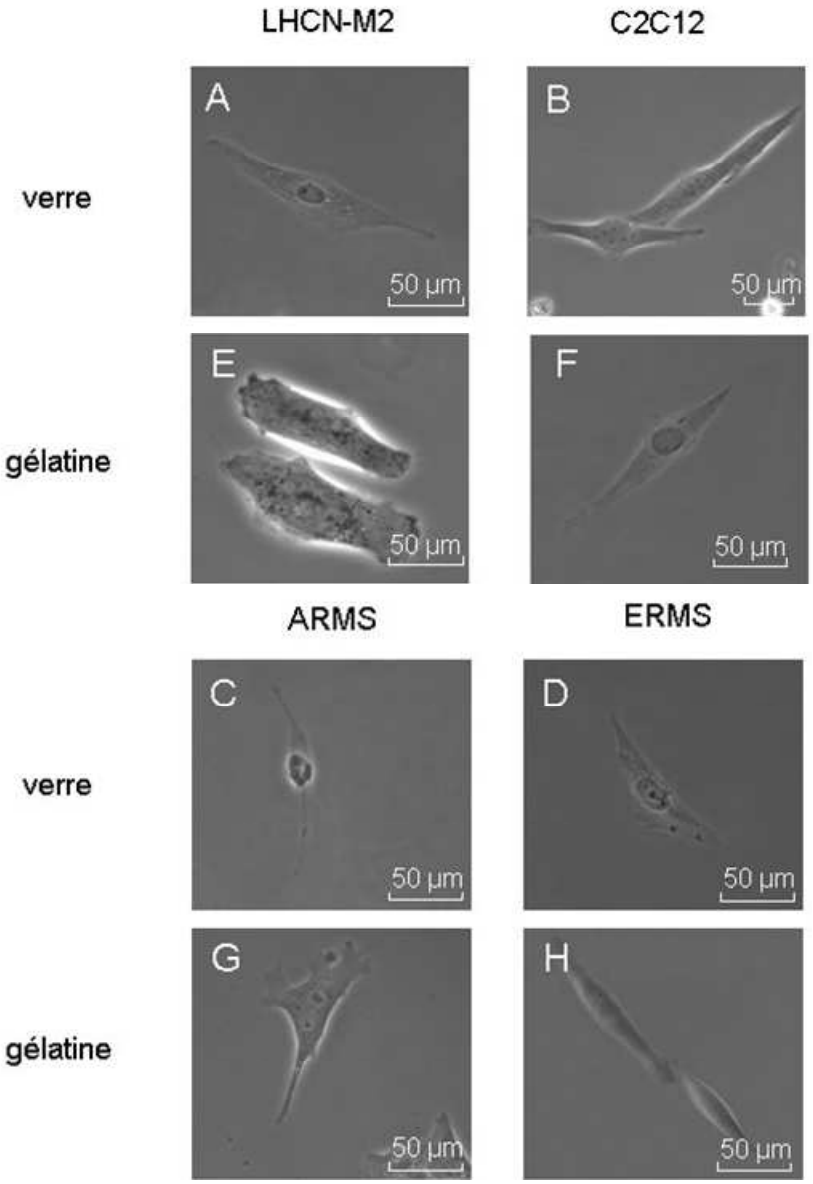

Figure 61 : Morphologie des différents types cellulaires en migration, sur verre ou gélatine. Les images ont été prises plus de 8 heures après ensemencement, lorsque toutes les cellules ont adhéré, avec un microscope inversé Leica, en contraste de phase.
LHCN-M2, C2C12, ARMS et ERMS migrant sur verre (A, B, C et D, respectivement) et sur gélatine (E, F, G et H, respectivement).
Les échelles de taille représentent 50 µm. Les résultats sont représentatifs de la population cellulaire d'au moins trois expériences différentes.

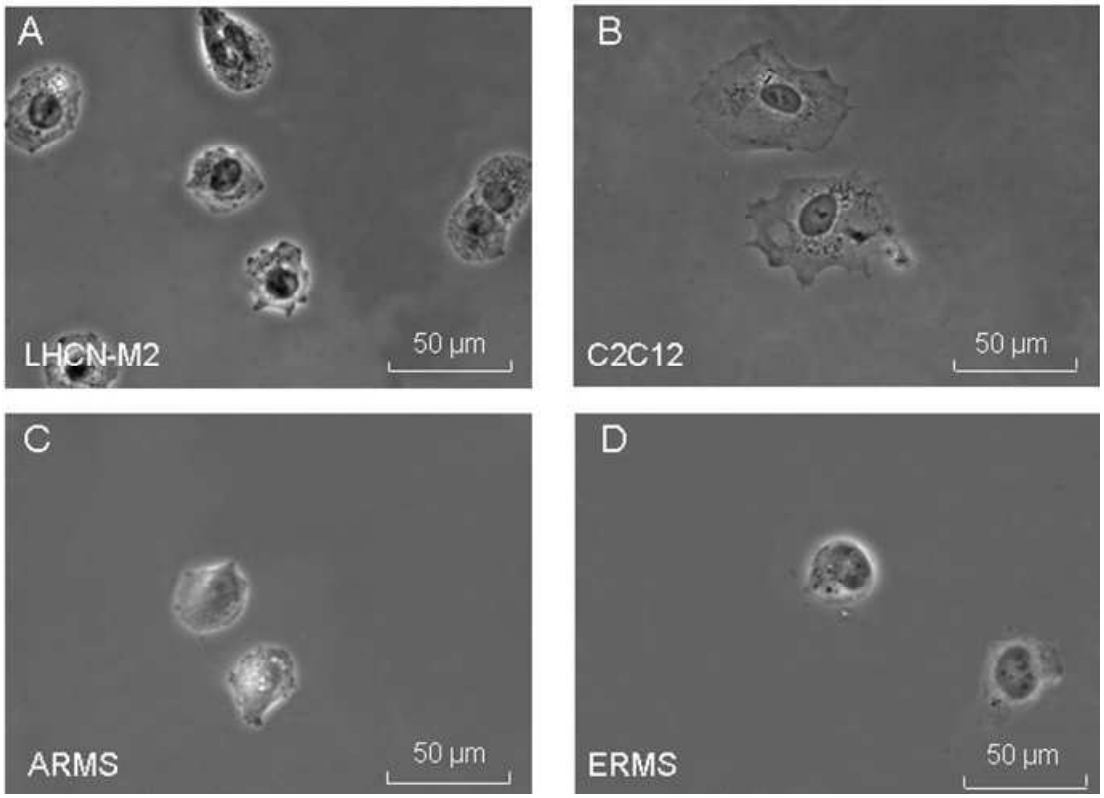

Figure 62 : Morphologie des différents types cellulaires en migration, après inhibition des calpaïnes. Les images ont été prises plus de 8 heures après ensemencement, sur verre, lorsque toutes les cellules ont adhéré, avec un microscope inversé Leica, en contraste de phase.
LHCN-M2, C2C12, ARMS et ERMS, après traitement avec de la calpeptine (50 µM), migrant sur verre (A, B, C et D, respectivement).
Les échelles de taille représentent 50 µm. Les résultats sont représentatifs de la population cellulaire d'au moins trois expériences différentes.

2. Désorganisation du cytosquelette dans les cellules tumorales

Le cytosquelette d'actine, moteur de la migration cellulaire est observé dans les différents types cellulaires (Figure 63).

Les LHCN-M2 ainsi que les C2C12 présentent un cytosquelette d'actine organisé en fibres de stress, parallèles à l'axe principal de la cellule (Figure 63A et B). Ces fibres soutiennent les extensions membranaires. Cet agencement est particulièrement marqué dans les myoblastes humains.

Contrairement aux cellules non-tumorales, le cytosquelette d'actine des RMS est désorganisé, il ne présente aucune fibre de stress (Figure 63C et D). L'actine F, localisée dans tout le cytoplasme des cellules tumorales, présente, tout de même, une concentration préférentielle au niveau de la périphérie cellulaire.

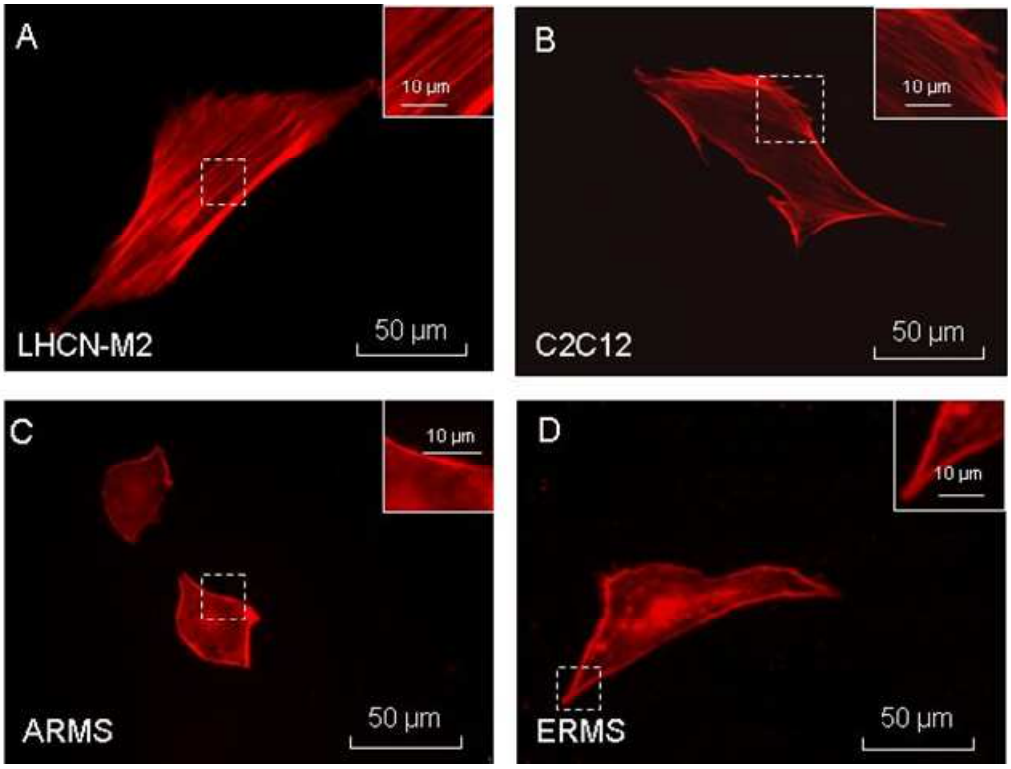

Figure 63 : Observation du cytosquelette d'actine des différentes lignées cellulaires en migration. Les cellules sont cultivées pendant 48 heures dans du milieu de quiescence. Après fixation et perméabilisation, le cytosquelette d'actine est marqué avec de la phalloïdine-TRITC dans les différents types cellulaires : LHCN-M2, C2C12, ARMS et ERMS (A, B, C et D, respectivement). Les échelles de taille représentent 10 et 50 µm. Les résultats sont représentatifs de la population cellulaire d'au moins trois expériences différentes.

3. Implication des calpaïnes dans l'agencement du cytosquelette

L'inhibition des calpaïnes par l'ajout de calpeptine à une concentration de 50 µM, au milieu de culture, entraîne une modification du cytosquelette d'actine des différents types cellulaires (Figure 64).

Dans les LHCN-M2 ainsi que dans les C2C12, l'actine F n'est plus organisée en fibres, au centre de la cellule ; elle reste structurée en fibre de stress uniquement en périphérie cellulaire où elle se concentre (Figure 64A et B).

Dans les RMS, l'inhibition des calpaïnes accentue la concentration de l'actine F en périphérie de la cellule (Figure 64C et D).

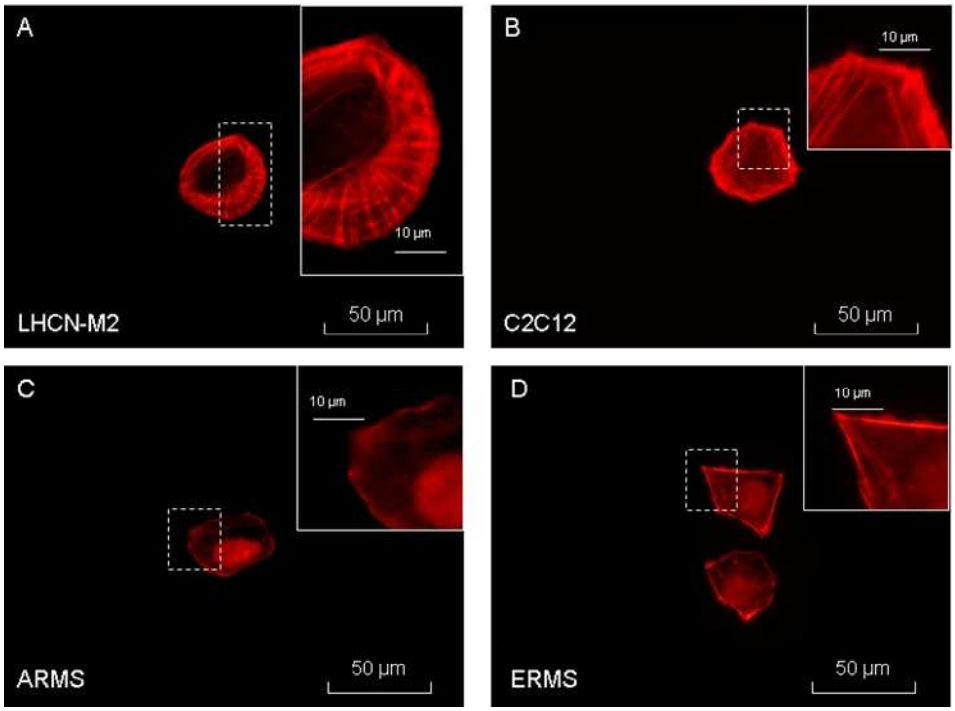

Figure 64 : Observation du cytosquelette d'actine des différentes lignées cellulaires en migration, après traitement avec de la calpeptine. Les cellules sont cultivées pendant 48 heures dans du milieu de quiescence. Quatre heures avant la fixation, de la calpeptine est ajoutée au milieu de culture, à une concentration de 50 µM. Après fixation et perméabilisation des cellules, le cytosquelette d'actine est marqué avec de la phalloïdine-TRITC dans les LHCN-M2, C2C12, ARMS et ERMS traitées avec de la calpeptine (A, B, C et D, respectivement).
Les échelles de taille représentent 10 et 50 µm. Les résultats sont représentatifs de la population cellulaire d'au moins trois expériences différentes.

4. Régulation du cytosquelette d'actine par les calpaïnes

L'inhibition des calpaïnes ayant un impact sur l'agencement du cytosquelette, la quantification de l'actine F est réalisée en présence et en absence de calpeptine (Figure 65).

Quelque soit le type cellulaire, l'inhibition des calpaïnes, par la calpeptine, induit une augmentation de la quantité d'actine F. Cette augmentation est de 19% pour les LHCN-M2, de 24% pour les C2C12, de 12% pour les ARMS et de 17% pour les ERMS.

Ce résultat est confirmé par l'effet de l'inhibition des calpaïnes par l'inhibiteur III, inhibiteur plus spécifique que la calpeptine, sur la quantité d'actine F des ARMS (Figure 66). Cette inhibition entraîne une augmentation de 17,86$\pm$3% (n=3) de la quantité d'actine polymérisée (t-test $p<0,01$).

La régulation de la polymérisation de l'actine F impliquant les calpaïnes et la µ-calpaïne ayant une localisation en fibre dans les LHCN-M2, rappelant l'organisation de leur cytosquelette, la colocalisation de l'actine F et de la µ-calpaïne est effectuée dans les LHCN-M2 ainsi que dans les ARMS (Figure 67). La colocalisation de l'actine F, marquée avec de la phalloïdine-FITC (vert) et de la µ-calpaïne (rouge), apparaît en jaune sur les figures 68A et C, dans les LHCN-M2 et E et G dans les ARMS.

Dans les LHCN-M2, µ-calpaïne et actine F colocalisent à plus de 93% (la F-actine a la même localisation que la µ-calpaïne à 93,22$\pm$0,51% et la µ-calpaïne a la même localisation que la F-actine à 93,19$\pm$1,03%). Les fibres de stress d'actine sont associées à un pic de concentration de la µ-calpaïne (Figure 67B). Ainsi, dans les LHCN-M2, la µ-calpaïne est-elle associée aux fibres de stress présentes de manière homogène dans le cytoplasme de la cellule. L'inhibition de l'activité calpaïne par l'ajout de calpeptine, à une concentration de 50 µM, entraîne un réarrangement du cytosquelette d'actine central, les fibres de stress périphériques étant conservées. Ce réarrangement du cytosquelette est associé à la relocalisation de la µ-calpaïne (Figure 67C et D). Ainsi, en présence de calpeptine, la µ-calpaïne colocalise-t-elle toujours avec la F-actine.

Tout comme dans les LHCN-M2, dans les ARMS, μ-calpaïne colocalise et cytosquelette d'actine colocalisent (Figure 67E et 67F), mais la colocalisation est moindre (la F-actine a la même localisation que la μ-calpaïne à 66,59±3,45% et la μ-calpaïne a la même localisation que la F-actine à 46,67±2,88%). Comme observé dans les LHCN-M2, l'ajout de calpeptine dans le milieu de culture entraîne une relocalisation de l'actine F et de la μ-calpaïne en périphérie de la cellule (Figure 67G et H).

Les calpaïnes sont donc impliquées dans l'agencement du cytosquelette d'actine et leur inhibition entraîne une augmentation de la quantité d'actine polymérisée. Cette augmentation d'actine F peut être due à une augmentation de la synthèse de monomères d'actine, à une stimulation de la polymérisation ou une inhibition de la dépolymérisation des filaments d'actine. Afin de privilégier l'une ou l'autre de ces hypothèses, l'expression de l'α- et de la β-actine a été quantifiée, en présence et en absence de calpeptine (Figure 68 ainsi que suite à un traitement avec des oligonucléotides antisens dirigés contre la μ-calpaïne ou le m-calpaïne (Figure 68).
L'inhibition des calpaïnes par la calpeptine (80 μM), entraîne une augmentation significative, de 51% et 47% de la quantité d'α-actine dans les LHCN-M2 et les C2C12, respectivement (Figure 68). Au contraire, cette inhibition entraîne une diminution significative de l'α-actine, de 38%, dans les ARMS. De même, l'inhibition des calpaïnes entraîne dans les LHCN-M2 ainsi que dans les C2C12, une augmentation significative de la β-actine de 33% et 22%, respectivement et une diminution significative, de 15% dans les ARMS (Figure 68B).
La transfection d'antisens oligonucléotides dirigés contre la μ-calpaïne entraîne dans les LHCN-M2 une augmentation significative de l'α-actine, de 17%. Cependant, la transfection d'oligonucléotides antisens dirigés contre la m-calpaïne entraîne, dans ces cellules, une diminution significative de la quantité d'α-actine, de plus de 20% (Figure 68C). Dans les ARMS, quelque soit la calpaïne inhibée, la quantité d'α-actine est diminuée (diminution de 69%, lorsque la μ-calpaïne est inhibée et de 61% lorsque la m-calpaïne est inhibée) (Figure 68D).
Dans les LHCN-M2, seule la transfection d'oligonucléotides antisens dirigé contre la m-calpaïne affecte la quantité de β-actine (Figure 68E), entraînant une

augmentation de plus de 17%. Dans les ARMS, quelque soit la calpaïne inhibée, la quantité de β-actine diminue (diminution de 22% et de 10% lorsque la μ-calpaïne et m-calpaïne sont respectivement inhibées) (Figure 68).

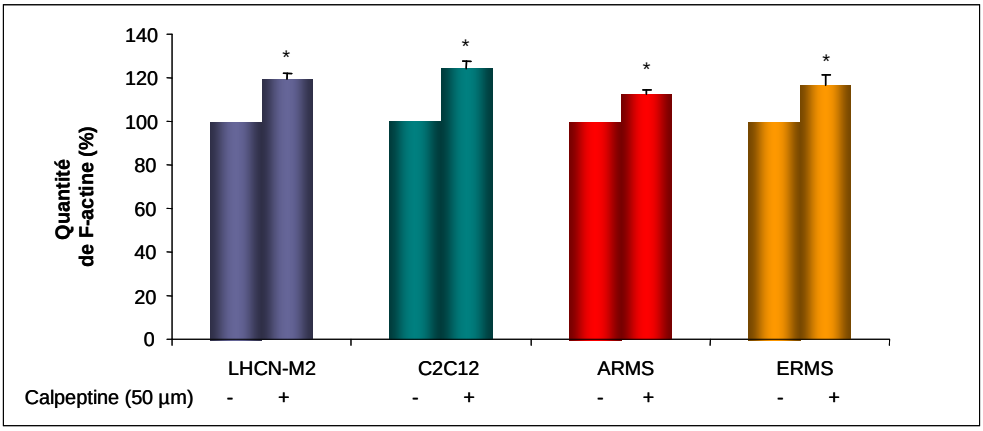

Figure 65 : Quantité d'actine F dans les différents types cellulaires, après traitement ou non avec de la calpeptine. Les cellules sont cultivées pendant 48 heures dans du milieu de quiescence. Quatre heures avant la fixation, de la calpeptine est ajoutée au milieu de culture, à une concentration de 50 µM. Après fixation et perméabilisation des cellules, le cytosquelette d'actine est marqué avec de la phalloïdine-TRITC. La quantité d'actine F est quantifiée (dans plus de 100 cellules par condition) à l'aide du logiciel *Metamorph* ; la taille des cellules a été prise en compte.
Les résultats sont exprimés en pourcentage de quantité d'actine F par rapport aux cellules non traitées avec de la calpeptine.
Les barres d'erreurs représentent les e.s.m. calculées sur trois expériences indépendantes.
* : significativement différent du témoin non traité ($p<0,05$).

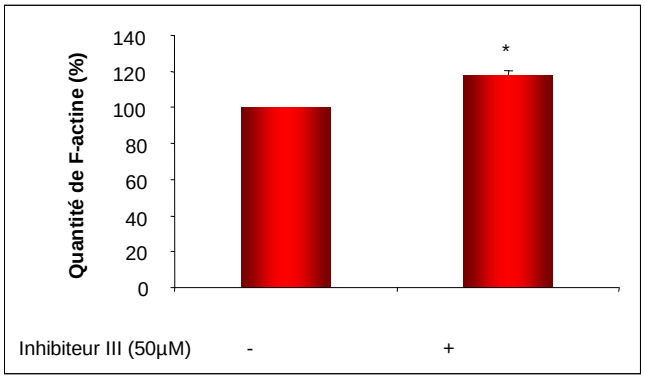

Figure 66 : Quantité d'actine F dans les ARMS, après traitement ou non avec l'inhibiteur III.
Les ARMS sont cultivées pendant 48 heures dans du milieu de quiescence. Quatre heures avant la fixation, de l'inhibiteur III est ajouté au milieu de culture, à une concentration de 50 µM. Le cytosquelette d'actine est marqué avec de la phalloïdine-TRITC. La quantité d'actine F est quantifiée (dans plus de 100 cellules par condition) à l'aide du logiciel *Metamorph* ; la taille des cellules a été prise en compte.
Les résultats sont exprimés en pourcentage de quantité d'actine F par rapport aux cellules non traitées avec de l'inhibiteur III.
Les barres d'erreurs représentent les e.s.m. calculées sur trois expériences indépendantes.
* : significativement différent du témoin non traité ($p<0,05$).

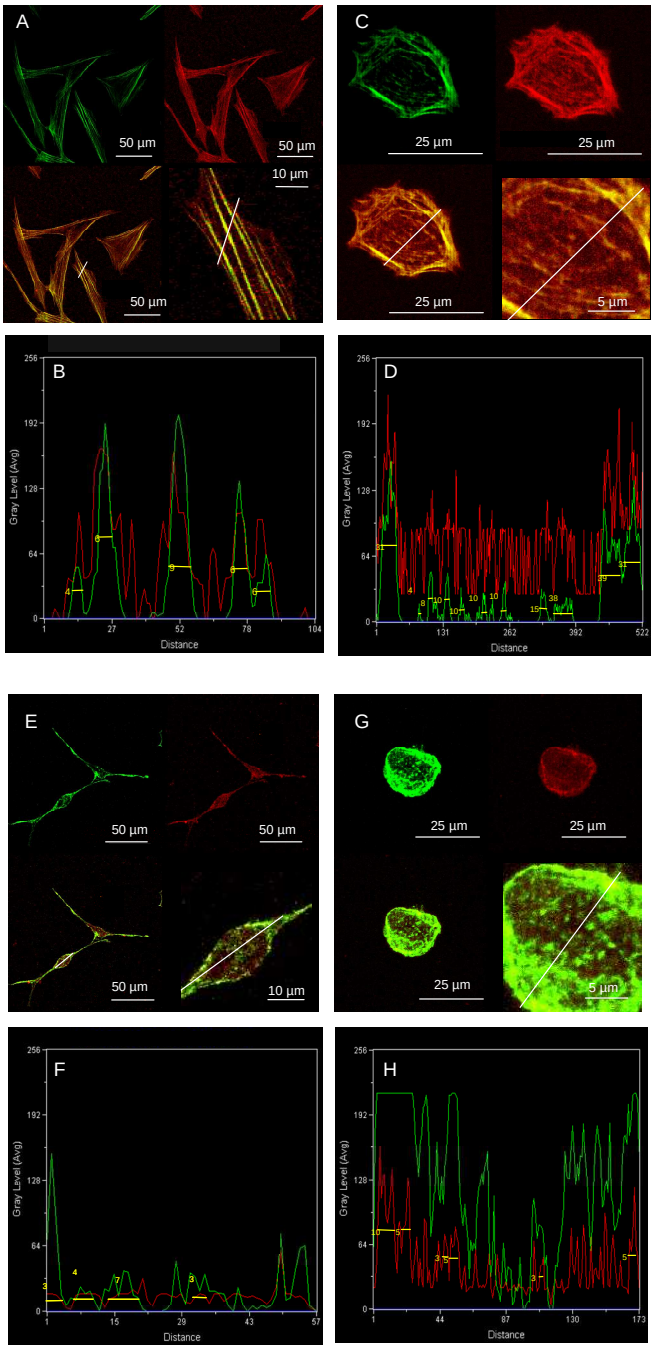

Figure 67 : Colocalisation de la µ-calpaïne avec l'actine F dans les LHCN-M2 et les ARMS, après traitement ou non avec la calpeptine. Colocalisation de la µ-calpaïne (rouge) et de la F-actine (vert) et quantification de cette colocalisation *via* le logiciel *Metamorph* dans les LHCN-M2 en absence de traitement calpeptine (A et B) et après traitement avec la calpeptine (50 µM) (C et D). Colocalisation de la µ-calpaïne (rouge) et de la F-actine (vert) et quantification de cette colocalisation *via* le logiciel *Metamorph* dans les ARMS en absence de traitement calpeptine (E et F) et après traitement avec la calpeptine (50 µM) (G et H).
Dans les figures B, D, F et H, une largeur de pic, au niveau de la zone de recouvrement des deux courbes, supérieure à 2 pixels illustre une colocalisation de la µ-calpaïne et de la F-actine (ligne jaune). Les nombres jaunes indiquent le nombre de pixels entre les limites de la zone de recouvrement (longueur en pixels des lignes jaunes).
Les images ont été prises à l'aide d'un microscope confocal Leica DMI 6000.
Les échelles de taille représentent 5, 10, 25 et 50 µm. Les résultats sont représentatifs de la population cellulaire d'au moins trois expériences différentes.

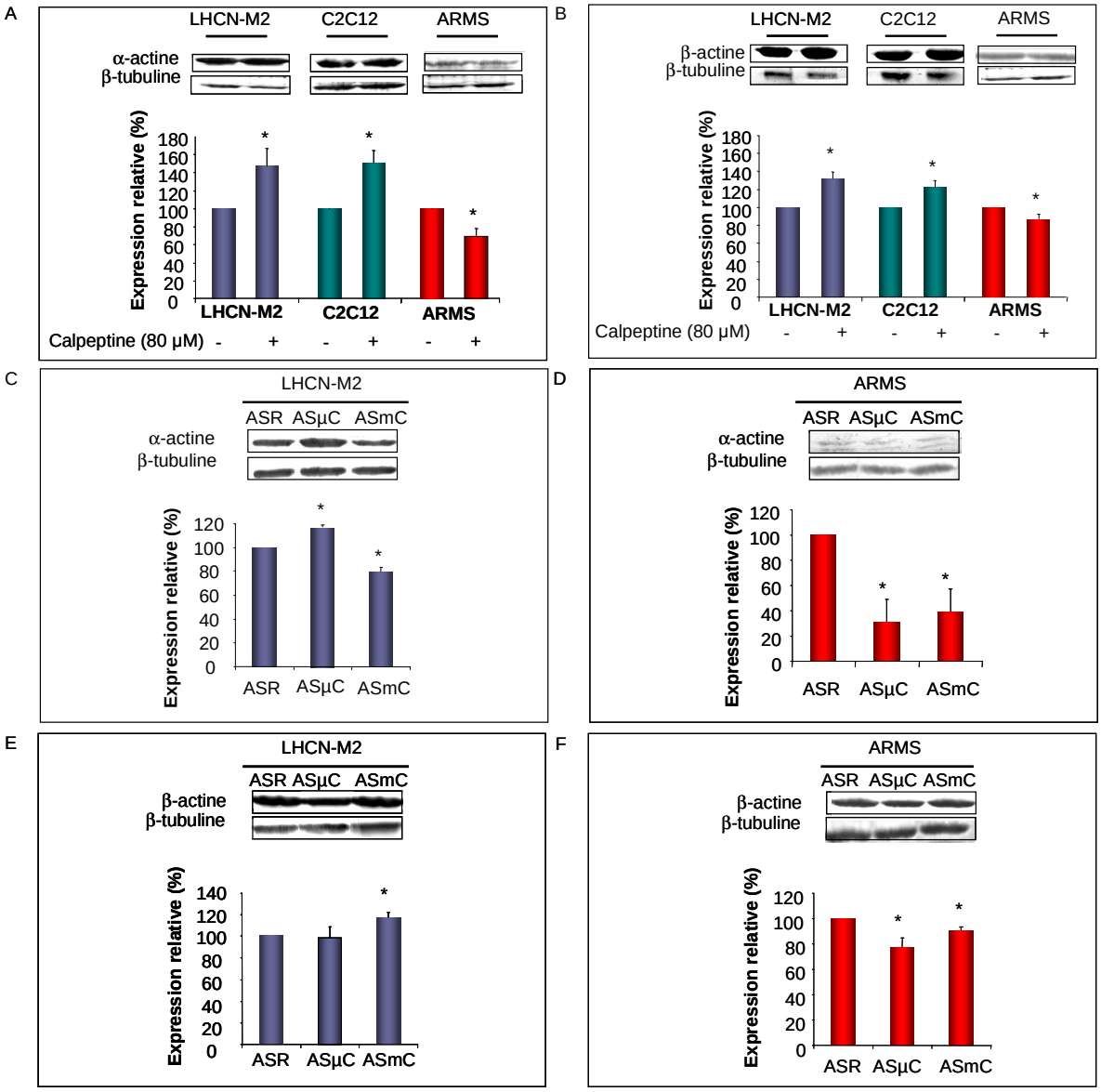

Figure 68 : Effet de l'inhibition des calpaïnes sur l'expression de l'α-actine et de la β-actine, dans les LHCN-M2, les C2C12 et les ARMS. Expression de l'α-actine et de la β-actine dans les LHCN-M2, les C2C12 et les ARMS, traitées ou non avec de la calpeptine (80 µM) (A et B, respectivement). Expression de l'α-actine et de la β-actine, dans les LHCN-M2 (C et E, respectivement) et les ARMS (D et F, respectivement) transfectées avec des oligonucléotides antisens dirigés contre la µ-calpaïne ou la m-calpaïne.
Les résultats sont exprimés en pourcentage de quantité d'actine (α ou β) par rapport aux cellules non traitées.
Les barres d'erreurs représentent les e.s.m. calculées sur au moins trois expériences indépendantes.
* : significativement différent du témoin non traité ($p<0,05$).
Les valeurs numériques des résultats ainsi que des t-tests sont présentées dans le chapitre Annexes, Tableaux 16 et 17.

5. Cytosquelette d'actine et calpaïnes : nouvelle piste

La transfection de la tropomyosine α, stabilisateur des filaments d'actine F et substrat des calpaïnes, entraîne au niveau du cytosquelette des ARMS, des modifications (Figure 69). En effet, la quantité d'actine semble plus élevée dans les cellules transfectées. De plus, en première approximation, deux tiers des cellules transfectées par la tropomyosine α présentent des fibres de stress.

La formation de ces fibres de stress engendrée par la tropomyosine α pourrait avoir des conséquences sur l'adhésion, la migration ainsi que sur la capacité invasive des RMS. Il est possible que cette transfection entraîne une diminution du phénotype tumorale au profit d'un phénotype plus physiologique.

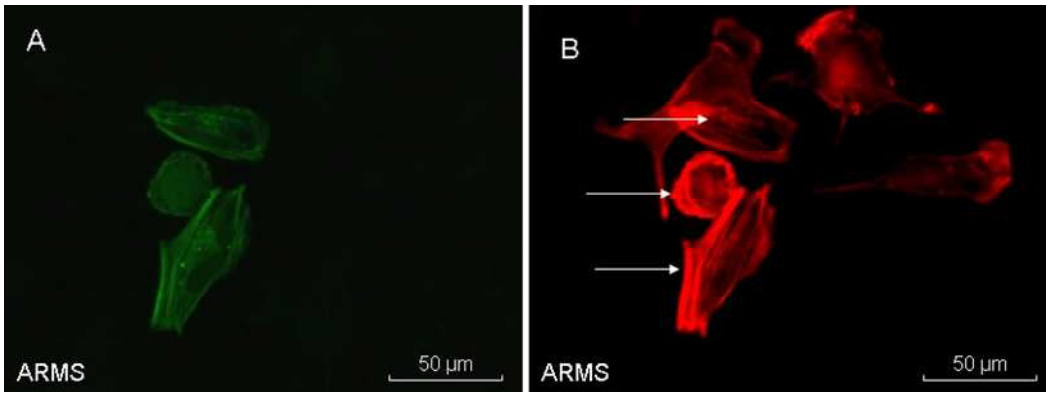

Figure 69 : Observation des modifications du cytosquelette d'actine des ARMS (rouge), après transfection de la tropomyosine α (vert) .
Les échelles de taille représentent 50 µm. Les flèches blanches indiquent les cellules transfectées. Les résultats sont représentatifs de la population cellulaire d'au moins trois expériences différentes.

CHAPITRE 4 : IMPLICATION DES CALPAÏNES DANS LA MIGRATION

1. Caractéristiques cinétiques des RMS comparées aux cellules non-tumorales

Les calpaïnes étant impliquées dans la régulation de l'organisation du cytosquelette d'actine et ayant une activité élevée dans les cellules tumorales, leur implication dans la migration, une des étapes clefs de la dissémination métastatique a été étudiée. Les caractéristiques cinétiques des différentes lignées cellulaires ont été déterminées pour être ensuite comparées à ces mêmes caractéristiques, en présence de calpeptine.

Ainsi, les vitesses de migration des différents types cellulaires ont-elles été déterminées sur verre (témoin de migration) et sur gélatine (substrat permettant une meilleure adhésion des cellules) (Figure 70).

Les ARMS migrent respectivement, 2,2 et 2,5 fois plus vite que les LHCN-M2, sur verre et gélatine. Les ERMS migrent respectivement 1,6 et 1,5 fois plus vite que les LHCN-M2 sur verre et gélatine. De plus, tous les types cellulaires migrent plus vite sur verre que sur gélatine.

Les LHCN-M2 et les C2C12 migrent à la même vitesse sur un même substrat de migration.

La répartition des vitesses en fonction du nombre de cellules confirme que les RMS migrent plus vite que les cellules non-tumorales aussi bien sur verre que sur gélatine (Figure 71A et B). Le nombre de C2C12 et de LHCN-M2 est plus important dans les faibles vitesses. De plus, les courbes de répartition des vitesses pour les ARMS étant plus étendues que pour les autres types cellulaires, elles indiquent une hétérogénéité dans les vitesses de migration dans la population de cette lignée.

L'analyse des trajectoires individuelles indique que les cellules migrent de manière différente en fonction du type cellulaire mais aussi en fonction du substrat (Figure 71C). En effet, bien que les LHCN-M2 migrent moins vite sur gélatine, leur aire de dispersion est plus importante sur ce dernier substrat que sur le verre (Figure 71C-1 *vs.* 71C-2) contrairement aux C2C12 qui migrent plus loin sur verre que sur gélatine

(Figure 71C-3 *vs.* 71C-4). Tout comme les C2C12, les ARMS et les ERMS migrent plus loin sur verre que sur gélatine (Figure 71C-5 et C-7 *vs.* 71C-6 et C-7).

Enfin, la détermination de Δ[1], représentant la capacité dispersive, indique que cette dernière est elle aussi fonction du type cellulaire mais aussi du substrat de migration (Figure 71D-1 et D-2). Sur verre, les ARMS ont une capacité dispersive beaucoup plus importante que les autres types cellulaires. Sur gélatine, les C2C12 ainsi que les ERMS présentent une faible capacité dispersive contrairement aux LHCN-M2 et aux ARMS. Sur ce substrat de migration, les ARMS possèdent toujours la capacité dispersive la plus importante.

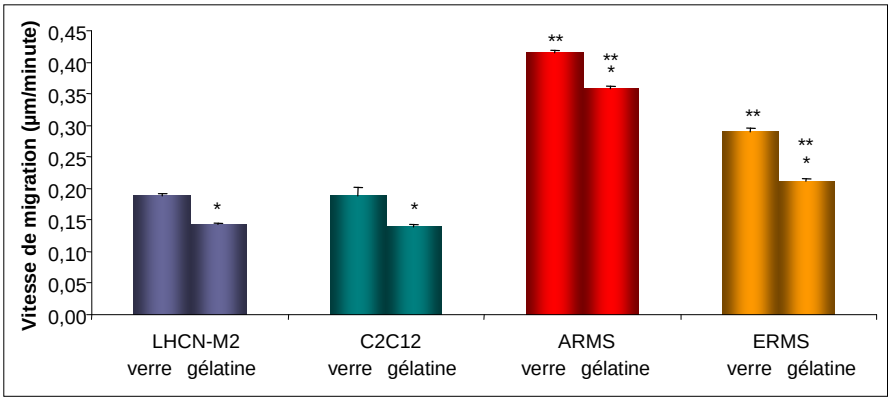

Figure 70 : Vitesse de migration des différents types cellulaires sur verre et gélatine. Les cellules sont cultivées pendant 48 heures dans du milieu de quiescence sur verre ou sur gélatine. Les images sont obtenues avec un microscope inversé Leica, en contraste de phase. Huit heures après ensemencement, le déplacement cellulaire est enregistré pendant 18 heures (une image toutes les 15 minutes). Les vitesses de migration sont obtenues *via* l'analyse par le logiciel *Metamorph*.
Les barres d'erreurs représentent les e.s.m. calculées sur au moins trois expériences indépendantes.
* : significativement différent du témoin migrant sur verre ($p<0,05$).
** : significativement différent du témoin LHCN-M2 migrant sur le même substrat ($p<0,05$).
Les valeurs numériques des résultats ainsi que des t-tests sont présentées dans le chapitre Annexes, Tableaux 18.

[1] Δ représente la distance entre la localisation initiale de la cellule et sa localisation à la fin des 18 heures d'enregistrement.

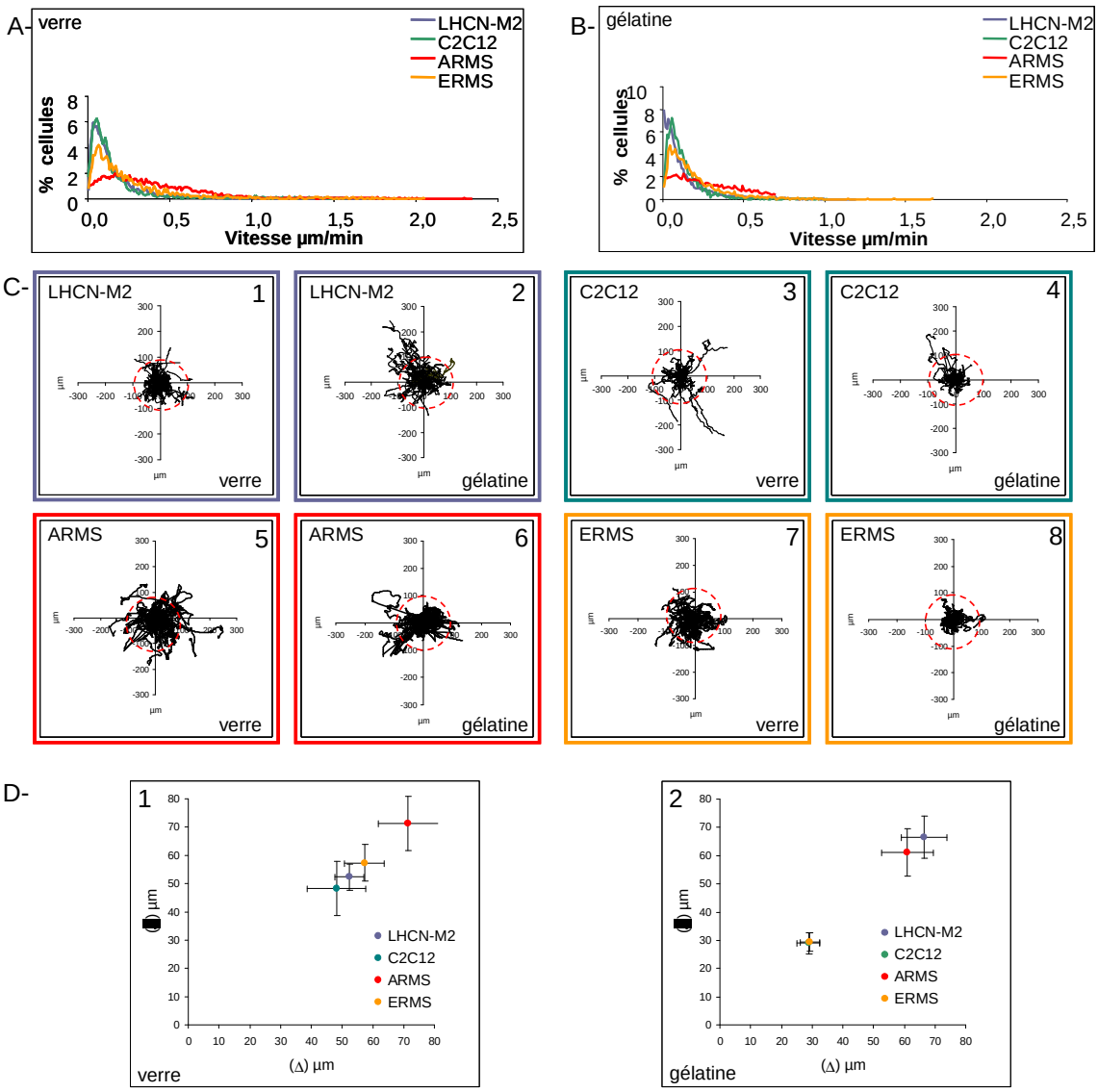

Figure 71 : Caractéristiques cinétiques des différents types cellulaires sur verre et gélatine.
Répartition des vitesses sur verre (A) et sur gélatine (B) des différents types cellulaires.
Aires de dispersion pour les LHCN-M2, C2C12, ARMS et ERMS sur verre (C1, 3, 5, 7, respectivement) et sur gélatine (C2, 4, 6, 8, respectivement).
Représentation graphique de Δ, distance séparant la localisation initiale de la cellule et sa localisation à la fin des 18 heures d'enregistrement, pour les LHCN-M2, C2C12, ARMS, ERMS sur verre (D1) et sur gélatine (D2).
La répartition des vitesses a été obtenue avec les moyennes des vitesses d'au moins 200 cellules par type cellulaire et par condition de migration.
Les aires de dispersion ont été établies avec plus de 40 cellules par type cellulaire et par condition de migration, de même Δ a été déterminée à partir de plus de 200 cellules.

2. Implication des calpaïnes

Les caractéristiques cinétiques ayant été définies pour les différents types cellulaires, leur régulation par les calpaïnes a été mise en évidence.
L'inhibition de l'activité calpaïne, par ajout dans le milieu de migration de 50 µM de calpeptine, induit une diminution des vitesses de migration pour tous les types cellulaires, indépendamment du substrat, hormis pour les LHCN-M2 migrant sur gélatine (Figure 72). Cette diminution est la plus marquée pour les ARMS avec une diminution de 60% sur verre et de 65% sur gélatine.
La répartition des vitesses des différents types cellulaires en présence ou non de calpeptine confirme qu'il y a plus de cellules dans les faibles vitesses en présence de calpeptine (Figure 73). De plus, sur gélatine, l'inhibition des calpaïnes dans les ARMS rend la population cellulaire moins hétérogène.
L'établissement des trajectoires individuelles montre que pour tous les types cellulaires, l'inhibition de l'activité calpaïne induit une diminution de l'aire de dispersion des cellules, cette diminution est cependant plus marquée pour les LHCN-M2 et les ARMS (Figure 74A).
La détermination de Δ confirme que l'inhibition des calpaïnes induit une diminution de la capacité dispersive de tous les types cellulaires, à l'exception des capacités dispersives des C2C12 et des ERMS migrant sur gélatine (Figure 74B). Suite à l'inhibition des calpaïnes, la capacité dispersive des LHCN-M2 diminue de 35% et 68% sur verre et gélatine, respectivement. La capacité dispersive des C2C12 sur verre diminue de 67%, celle des ARMS diminue de 44% et 67% sur verre et gélatine, respectivement. Enfin, la capacité dispersive des ERMS sur verre diminue de 49% en présence de calpeptine.

Ainsi, l'inhibition des calpaïnes entraîne-t-elle une diminution des caractéristiques cinétiques (vitesse, aire de dispersion et capacité dispersive) dans les différents types cellulaires. Les calpaïnes jouent donc un rôle dans la régulation de ces caractéristiques. De plus, le rôle des calpaïnes dans la migration des LHCN-M2, ARMS et ERMS est mis en évidence par l'existence d'un lien entre la vitesse de

migration des cellules et l'activité calpaïne. En effet, il existe une corrélation linéaire positive entre ces deux valeurs (Figure 75). Le coefficient de linéarité proche de 1 marque l'étroit lien entre ces deux données.

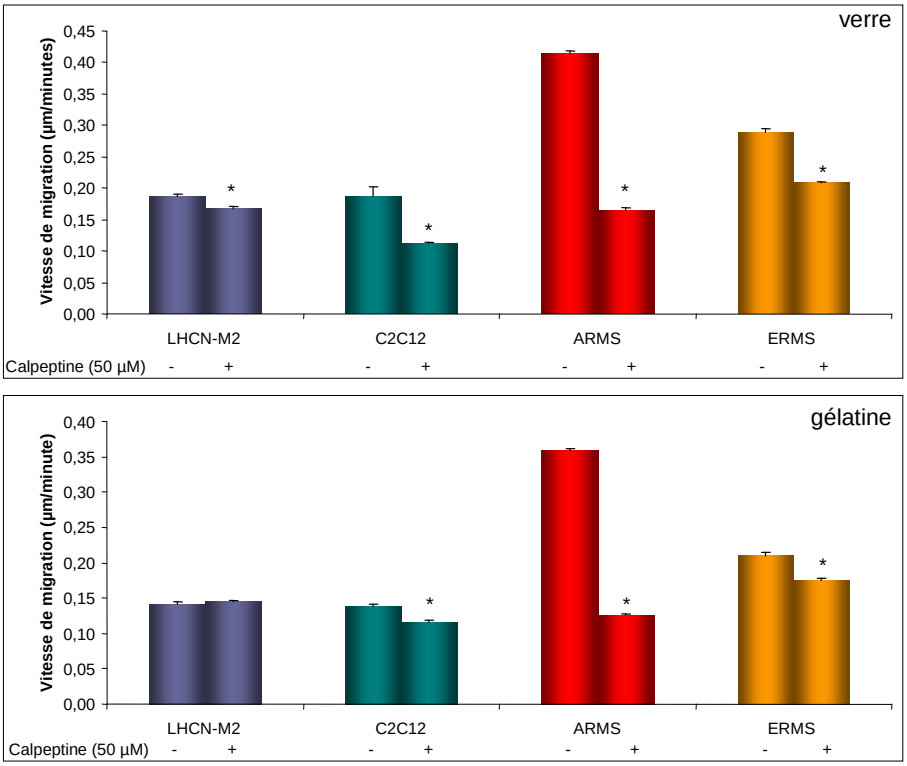

Figure 72 : Vitesse de migration des différents types cellulaires traités ou non par la calpeptine, sur verre et gélatine. Les cellules sont cultivées pendant 48 heures dans du milieu de quiescence sur verre ou sur gélatine. Les images sont obtenues avec un microscope inversé Leica, en contraste de phase. Quatre heures après ensemencement, la calpeptine est ajoutée au milieu de culture, à une concentration de 50 µM. Huit heures après ensemencement, le déplacement cellulaire est enregistré pendant 18 heures (une image toutes les 15 minutes). Les vitesses de migration sont obtenues *via* l'analyse par le logiciel *Metamorph*.
Les barres d'erreurs représentent les e.s.m. calculées sur au moins trois expériences indépendantes.
* : significativement différent du témoin migrant sur verre ($p<0,05$).
Les valeurs numériques des résultats ainsi que des t-tests sont présentées dans le chapitre Annexes, Tableaux 19.

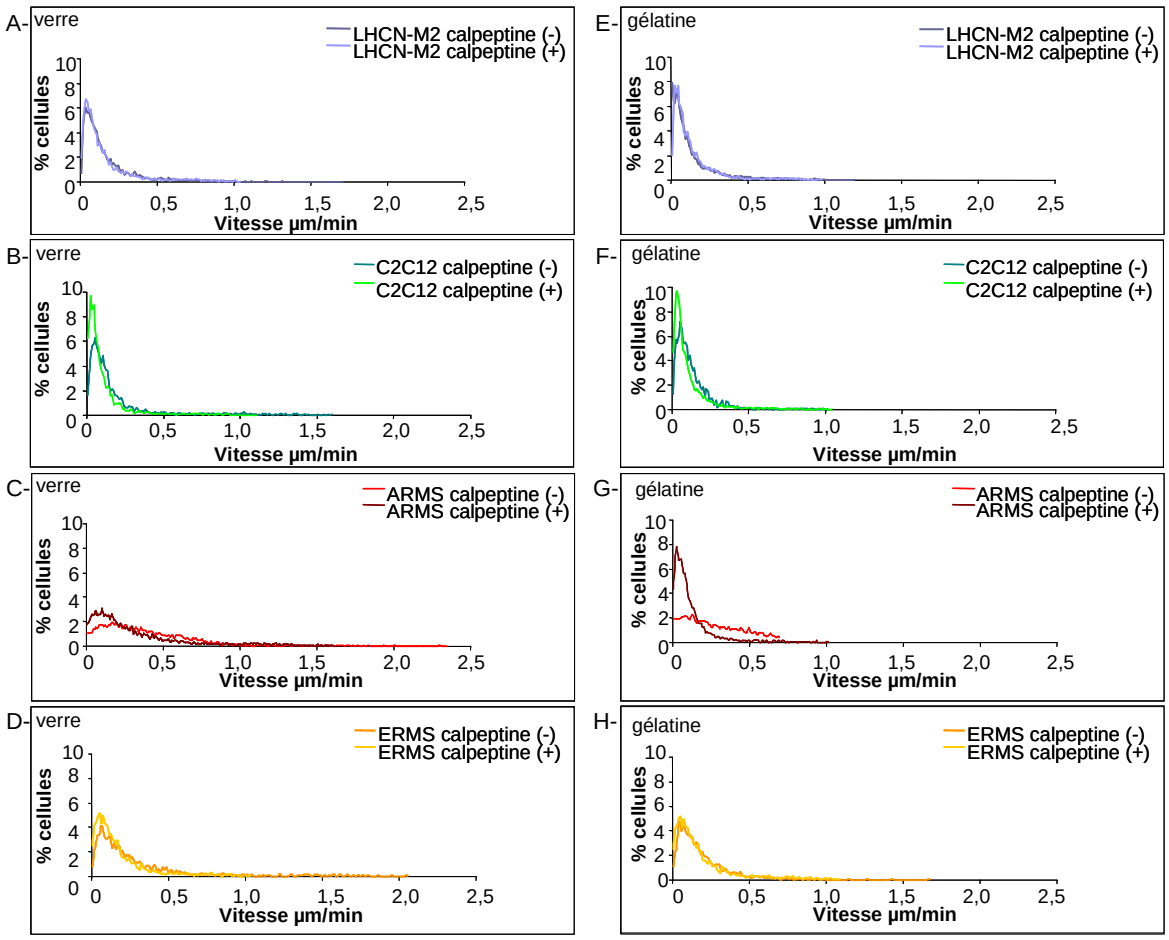

Figure 73 : Répartition des vitesses des différents types cellulaires traités ou non avec de la calpeptine sur verre et gélatine. Répartition des vitesses des LHCN-M2, C2C12, ARMS et ERMS sur verre (A, B, C et D, respectivement) et sur gélatine (E, F, G, et H, respectivement).
La calpeptine est ajoutée au milieu de quiescence 4 heures avant le début de l'enregistrement, à une concentration de 50 µM.
La répartition des vitesses a été obtenue avec les moyennes des vitesses d'au moins 200 cellules par type cellulaire et par condition de migration.

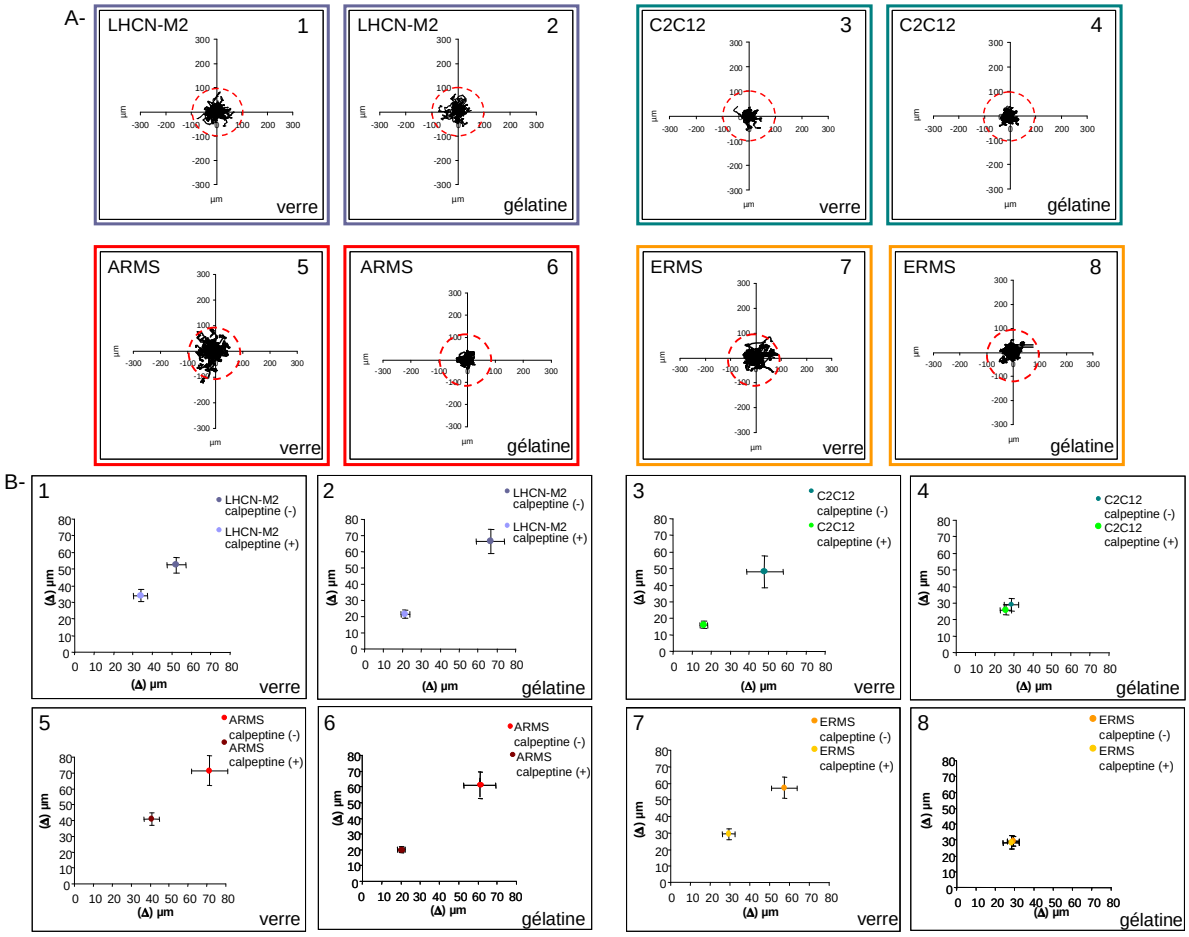

Figure 74 : Caractéristiques cinétiques des différents types cellulaires traités ou non avec de la calpeptine sur verre et gélatine. Aires de dispersion pour les LHCN-M2, C2C12, ARMS et ERMS, traitées ou non avec de la calpeptine, sur verre (A1, 3, 5 et 7, respectivement) et sur gélatine (A2, 4, 6 et 8, respectivement), établies à partir des trajectoires individuelles.
Représentation graphique de Δ, distance séparant la localisation initiale de la cellule et sa localisation à la fin des 18 heures d'enregistrement, pour les LHCN-M2, C2C12, ARMS, ERMS traitées ou non avec de la calpeptine sur verre (B1, 3, 5 et 7, respectivement) et sur gélatine (B2, 4, 6 et 8, respectivement).
Les aires de dispersion ont été établies avec plus de 40 cellules par type cellulaire et par condition de migration, de même Δ a été déterminée à partir de plus de 200 cellules.

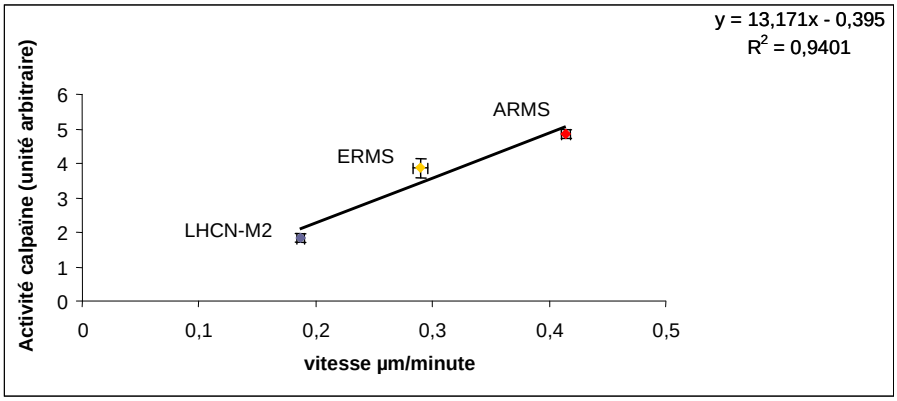

Figure 75 : Corrélation positive linéaire entre l'activité calpaïne et la vitesse de migration des différentes lignées cellulaires. L'activité calpaïne des LHCN-M2, ARMS et ERMS est reportée en ordonnées et la vitesse de migration sur verre, en abscisse.
L'équation de la droite est : $y=13,17x-0,39$.
Le coefficient de linéarité R^2 est de : 0,94.

CHAPITRE 5 : IMPLICATION DES CALPAÏNES DANS LA CAPACITE INVASIVE DES RMS

Les tests d'invasion réalisés avec les LHCN-M2, C2C12, ARMS et ERMS montrent que les RMS ont une capacité invasive significativement plus élevée que les cellules non-tumorales. Le taux d'invasion ainsi que l'indice d'invasion des ARMS sont environ 11 fois plus élevés que ceux des LHCN-M2 (Figure 76A et B). Les ERMS présentent un taux d'invasion ainsi qu'un indice d'invasion plus de 12 fois supérieurs à ceux des LHCN-M2. Les C2C12, quant à elles, présentent un taux et un indice d'invasion eux aussi supérieurs à ceux des LHCN-M2. Cette différence est cependant nettement moins marquée qu'entre les LHCN-M2 et les RMS.

L'inhibition des calpaïnes par la calpeptine induit une forte diminution du taux et de l'indice d'invasion des RMS (taux d'invasion : 6% et indice d'invasion : 0,8) (Figure 76A et B). Ces valeurs sont similaires de celles obtenues pour les cellules non-tumorales (p=0,56 et 0,45 pour le taux et l'indice d'invasion des ARMS, respectivement et p= 0,49 et 0,47 pour le taux et l'indice d'invasion des ERMS). Des résultats similaires sont retrouvés en présence d'inhibiteur III. Les calpaïnes jouent donc un rôle dans le pouvoir invasif des RMS.

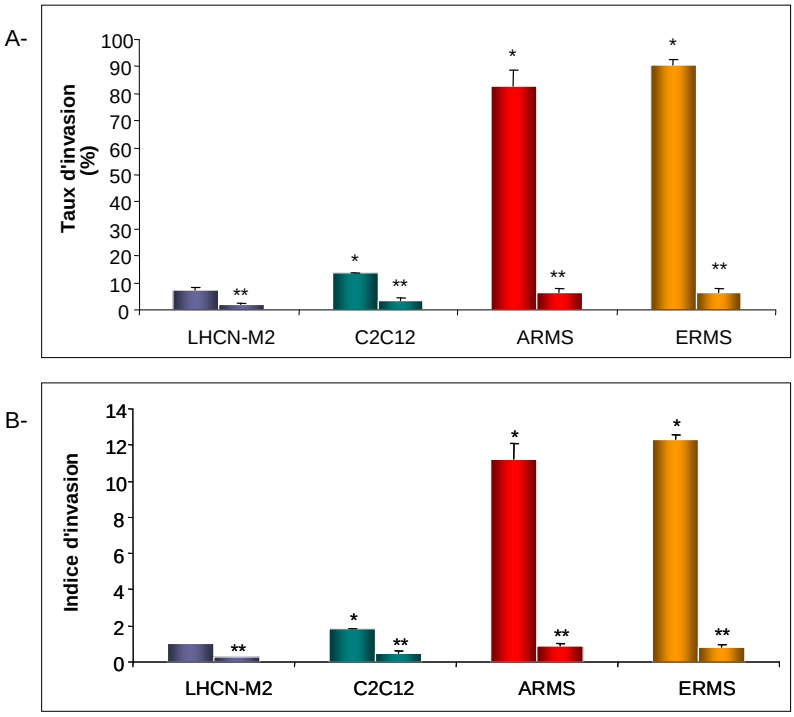

Figure 76 : Taux et indice d'invasion des différentes lignées cellulaires en présence ou non de calpeptine. Les cellules sont ensemencées dans des chambres de Boyden avec ou sans Matrigel sur la membrane PET. Après 48 heures d'incubation dans le milieu de quiescence, les cellules ayant traversé la membrane en présence ou en absence de Matrigel sont fixées, déshydratées, colorées à l'hémalun de Hansen puis, dénombrées.
Le taux d'invasion de chaque type cellulaire (A), est défini par le rapport entre le nombre de cellules ayant traversé la membrane avec Matrigel et le nombre de cellules ayant traversé la membrane sans Matrigel.
L'indice d'invasion (B) des C2C12 ainsi que celui des RMS est défini par le rapport entre le taux d'invasion de ces cellules et celui des cellules témoins, LHCN-M2.
Le taux ainsi que l'indice d'invasion sont déterminés en absence ou en présence de calpeptine (50 µM).
Les barres d'erreurs représentent les e.s.m. calculées sur au moins trois expériences indépendantes.
* : significativement différent des LHCN-M2 ($p<0,05$).
** : significativement différent des cellules non traitées avec de la calpeptine ($p<0,05$).
Les valeurs numériques des résultats des figures 54A et B ainsi que des t-tests sont présentées dans le chapitre Annexes, Tableaux 20 et 21.

CHAPITRE 6 : ANALYSE PROTEOMIQUE ET SPECTROMETRIE DE MASSE

Dans le but de déterminer des cibles potentielles des calpaïnes impliquées dans la faible adhésion, la migration et l'invasion élevée des RMS, une analyse protéomique a été réalisée. Le protéome des RMS en milieu de quiescence a été comparé à celui de RMS traités avec de l'inhibiteur III ou de la calpeptine, en gel 2D. Le nombre total de spots détectés est de 1154. Cinq spots ont été retenus (Figure 77).

Les spots retenus pour l'analyse en spectrométrie de masse sont les spots qui diffèrent significativement dans les deux conditions d'inhibition, en comparaison du témoin non-traité et dont la variation se fait dans le même sens (variation > 12%). La figure 78 présente les variations de chaque spot observées par rapport aux cellules témoins non-traitées avec un inhibiteur de l'activité calpaïne.

Les protéines de chaque spot ont été identifiées en spectrométrie de masse (Annexes Tableau 22). Après inhibition des calpaïnes, l'expression de la vimentine diminue. Il en est de même de l'expression de la ribonucléoprotéine hétérogène nucléaire H1 et H3, de la nestine, de la peptidyl-prolyl cis-trans isomérase, de la péroxyrédoxine 4, de la prohibitine, de la protéine ribosomale L12, de la sous-unité C de la ribonucléase H2 ainsi que de l'expression du facteur d'épissage SFPQ.

Les calpaïnes étant des endoprotéases, l'augmentation de certains spots était attendue. Les protéines identifiées par cette analyse ne sont donc pas des substrats des calpaïnes mais des cibles régulées indirectement par ces dernières.

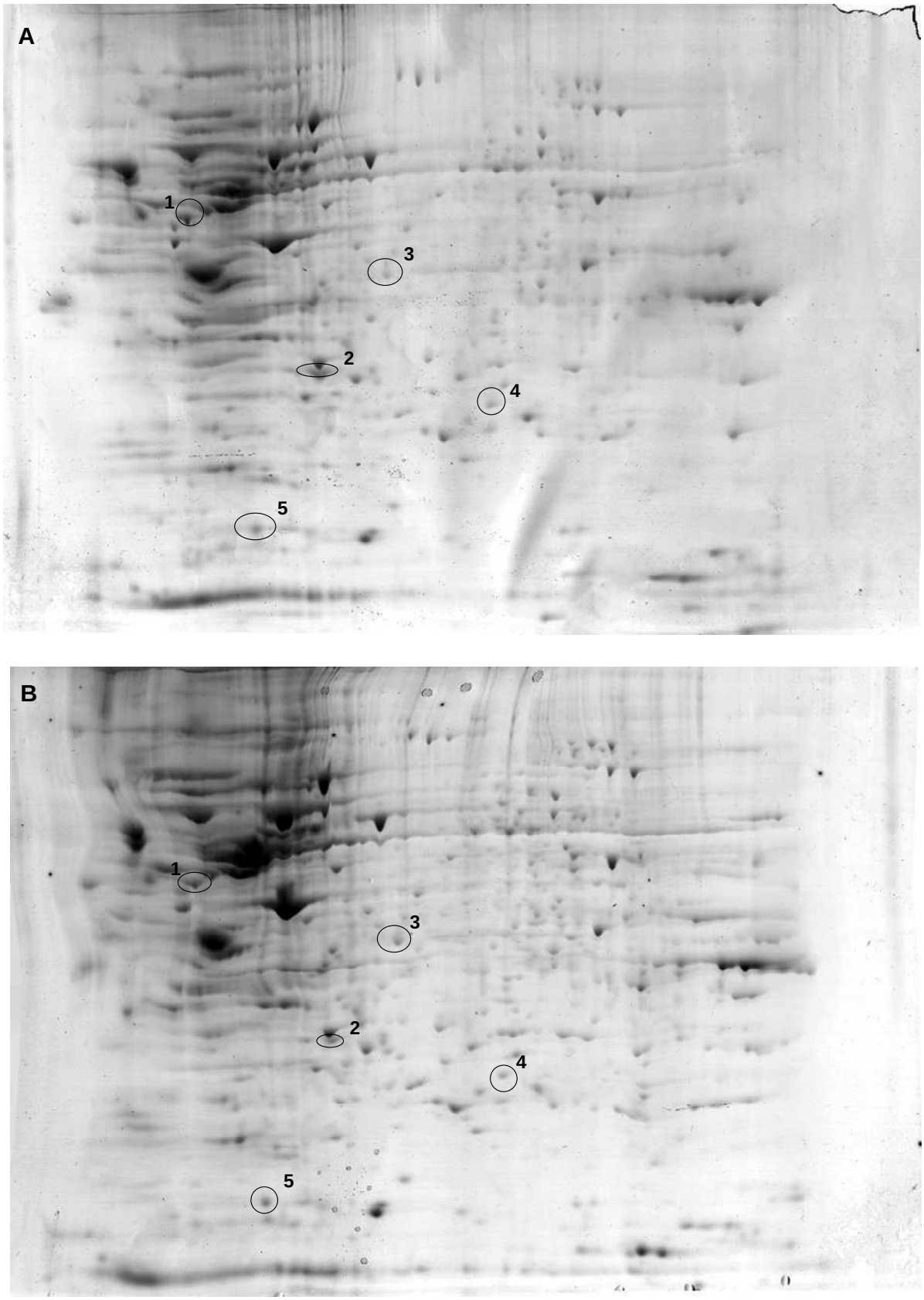

Figure 77 : Gel 2D protéomique des ARMS non-traités et traités avec l'inhibiteur III. Les spots qui varient de manière significative entre le protéome des cellules témoins (A) et celui des cellules traitées avec l'inhibiteur III (B) sont entourés en noir. Les numéros servent à identifier et nommer les spots, de manière arbitraire.

Tableau 22 : Liste des protéines identifiées par spectrométrie de masse.

	Identification	nombre de scan identifiant la protéine	nombre de peptides différents identifiant la protéine	pourcentage de couverture de séquence (%)	poids moléculaire donné par les banques de données	abondance relative des différentes protéines dans le mélange
spot 1	**vimentine**	16	13	30,00	53651,31	100
spot 2	**prohibitine**	3	3	11,76	29803,85	9,62
	ribonucléoprotéine nucléaire hétérogène H1	5	3	9,35	49229,14	74,37
	nestine	2	2	1,67	177436,90	2,16
	péroxyrédoxine-4	3	3	13,65	30539,65	13,85
spot 3	**facteur d'épissage SFPQ**	3	3	7,50	76148,92	100
spot 4	**ribonucléoprotéine nucléaire hétérogène H3**	7=	4=	18,21	36926,24	100
	ribonucléoprotéine nucléaire hétérogène H3 isoforme 2H9A			19,03	35238,41	
	ribonucléoprotéine nucléaire hétérogène H3 isoforme 2H9B			21,21	31525,10	
	ribonucléoprotéine nucléaire hétérogène H3 isoforme 2H9C			29,30	22321,90	
spot 5	**isomérase peptidyl-prolyl cis-trans**	5	3	14,81	23742,36	4,76
	ribonucléase H2 sous-unité C	2=	2=	21,34	17840,04	3,12
	ribonucléase H2 sous-unité C isoforme 2			21,47	17711,86	
	protéine ribosomal L12, 39S, mitochondriale	4	3	11,62	23148,02	92,12
Kératine pour tous les spots		-				

Le signe « = » traduit le fait qu'un ou plusieurs peptides identifie(nt) plusieurs protéines. Il n'est alors pas possible de préciser si une seule ou plusieurs de ces protéines homologues sont présentes.
Une estimation du degré de contamination par la kératine basée sur le nombre de peptide est mentionnée : (-), pas de contamination ; (+) 1-5, peptides ; (++), 6-15 peptides ; (+++), > 15 peptides.
Les protéines en gras correspondent aux protéines présentant un intérêt particulier pour la problématique soulevée.

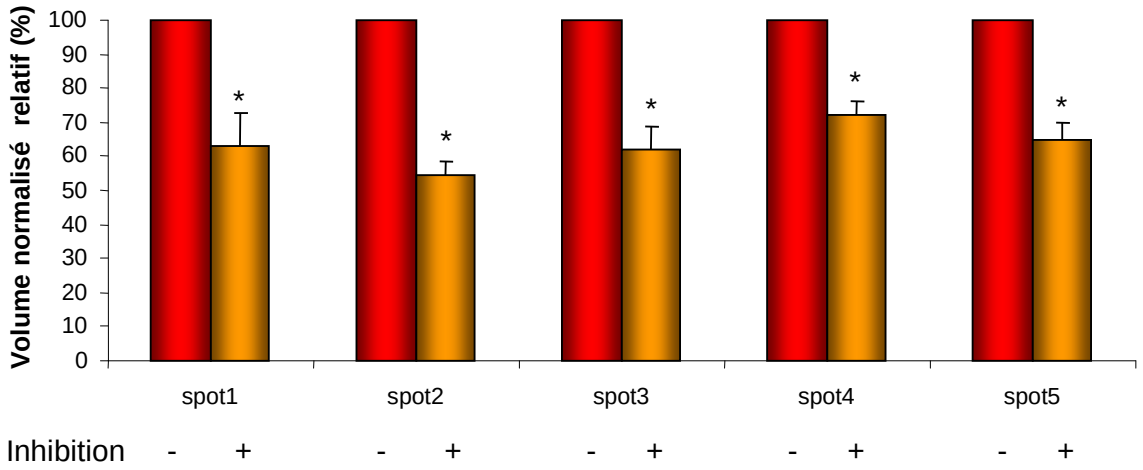

Figure 78 : Quantification des variations des 5 spots retenus par analyse protéomique entre les cellules non-traitées et les cellules traitées avec de la calpeptine ou de l'inhibiteur III.
Les résultats sont exprimés en pourcentage du volume normalisé par rapport aux cellules non-traitées. Les barres d'erreurs représentent les e.s.m. calculées sur au moins deux expériences indépendantes (3 gels différents par expérience).
* : significativement différent des cellules non-traitées ($p<0,05$).
Les valeurs numériques des résultats ainsi que des t-tests sont présentées dans le chapitre Annexes, Tableau 23.

	LHCN-M2	C2C12	ARMS	ERMS
Activité calpaïne globale	Référence	+	+++	++
Activité µ-calpaïne	Référence	x	++	++
Expression µ-calpaïne	Référence	x	- -	- -
Expression m-calpaïne	Référence	x	-	-
Expression calpastatine	Référence	x	- - -	- - -
ARNm µ-calpaïne	Référence	x	NS	NS
ARNm m-calpaïne	Référence	x	- -	- -
Localisation µ-calpaïne	En structures rectilignes	x	Gradient du centre vers la périphérie	Gradient du centre vers la périphérie
Localisation m-calpaïne	En spots autour du noyau	x	Gradient du centre vers la périphérie	Gradient du centre vers la périphérie
Localisation calpastatine	Gradient du centre vers la périphérie	x	Gradient du centre vers la périphérie	Gradient du centre vers la périphérie
Adhésion	+++	+++	+	+
Adhésion en présence de calpeptine	↘↘↘	↘↘↘	↘	NS
Vinculine après traitement calpeptine	↗↗	x	↘	x
Vinculine après transfection ASµC	↗	x	NS	x
Vinculine après transfection ASmC	↗	x	↘	x
Cytosquelette	Fibres de stress	Fibres de stress	Désorganisé	Désorganisé
Cytosquelette en présence de calpeptine	Désorganisation au centre	Désorganisation au centre	Concentré en périphérie	Concentré en périphérie
Quantification de l'actine F en présence de calpeptine	↗	↗↗	↗	↗
Colocalisation µ-calpaïne /actine	+++	x	+	x
Expression α-actine en présence de calpeptine	↗	↗	↘	x
Expression β-actine en présence de calpeptine	↗	↗	↘	x

Expression α-actine après transfection ASμC	↗	x	↘↘	x
Expression α-actine après transfection ASmC	↘	x	↘↘	x
Expression β-actine après transfection ASμC	NS	x	↘	x
Expression β-actine après transfection ASmC	↗	x	↘	x
Vitesse de migration - verre - gélatine	++ +	++ +	++++ +++	+++ ++
Capacité dispersive - verre - gélatine	++ +++	++ +	+++ +++	++ +
Vitesse de migration avec calpeptine - verre - gélatine	↘ NS	↘↘ ↘	↘↘↘ ↘↘↘	↘↘ ↘
Capacité dispersive avec calpeptine - verre - gélatine	↘↘ ↘↘↘	↘↘↘ NS	↘↘ ↘↘↘	↘↘ NS
Corrélation activité vitesse	oui	x	oui	oui
Capacité invasive	Référence	+	++++	++++
Capacité invasive en présence de calpeptine	↘	↘	↘↘↘↘	↘↘↘↘

Légende :

- ↘, ↘↘, ↘↘↘, ↘↘↘↘ et -, --, --- : diminution, le nombre de signe marque l'amplitude de la diminution
- ↗, ↗↗, ↗↗↗ et +, ++, +++, ++++ : augmentation, le nombre de signe marque l'amplitude de l'augmentation
- X : expérience non-réalisée avec la lignée cellulaire
- NS : non significatif

DISCUSSION

La vérité scientifique sera toujours plus belle que les créations de notre imagination et que les illusions de notre ignorance. Claude Bernard.

Le rhabdomyosarcome représente 5% des tumeurs solides chez l'enfant, étant ainsi la plus fréquente tumeur des tissus mous en pédiatrie [Hay *et al.,* 1995]. Sa localisation est variable ; il peut se déclarer dans toutes les parties de l'organisme. Néanmoins, il touche principalement la tête et le cou des malades les plus jeunes et se développe au niveau des extrémités et du système urogénital chez les adolescents.

Les RMS sont des cellules d'origine mésenchymateuse. Elles expriment tout comme les cellules musculaires saines, des protéines spécifiques du muscle [Parham *et al.*, 1991]. L'observation microscopique de ces cellules a permis de mettre en évidence différents types de RMS dont les principaux sont les rhabdomyosarcomes alvéolaires (ARMS) et embryonnaires (ERMS). Des études cliniques indiquent que les formes alvéolaires sont plus agressives et associées à un moins bon pronostic que les formes embryonnaires [Gastaldi *et al.*, 2005].

Parmi les nombreuses protéases impliquées dans la motilité cellulaire, les calpaïnes, protéases neutres calcium-dépendantes, jouent un rôle primordial dans la régulation de la migration et dans l'invasion, deux phénomènes impliqués dans le développement des métastases [Mamoune *et al.*, 2003 ; Xu et Deng, 2004 et 2006]. Les calpaïnes les plus représentées, la μ-calpaïne et la m-calpaïne sont ubiquitaires et possèdent des domaines EF-hands. Ce sont des cystéine-protéases hétérodimériques constituées d'une grande sous-unité catalytique (80 kDa) et d'une petite sous-unité régulatrice (28 kDa). Leur activité est régulée par leur inhibiteur endogène, la calpastatine (78 kDa), le calcium et les phospholipides [Dayton *et al.*, 1976 ; Goll *et al.*, 2003 ; Coolican et Hathaway, 1984].

La compréhension du rôle des calpaïnes dans les différents mécanismes régulant la migration et l'invasion des RMS pourrait être un tremplin au développement de

nouvelles thérapies tendant à enrailler le développement de métastases et ainsi accroître l'espérance de vie des patients atteints par cette pathologie.

LE SYSTEME PROTEOLYTIQUE NEUTRE CALCIUM-DEPENDANT DANS LES RMS

L'observation et la quantification de l'activité calpaïne globale dans les deux lignées non-tumorales (LHCN-M2 et C2C12) ainsi que dans les lignées tumorales (ARMS et ERMS) mettent en évidence une activité significativement plus élevée dans les RMS. Ces résultats sont en accord avec les expressions ou les activités anormalement élevées de la μ- et de la m-calpaïne ayant été mesurées chez l'homme, au cours du développement de tumeurs malignes du rein [Braun *et al.*, 1999b] du cancer de la peau [Reichrath *et al.*, 2003] et des adénocarcinomes colorectaux [Lakshmikuttyamma *et al.*, 2004]. De plus, il a été montré que la μ-calpaïne est surexprimée dans les cellules leucémiques [Witkowski *et al.*, 2002] et que la m-calpaïne est surexprimée dans le cancer de la prostate où elle inactive les molécules d'adhésion intercellulaire (cadhérines E), favorisant ainsi la dissémination des cellules tumorales [Rios-Dorias *et al.*, 2003]. L'activité calpaïne globale est plus élevée dans les ARMS, plus agréssifs, que dans les ERMS. Cette suractivité pourrait, en partie, être responsable de la différence phénotypique entre les deux lignées de RMS. Les résultats obtenus avec le *calpain 1 substrate*, substrat spécifique de la μ-calpaïne, mettent eux aussi en évidence une plus forte activité dans les RMS. Cette activité élevée peut être due, entre autre, à une surexpression des calpaïnes ubiquitaires ou à une expression moindre de leur inhibiteur naturel.

Dans les RMS, les quantifications de l'expression de la μ-calpaïne, de la m-calpaïne et de la calpastatine montrent que ces trois protéines sont sous-exprimées en comparaison des cellules non-tumorales. La forte activité calpaïne observée dans les RMS n'est donc pas due à une surexpression de la μ- ni de la m-calpaïne. Ainsi, l'activité dérégulée des calpaïnes observée dans les RMS semble-t-elle être due à une dérégulation de l'équilibre entre la quantité de calpaïnes (μ- et m-) et la quantité de la calpastatine.

Les ARMS présentent le même taux d'ARNm de la µ-calpaïne que les LHCN-M2, alors que la quantité de protéine est moindre. La dérégulation de la µ-calpaïne est donc post-transcriptionnelle. À l'opposé, l'expression des ARNm de la m-calpaïne dans les RMS est significativement inférieure à celle dans les LHCN-M2. La dérégulation de la m-calpaïne a donc lieu en amont de la transcription.

L'activité calpaïne étant différente entre les différentes lignées cellulaires, la localisation des composants du système neutre protéolytique calcium-dépendant a été observée, dans les cellules en migration.
Dans les LHCN-M2, la localisation de la µ-calpaïne est singulière. En effet, elle est cytoplasmique mais est organisée en un réseau de structures parallèles à l'axe principal de la cellule. Cette organisation étonnante et particulière n'est pas retrouvée dans les RMS et est aussi absente des C2C12 [Mazères *et al.*, 2006]. Dans les RMS ainsi que dans les C2C12, la µ-calpaïne est cytoplasmique mais présente un gradient de concentration décroissant du centre de la cellule vers la périphérie.
La m-calpaïne est localisée dans les LHCN-M2 ainsi que dans les RMS de manière ponctuée autour du noyau. Cette localisation est différente de celle observée dans les C2C12 où la m-calpaïne se concentre dans les extensions membranaires [Mazères *et al.* 2006]. Cependant, cette localisation ponctuée autour du noyau est à mettre en parallèle avec les travaux de Samanta *et al.* qui indiquent une localisation autour du noyau de la m-calpaïne, plus précisément au niveau du réticulum endoplasmique [Samanta *et al.*, 2007].
Enfin, la calpastatine ne présente pas de différence de localisation entre les différents types cellulaires.
La localisation différente observée pour la µ-calpaïne et la m-calpaïne ainsi que la régulation propre à chaque isoforme présument d'un rôle différent de ces deux protéases dans les processus de migration et d'invasion.

ADHESION ET CALPAÏNES

Les tests d'adhésion réalisés dans les LHCN-M2, les C2C12, les ARMS et les ERMS mettent en évidence un défaut d'adhésion des RMS par rapport aux LHCN-M2 ainsi

qu'une cinétique d'adhésion similaire entre les deux lignées de cellules non-tumorales. Les faibles taux d'adhésion mesurés dans les RMS sont caractéristiques du phénotype tumoral et métastatique de ces cellules. En effet, il a été montré dans les cellules CHO qu'une réduction de l'adhésion entraîne une augmentation de la migration cellulaire [Palecek *et al.*, 1998] ; au contraire lors de forte adhésion, le désassemblage des adhésion à l'arrière de la cellule est une étape limitante de la migration. Ces résultats sont en accord avec la diminution de la capacité adhésive des cellules circulantes du cancer de la prostate [Howard *et al.*, 2008].

En comparaison des LHCN-M2 et des C2C12, la quantité d'adhésions focales est faible dans les RMS. De plus, alors que ces adhésions focales sont réparties de manière homogène dans les cellules non-tumorales, elles se concentrent en périphérie cellulaire dans le cas des RMS. Cette différence de localisation entre les différentes lignées pourrait, en partie, expliquer la différence de capacité adhésive observée.

L'ajout de calpeptine dans le milieu de migration entraîne une diminution significative du taux d'adhésion des cellules témoins ; il en est de même pour les C2C12. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Beckerle *et al.* [Beckerle *et al.*, 1987] confirmant le rôle des calpaïnes dans les adhésions focales. Au contraire des cellules non-tumorales, la conséquence de l'inhibition des calpaïnes n'est pas identique dans les deux lignées de RMS. Les ARMS présentent une faible diminution du taux d'adhésion pour des concentrations élevées de calpeptine alors que l'adhésion des ERMS n'est pas affectée par la présence de l'inhibiteur. Ces résultats permettent de mettre en évidence le rôle des calpaïnes dans l'adhésion des LHCN-M2, des C2C12. Dans les ARMS, les résultats observés en présence de calpeptine ne permettent pas de conclure sur une implication prédominant des calpaïnes dans l'adhésion, la calpeptine n'ayant d'effet qu'à forte dose. L'adhésion des ERMS, quant à elle, est indépendante des calpaïnes.

Au niveau protéique, l'ajout de calpeptine entraîne une forte augmentation de la vinculine dans les LHCN-M2. À l'opposé, dans les ARMS, l'inhibition des calpaïnes

entraîne une faible diminution de l'expression de cette protéine. Ces résultats sont confirmés par l'utilisation d'oligonucléotides antisens dirigés contre la μ- et la m-calpaïne : l'inhibition de la μ-calpaïne ainsi que celle de la m-calpaïne induisent une augmentation de la quantité de vinculine dans les LHCN-M2. Une telle augmentation a aussi été observée dans les cellules dendritiques [Calle *et al.*, 2004]. Dans les ARMS, seuls les oligonucléotides antisens dirigés contre la m-calpaïne entraînent une faible diminution de la vinculine. Ainsi, le mode de régulation de l'expression de la vinculine diffère-t-il entre les deux lignées. Dans les LHCN-M2, l'augmentation observée, après inhibition, indique la vinculine comme substrat potentiel des calpaïnes. Ce résultat est en accord avec les données obtenues par Taylor *et al.* au niveau des disques Z [Taylor *et al.*, 1995]. Dans les ARMS, l'expression de la vinculine semble être majoritairement régulée par une voie indépendante des calpaïnes.

L'ensemble de ces résultats indique d'une part que les calpaïnes sont impliquées dans l'adhésion des cellules non-tumorales et d'autre part que l'implication des calpaïnes dans la régulation de l'adhésion des RMS n'est pas prépondérante. Les différences, mises en évidence au niveau des capacités adhésives et de la régulation des adhésions focales, devraient entraîner des différences entre les types cellulaires au niveau de la migration.

CARACTERISTIQUES CINETIQUES ET CALPAÏNES

La caractérisation cinétique de la migration des différents types cellulaires a été effectuée sur verre, substrat témoin, et sur gélatine, substrat de migration favorisant l'adhésion cellulaire.

La détermination des vitesses de migration des différents types cellulaires indique que les RMS ont une vitesse de migration significativement plus élevée que les cellules non-tumorales aussi bien sur verre que sur gélatine. Les LHCN-M2 et les C2C12 ont une vitesse similaire. Pour tous les types cellulaires, la vitesse de migration est significativement plus faible sur gélatine que sur verre. Ce résultat peut

s'expliquer par la différence de potentialité adhésive entre les deux substrats de migration. En effet, les cellules adhèrent plus sur gélatine et une adhésion importante limite la vitesse de migration [Palecek *et al.*, 1998].

L'analyse de la répartition des vitesses confirme que le nombre de cellules dans les faibles vitesses est plus important pour les cellules non-tumorales que pour les RMS. De plus, cette analyse permet de mettre en évidence une homogénéité dans les vitesses de migration pour les LHCN-M2, les C2C12 ainsi que pour les ERMS (les courbes de répartition étant serrées) ; au contraire les ARMS présentent une courbe de répartition des vitesses large traduisant une hétérogénéité dans la population cellulaire.

L'étude des trajectoires cellulaires individuelles permet de définir l'aire de dispersion des différents types cellulaires ainsi que Δ, leur capacité dispersive. Pour tous les types cellulaires, à l'exception des LHCN-M2, l'aire de dispersion est plus faible sur gélatine que sur verre. Ce résultat est lié à la vitesse plus faible de migration sur verre par rapport à celle sur gélatine ainsi qu'aux trajectoires des cellules. En effet, sur gélatine, les C2C12, les ARMS et les ERMS migrent dans un secteur restreint, en tournant autour de leur point d'adhésion initial. A l'opposé, les LHCN-M2 bien que migrant elles aussi moins vite sur gélatine que sur verre, présentent sur gélatine une aire de dispersion importante : sur ce substrat de migration, elles ont des trajectoires plus rectilignes et migrent donc plus loin de leur point initial d'adhésion.

En présence de calpeptine, les vitesses de migration des différents types cellulaires sont diminuées, à l'exception des LHCN-M2 migrant sur gélatine. Ces vitesses plus faibles induites par l'inhibition des calpaïnes sont en accord avec les résultats obtenus sur les fibroblastes *capn4* $^{-/-}$ [Dourdin *et al.*, 2001]. Il est à noter que les vitesses de migration des RMS en présence de calpeptine, sur verre ou sur gélatine, se rapprochent considérablement des vitesses des cellules non-tumorales en conditions standards, en particulier pour les ARMS migrant sur verre (t-test LHCN-M2 migrant sur verre (n=6) vs. ARMS traités calpeptine, migrant sur verre (n=3) : p=0,52 (NS)). De plus, l'effet de l'inhibition des calpaïnes, sur la vitesse de

migration, pourrait être contrecarré par la nature du substrat de migration, notamment dans le cas des LHCN-M2 migrant sur gélatine. Ce dernier résultat suggère la mise en place d'une seconde voie de signalisation n'impliquant pas les calpaïnes, pour ces cellules non-tumorales migrant sur gélatine.

La répartition des vitesses de migration indique un plus grand nombre de cellules dans les faibles vitesses dans le cas des cellules traitées avec de la calpeptine. De plus, en présence de calpeptine, les ARMS migrant sur gélatine ont une courbe de répartition étroite signifiant une homogénéisation des cinétiques des ARMS, dans ces conditions.

En présence de calpeptine, les aires de dispersion des différents types cellulaires diminuent, quelque soit le substrat de migration, de façon importante, par rapport aux conditions standards. Alors qu'en absence d'inhibition des calpaïnes, les LHCN-M2 présentent une plus grande aire de dispersion sur gélatine, en présence de calpeptine, leur aire de migration est significativement réduite sur gélatine et devient même inférieure à celle sur verre, dans les mêmes conditions.

L'inhibition des calpaïnes induit donc une diminution des caractéristiques cinétiques des différents types cellulaires. De plus, la corrélation linéaire positive qui existe entre la vitesse de migration et l'activité globale des calpaïnes, implique ces dernières de manière directe dans le processus migratoire. L'activité calpaïne stimulant la migration cellulaire, cette corrélation linéaire pourrait servir d'indicateur d'agréssivité tumorale.

ACTINE ET CALPAÏNES

La réorganisation du cytosquelette est une étape fondamentale impliquée dans l'adhésion cellulaire, la migration et l'invasion [Lambrechts *et al.*, 2004].
Dans les LHCN-M2 ainsi que dans les C2C12, le cytosquelette d'actine est organisé en fibres de stress parallèles à l'axe principal de la cellule. De plus, dans les LHCN-M2 l'actine F, constituant ces fibres, colocalise avec la μ-calpaïne. Ce résultat est en

accord avec la colocalisation de la µ-calpaïne et des filaments d'actine dans les cellules dendritiques [Calle *et al.*, 2004] et semble impliquer la µ-calpaïne dans l'organisation et le remaniement des fibres de stress. Cette localisation pourrait permettre à la µ-calpaïne d'interagir avec certains de ces substrats, protéines du cytosquelette tels que la desmine, la taline ou encore la tropomyosine.

Contrairement à l'agencement du cytosquelette d'actine observé dans les cellules non-tumorales, les RMS présentent un cytosquelette désorganisé et concentré à la périphérie des cellules, conférant à ces dernières une morphologie fusiforme ainsi que des extensions membranaires courtes. Cette absence de fibres de stress est retrouvée dans les cellules transformées v-Src où l'activité calpaïne stimule la perte des fibres de stress et induit ainsi des modifications morphologiques [Carragher *et al.*, 2001]. Parmi les protéines régulant l'assemblage et l'organisation du cytosquelette d'actine, Rho, Rac et cdc42 sont les trois Rho-GTPases les mieux caractérisées. Les membres de cette famille ont été impliqués dans de nombreux cancers [Sahai et Marshall, 2002], leurs surexpressions ayant été mises en évidence [Aronheim *et al.*, 1998 ; Gomez des Pulgar *et al.*, 2005 ; Gouw *et al.*, 2005]. Dans le cas du cancer du sein, une augmentation de l'expression de RhoA corrèle avec l'augmentation de la tumeur, suggérant un rôle de cette dernière dans la progression tumorale [Fritz *et al.*, 1999]. De même, la surexpression de RhoC est décrite dans le cancer du sein [Kleer *et al.*, 2002] ainsi que dans les adénocarcinomes pancréatiques [Suwa *et al.*, 1998]. Rac1 et cdc42 sont aussi surexprimées [Fritz *et al.*, 1999]. Le clivage de RhoA, par la µ-calpaïne entraîne une inhibition de la formation de fibres de stress ainsi qu'une inhibition de l'étalement cellulaire [Kulkarni *et al.*, 2002]. Dans les RMS, l'absence de fibres de stress ainsi que la faible adhésion observée pourraient être dus au clivage de RhoA par la µ-calpaïne dont l'activité est élevée. De plus, cette désorganisation pourrait être responsable du faible taux d'adhésion et de l'importante vitesse de migration des RMS [Perrin *et al.*, 2006].

L'inhibition des calpaïnes par la calpeptine induit dans tous les types cellulaires un changement radical de la morphologie. En effet, les cellules traitées avec de la calpeptine présentent une morphologie ronde, avec des petites protrusions membranaires trapues. Ce changement phénotypique est opposé aux modifications

observées dans les cellules d'ovaire d'Hamster Chinois traitées avec le *calpain inhibitor 1* qui présentent une morphologie plus allongée que les contrôles [Huttenlocher *et al.*, 1997]. Cependant, ces résultats sont en accord avec les modifications observées pour les fibroblastes sur-exprimant la calpastatine telles que l'arrondissement cellulaire et l'absence de lamellipode [Potter *et al.*, 1998].
Dans les LHCN-M2 ainsi que dans les C2C12, l'inhibition des calpaïnes induit une désorganisation du cytosquelette ; l'actine polymérisée est alors concentrée en périphérie cellulaire et les fibres de stress centrales ne sont plus présentes. Dans les RMS, ne présentant pas de fibres de stress dans les conditions standards, l'actine F est elle aussi concentrée en périphérie cellulaire, en présence de calpeptine. Ces résultats sont en accord avec ceux observés dans les C2C12 sur-exprimant la calpastatine [Dedieu *et al.*, 2004]. Ce réarrangement du cytosquelette d'actine est couplé à une relocalisation de la µ-calpaïne, ces résultats sont en accord avec les travaux de Emori et Saigo (1994) qui décrivent, chez l'embryon de la drosophile, une relocalisation de la calpaïne en concomitance des remaniements cytosquelettiques [Emori et Saigo, 1994]. Le maintien des fibres périphériques, couplé à la désorganisation des fibres centrales, peut être corrélé avec les études décrivant deux voies de régulation des fibres de stress : la première qui régule les fibres de stress périphériques, impliquant le calcium et dépendante de la calmoduline et la seconde voie qui régule les fibres centrales et impliquant les protéines Rho et les Rho-kinase [Katoh *et al.*, 2007]. L'ensemble de ces résultats semble donc impliquer les calpaïnes dans la régulation des fibres de stress dépendante des protéines Rho et des Rho kinases.

Bien que désorganisée, la F-actine est présente en quantité significativement plus élevée dans tous les types cellulaires traités avec de la calpeptine, en comparaison des témoins en conditions standards. Une telle augmentation a aussi été observée dans les cellules dendritiques. Dans ces cellules, elle serait due à une accumulation de vinculine qui, liant le complexe de Arp2/3 (facteur de nucléation de l'actine polymérisée), stimulerait la polymérisation d'actine, entraînant ainsi une augmentation d'actine F [Calle *et al.*, 2004]. Ces mêmes interactions pourraient être responsables de l'élévation de la quantité d'actine F observée dans les LHCN-M2

puisque l'inhibition des calpaïnes entraîne, dans ces cellules, une augmentation de la vinculine. Dans les ARMS, l'augmentation de l'actine polymérisée serait due à un autre processus puisque l'inhibition des calpaïnes ne module que faiblement l'expression de la vinculine.

Les filaments d'actine F sont constitués de monomères présents sous deux isoformes différentes : l'α-actine et la β-actine. Ainsi, l'augmentation d'actine F observée en présence de calpeptine peut-être due soit à une stimulation de la polymérisation soit à une inhibition de la dépolymérisation. Dans les LHCN-M2, la quantification de l'expression des différentes isoformes d'actine, en présence de calpeptine, indique que dans les cellules non-tumorales, les quantités d'α- et de β-actine augmentent significativement. À l'opposé, dans les mêmes conditions, les quantités de ces deux isoformes diminuent dans les ARMS. Dans les cellules non-tumorales, la quantité de monomères étant plus importante en présence de calpeptine, l'augmentation de F-actine observée pourrait être due à une stimulation de la polymérisation. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Calle et al. [Calle *et al.*, 2004]. Ainsi, dans les LHCN-M2, l'augmentation d'actine F observée pourrait-elle être due à une augmentation de la vinculine qui, liant le complexe de Arp2/3, stimulerait la polymérisation de l'actine. À l'inverse, l'inhibition des calpaïnes entraîne, dans les ARMS, une diminution de la quantité des deux isoformes d'actine ; l'augmentation de F-actine observée pourrait donc être due à une inhibition de la dépolymérisation.

Afin de mieux comprendre l'implication de chacune des calpaïnes ubiquitaires dans la régulation du cytosquelette d'actine, l'expression de l'α-actine ainsi que celle de la β-actine sont quantifiées, dans les LHCN-M2 et les ARMS, après transfection avec des oligonucléotides antisens dirigés contre la μ-calpaïne ou la m-calpaïne.
Dans les LHCN-M2, l'inhibition de la μ-calpaïne entraîne une augmentation de l'α-actine alors que l'inhibition de la m-calpaïne entraîne une diminution de cette dernière. Les deux calpaïnes exercent donc une régulation différente sur cette isoforme : la μ-calpaïne inhibe l'expression de l'α-actine et la m-calpaïne la stimule. Cependant, la présence de calpeptine entraînant une augmentation globale de l'α-

actine, le rôle de la μ-calpaïne sur cette isoforme serait prépondérant. Au niveau de l'expression de la β-actine, l'inhibition de la μ-calpaïne n'a pas d'effet sur l'expression de la β-actine qui est augmentée lors de l'inhibition de la m-calpaïne. Ainsi, dans les LHCN-M2, la m-calpaïne pourrait réguler de manière négative la quantité de β-actine en stimulant des enzymzes conduisant à son clivage ou en régulant son expression.
Dans les ARMS, l'inhibition de la μ-calpaïne ainsi que celle de la m-calpaïne entraînent une diminution de l'expression de l'α- mais aussi de la β-actine.
Contrairement aux résultats obtenus dans les LHCN-M2, dans les ARMS, la μ- et la m-calpaïne ont donc un rôle similaire dans la régulation des différentes isoformes d'actine.

INVASION ET CALPAÏNES

Les tests d'invasion réalisés avec les différents types cellulaires mettent en évidence la forte capacité invasive des RMS par rapport aux cellules non-tumorales. Ce résultat confirme le phénotype invasif des ARMS et des ERMS. L'inhibition des calpaïnes entraîne une importante diminution de l'invasion, aussi bien pour les ARMS que pour les ERMS. En présence de calpeptine, le taux d'invasion ainsi que l'indice d'invasion des RMS sont identiques à ceux des LHCN-M2. Ces résultats impliquent les calpaïnes dans le processus d'invasion des RMS et sont en accord avec les données obtenues dans d'autres types cellulaires tels que des lignées de cancer de la prostate [Mamoune *et al.*, 2003] ou les cellules du cancer des poumons [Xu et Deng, 2006a et 2006b]. De même, dans des cellules d'ostéoclastome, l'inhibition de la μ-calpaïne tout comme celle de la m-calpaïne (utilisation de siRNA) entraînent une diminution de l'invasion tumorale, impliquant les deux isoformes de calpaïnes ubiquitaires dans ce processus [Fan *et al.*, 2009].

PROTEOMIQUE

Dans le but de déterminer des cibles potentiellement régulées par les calpaïnes et impliquées dans le phénotype tumoral des RMS, une analyse protéomique a été réalisée sur des ARMS non-traités ainsi que sur des ARMS traités avec de la

calpeptine ou de l'inhibiteur III. Ce dernier est un inhibiteur de l'activité calpaïne plus spécifique que la calpeptine. Cette analyse a permis la détection de cinq spots qui diffèrent dans les deux conditions inhibitrices, en comparaison des témoins. Ces cinq spots diminuent en présence d'inhibiteur. Les protéines détectées ne sont donc pas des substrats des calpaïnes mais seraient des cibles régulées indirectement par ces dernières. Après inhibition des calpaïnes, l'expression de la vimentine diminue de même de l'expression de la ribonucléoprotéine hétérogène nucléaire H1 et H3, de la nestine, de la peptidyl-prolyl cis-trans isomérase, de la péroxyrédoxine 4, de la prohibitine, de la protéine ribosomale L12, de la sous-unité C de la ribonucléase H2 ainsi que de l'expression du facteur d'épissage SFPQ.

À l'heure actuelle, aucune donnée bibliographique ne peut expliquer la diminution de la sous-unité C de la ribonucléase H2 observée, dans les ARMS, lors de l'inhibition des calpaïnes. De même, aucune étude de la protéine ribosomale L12 ne permet d'impliquer cette dernière dans la dissémination métastatique ni dans la détermination d'un phénotype tumoral.

Suite aux traitements par la calpeptine et par l'inhibiteur III, la diminution de l'expression des différentes ribonucléoprotéines[1] semblerait impliquer les calpaïnes dans la régulation génique des ARMS. Bien que la localisation de ces hétéroprotéines soit majoritairement nucléaire, certaines ribonucléoprotéines peuvent avoir une localisation cytoplasmique [Kim *et al.*, 2000]. De plus, dans les cellules COS7, la ribonucléoprotéine hétérogène nucléaire K a été colocalisée avec la m-calpaïne, dans le cytoplasme, où elle est clivée [Kimura *et al.*, 2003]. Ces résultats n'excluent donc pas, dans les ARMS, une action directe des calpaïnes sur les ribonucléoprotéines H1 (HNRH1) et H3 (HNRH3). Cependant, l'inhibition des calpaïnes entraîne une diminution de l'expression de HNRH1 et HNRH3, ces deux protéines ne seraient donc pas un substrat des calpaïnes dans les ARMS. Ainsi, dans les ARMS, l'hypothèse d'une stimulation indirecte de HNR1 et HNR3 par les calpaïnes est-elle privilégiée.

L'inhibition des calpaïnes entraîne une diminution de l'expression de la péroxyrédoxine 4 (PRX IV). Lee *et al.* ont montré, dans les cellules de cancer du sein, que la surexpression de PRX IV stimulerait la prolifération et serait ainsi impliquée

[1] Hétéroprotéines composées d'une nucléoprotéine dont le groupement prosthétique est représenté par l'ARN. Les ribonucléoprotéines nucléaires hétérogènes des groupes F à H sont impliquées dans l'épissage des pré-ARNm.

dans le développement et la progression du cancer [Lee *et al.*, 2008]. Dans les ARMS, les calpaïnes pourrait être impliquées dans la stimulation de la prolifération *via* la régulation de PRX IV. De plus, il a été montré dans les cancers du cou et de la tête que la PRX IV protégerait les cellules des radiations ionisantes et serait ainsi responsable d'une forte résistance à l'apoptose [Park *et al.*, 2008]. Le traitement des rhabdomyosarcomes par radiations entraîne de faibles taux de guérison, les calpaïnes pourraient être en partie responsable de ce phénomène, dans les ARMS, *via* la stimulation de l'expression de PRX IV.

Dans les ARMS, le facteur d'épissage riche en proline et glutamine, SFPQ, est aussi une protéine dont l'expression diminue lorsque les calpaïnes sont inhibées. Cette protéine régulerait le gène codant pour DYX1C1, protéine impliquée dans la migration neuronale [Tapia-Páez *et al.*, 2008].

L'expression de la nestine, constituant des filaments intermédiaires, semble aussi diminuée lors de l'inhibition de l'activité calpaïne. Pendant les phases de développement précoces de l'embryogenèse, la nestine est exprimée au niveau des somites ainsi que dans les cellules neuroectodermales [Fredriksen et McKay, 1988 ; Lendahl *et al.*, 1990]. Plus tardivement, la nestine est fortement exprimée dans les myoblastes et les cellules du système nerveux central [Lendahl *et al.*, 1990 ; Sejersen et Lendahl, 1993]. Après la naissance, dans les cellules du muscle squelettique, la nestine n'est plus exprimée au profit de l'expression de la desmine. La détection de l'expression de la nestine dans les ARMS est en accord avec les résultats obtenus par Kobayashi *et al.* qui montrent eux aussi une telle expression dans les rhabdomyosarcomes [Kobayashi *et al.*, 1998]. Les travaux de Huang *et al.* ont montré que la nestine serait impliquée dans la prolifération cellulaire [Huang *et al.*, 2009]. Ainsi, dans les ARMS, les calpaïnes pourraient-elles intervenir dans la prolifération cellulaire (facteur caractéristique du phénotype tumoral), *via* la stimulation de l'expression de la nestine.

L'inhibition de l'activité calpaïne induirait aussi une diminution de l'expression de la peptidyl-prolyl cis-trans isomérase. Cette protéine a été impliquée dans l'adhésion cellulaire, notamment des lymphocytes T [Pakula *et al.*, 2007]. Elle stimulerait l'adhésion de ces cellules en activant la MAPK par un mécanisme impliquant les glycoprotéoglycanes (composants de la matrice extracellulaire), les intégrines a4b1

et a4b7 [Allain *et al.*, 2002] ainsi que le *cluster* de différenciation CD147, impliqué dans l'invasion tumorale et l'angiogenèse [Jia *et al.*, 2008]. Pour acquérir un potentiel métastatique, les ARMS doivent dans un premier temps présenter un défaut d'adhésion afin de se dissocier de la tumeur primaire puis, après avoir transités dans la circulation sanguine ou lymphatique, doivent, dans un second temps, s'ancrer afin de former une tumeur secondaire. La stimulation de l'expression de peptidyl-prolyl cis-trans isomérase par les calpaïnes pourraient intervenir à ce moment.

L'analyse protéomique a mis en évidence une diminution de l'expression de la vimentine, constituant des filaments intermédiaires, lors de l'inhibition des calpaïnes. L'expression de cette protéine serait donc stimulée par les calpaïnes. Une augmentation de l'expression de cette protéine entraînerait une augmentation de la vitesse de migration cellulaire [Ding *et al.*, 2009]. Ce résultat est en adéquation avec le phénotype tumorale des ARMS et pourrait, en partie, expliquer les vitesses élevées mesurées pour cette lignée cellulaire. De même, il a été montré, dans le cancer de la prostate, que la silibine (substance extraite du Chardon-marie) inhibe l'invasion de cancer de la prostate ainsi que la migration des cellules tumorales *via* la diminution de l'expression de la vimentine et de la MMP2 [Wu *et al.*, 2009]. Ces données impliquent, elles aussi, la vimentine dans le processus métastatique. Les calpaïnes semblent, à nouveau, intervenir dans la capacité invasive et métastatique des ARMS, en stimulant l'expression de la vimentine et ainsi la migration tout autant que l'invasion de ces cellules.

La prohibitine, protéine présente au niveau de la membrane plasmique, du noyau, de la mitochondrie et pouvant jouer un rôle dans l'activation de la voie Ras-Raf-MEK [Rajalingam et Rudel, 2005], présente une diminution d'expression en présence d'inhibiteur des calpaïnes. Les calpaïnes stimuleraient donc son expression dans les ARMS. La prohibitine est une protéine intervenant dans la stimulation de la perte d'adhésion intercellulaire ainsi que dans la migration. En effet, dans les cellules du col de l'utérus, l'inhibition de cette protéine par l'utilisation de *siRNA*, entraîne une augmentation des adhésions intercellulaires ainsi qu'une inhibition de la migration en réponse aux facteurs de croissance [Rajalingam et Rudel, 2005]. Des résultats similaires sont retrouvés au niveau des cellules endothéliales [Schleicher *et al.*, 2009]. De plus, il a été montré que la prohibitine permet le maintien, dans ces

cellules de la capacité angiogénique [Schleicher *et al.*, 2009]. Ainsi, de même que pour les protéines précédentes, les calpaïnes pourraient-elles intervenir dans les capacités métastatiques des ARMS, en stimulant la perte d'adhésion intercellulaire, la migration ainsi que la capacité angiogénique *via* l'augmentation de l'expression de la prohibitine.

La vinculine ainsi que les différentes isoformes d'actine n'ont pas été détectées en protéomique. Plusieurs raisons peuvent expliquer cette absence. La vinculine a un poids moléculaire de 130, elle se situe donc dans le haut du gel qui présente une définition ne permettant pas d'exploitation. De plus, la variation de son expression après traitement par les inhibiteurs de calpaïnes, détectées par westrenblot est faible et pourrait donc ne pas être détectable en protéomique. Quant à l'actine, l'utilisation d'un gradient de pH non-linéaire de 3 à 10 n'a pas permis de séparer de manière suffisante le complexe d'actine. L'utilisation d'un gradient plus resserré, autour d'un pH 5, pourrait permettre d'obtenir de nouveau spots.

L'analyse protéomique a donc permis de mettre en évidence un certain nombre de protéines qui pourraient être impliquées dans la dissémination métastatique des ARMS ainsi que dans la détermination de leur phénotype tumoral et dont l'expression serait régulée par les calpaïnes.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

> A la source de toute connaissance, il y a une idée, une pensée, puis l'expérience vient confirmer l'idée. Claude Bernard.

Les travaux présentés dans ce manuscrit s'inscrivent dans la thématique de l'Unité Protéolyse, Croissance et Développement Musculaire. Ils font suite aux travaux précédents ayant mis en évidence l'implication des calpaïnes ubiquitaires dans les étapes précoces de la myogenèse et plus particulièrement au cours de l'adhésion et de la migration des cellules musculaires de souris, C2C12 [Dedieu et al., 2003 et 2004 ; Mazères et al., 2006].

L'objectif était dans un premier temps, de confirmer et compléter les études menées sur les C2C12, au niveau d'une nouvelle lignée de cellules musculaires humaines, LHCN-M2, en caractérisant le rôle des calpaïnes, dans cette lignée, tant sur le plan de l'adhésion que de la migration et de l'invasion. Dans un second temps, l'objectif était de faire évoluer la thématique vers un nouveau domaine, ciblé sur un aspect plus pathologique par l'étude de l'implication des calpaïnes dans les différents composants de la dissémination métastatique des Rhabdomyosarcomes. Le but de ces travaux était *in fine* de caractériser le rôle de chaque calpaïne ubiquitaire dans l'adhésion, la migration et l'invasion de ces cellules tumorales afin de permettre, ultérieurement, la détermination de cibles thérapeutiques potentielles.

L'étude de l'activité, de l'expression et de la localisation des différents composants du système protéolytique neutre calcium-dépendant a permis de mettre en évidence la dérégulation de l'activité calpaïne dans les RMS. Les résultats obtenus montrent une activité protéolytique calpaïne-dépendante extrêmement élevée dans les RMS. De plus, les ARMS, plus agréssifs, présentent une activité plus élevée que les ERMS. Contrairement aux résultats attendus, la μ-calpaïne ainsi que la m-calpaïne sont sous-exprimées dans les RMS. Ainsi, la forte activité observée pourrait-elle être due à

une dérégulation importante de la calpastatine et non à une surexpression des deux isoformes des calpaïnes. Les résultats obtenus permettent de préciser que si la dérégulation de la µ-calpaïne intervient au niveau post-transcriptionnel, celle de la m-calpaïne a lieu en amont de la transcription, soulignant ainsi une mode de régulation différent pour ces deux isoformes. La localisation de la µ-, de la m-calpaïne et de la calpastatine étant différente tant au niveau protéique qu'au niveau des types cellulaires, ces résultats soulignent d'une part un rôle différent des deux isoformes et d'autre part expliquent les différences phénotypiques observées.

Les tests d'adhésion réalisés indiquent un fort défaut d'adhésion pour les RMS, comparé aux cellules non-tumorales. Cette caractéristique s'explique par une différence d'agencement des adhésions focales (plus en périphérie dans les RMS) mise en évidence par la localisation de la vinculine. L'implication des calpaïnes dans l'adhésion a été mise en évidence d'une part par leur inhibition avec de la calpeptine, d'autre part la transfection d'oligonucléotides antisens dirigés contre le µ-calpaïne ou la m-calpaïne. En effet, l'inhibition de l'activité calpaïne réduit les taux d'adhésion des LHCN-M2 et des ARMS. L'impact de cette inhibition est cependant plus marqué dans les myoblastes humains. De plus, cette étude indique que le mode de régulation de l'expression protéique de la vinculine diffère entre les cellules tumorales et les cellules non-tumorales. En effet, dans les LHCN-M2, l'inhibition chimique des calpaïnes ainsi que la transfection des oligonucléotides antisens induisent une augmentation de l'expression de la vinculine. Ainsi, la vinculine serait-elle dans les LHCN-M2 un substrat tant de la µ-calpaïne que de la m-calpaïne. A l'opposé, dans les ARMS, l'inhibition chimique de l'activité calpaïne n'induit qu'une faible diminution de l'expression de la vinculine. Couplés aux résultats obtenus après transfection d'oligonucléotides antisens, ces résultats montrent que dans les ARMS, seule la m-calpaïne stimulerait l'expression de la vinculine et que les calpaïnes ne semblent pas être le mode principal de régulation de cette protéine.

La détermination des caractéristiques cinétiques des différentes lignées met en évidence une vitesse de migration supérieure ainsi qu'une capacité dispersive accrue dans les cellules tumorales, en comparaison des cellules non-tumorales. De plus,

l'étude de ces caractéristiques montre l'implication des calpaïnes dans la migration des différents types cellulaires puisque leur inhibition entraîne une diminution tant au niveau des vitesses de migration qu'au niveau de la capacité dispersive. De plus, cette étude permet de définir les calpaïnes comme un des marqueurs du potentiel métastatique cellulaire, leur activité étant corrélée au pouvoir migratoire des cellules. Ainsi, l'inhibition de l'activité calpaïne, sans garantir le contrôle de la prolifération de cellules tumorales, pourrait-elle limiter la dissémination métastatique, limitant le processus néoplasique à des effets locorégionaux.

La désorganisation du cytosquelette d'actine a été mise en évidence dans les RMS et soulignée comme étant en partie responsable des différences cinétiques observées entre les cellules tumorales et les cellules non-tumorales. De plus, le remaniement cytosquelettique induit par l'inhibition des calpaïnes implique ces dernières dans l'agencement du cytosquelette. Les études pour tenter de discriminer le rôle de la μ-calpaïne et de la m-calpaïne, utilisant des oligonucléotides antisens, montrent que dans les LHCN-M2, la μ-calpaïne jouerait un rôle prépondérant dans la régulation de l'α-actine en régulant de manière négative (inhibition) son expression. Quant à la β-actine, elle serait régulée, aussi de manière négative mais, uniquement par la m-calpaïne. Dans les ARMS, la μ-calpaïne et la m-calpaïne joueraient un rôle similaire en stimulant l'expression des deux isoformes.

Les tests d'invasion réalisés sur les différentes lignées cellulaires montrent que le pouvoir invasif des RMS est supérieur de celui des cellules non-tumorales. L'inhibition des calpaïnes entraîne une forte diminution de l'invasion des cellules tumorales et non-tumorales. En présence de calpeptine, le taux d'invasion des RMS ainsi que leur indice d'invasion sont identiques à ceux des LHCN-M2 en conditions standards. Les calpaïnes interviennent donc dans l'invasion et représentent ainsi des cibles potentielles dans les études ayant pour but de définir des stratégies visant à limiter ou enrayer l'invasion tumorale.

L'analyse protéomique en gel 2D, couplée à la spectrométrie de masse, a permis la mise en évidence de plusieurs protéines régulées par les calpaïnes dans les ARMS.

Parmis ces protéines, la vimentine impliquée dans le potentiel migratoire ainsi que dans la perte d'adhésion intercellulaire, la PRX IV, entraînant une résistance aux radiations thérapeutiques, les ribonucléoprotéines H1 et H2, impliquées dans la migration et biomarqueurs de certains cancer, la nestine, intervenant dans la prolifération cellulaire, la prohibitine, impliquée dans la perte d'adhésion intercellulaire, la migration et le maintien de la capacité angiogénique, le facteur SFPQ, régulant une protéine impliquée dans la migration neuronale ainsi que la peptidyl-prolyl cis-trans isomérase ont une expression diminuée après traitement par la calpeptine ou le *calpain inhibitor III*. Ainsi, les calpaïnes stimuleraient-elles l'expression de ces protéines dans les ARMS, participant ainsi au phénotype tumoral de ces cellules.

Afin de compléter ces résultats, plusieurs études peuvent être envisagées.

Tout d'abord, dans un avenir très proche, les données acquises par analyse protéomique et spectrométrie de masse devront être confirmées par Western-Blot. Des expériences de colocalisation et de co-immuniprécipitation permettront de confirmer les substrats potentiels des calpaïnes mis en évidence.

Afin de compléter les données acquises sur l'implication des calpaïnes dans la migration, il pourrait être intéressant de refaire des études de vidéo-microscopie afin de déterminer les caractéristiques cinétiques des cellules après transfection avec des oligonucléotides antisens, dirigés contre la μ- ou la m-calpaïne. Ces expériences pourraient permettre de discriminer le rôle de chacune des isoformes dans le processus migratoire. De plus, les μ et m-calpaînes étant ubiquitaires, il peut ne pas être anodin d'inhiber largement leur activité enzymatique. Cibler l'action thérapeutique sur l'isoforme la plus déterminante dans les processus migratoire et invasif peut permettre de limiter les effets secondaires du traitement.
Enfin, il pourrait être intéressant de généraliser l'équation de la corrélation entre l'activité calpaïne et la vitesse de migration, afin que cette donnée puisse être transposée dans d'autres types cellulaires et servir de marqueur d'agressivité tumorale.

L'analyse des caractéristiques cinétiques sur des matrice en 3D, toujours en utilisant la vidéo-microscopie, pourrait aussi apporter des résultats supplémentaires conduisant à la détermination du mode d'invasion des RMS et pouvant aider à la compréhension de ces mécanismes *in vivo*.

Les résultats obtenus lors des tests d'invasion pourraient être complétés par des tests de dégradation sur matrice GFP et ainsi permettre la caractérisation de MMP éventuelles. De plus, l'étude préliminaire du pouvoir invasif des RMS sur la CAM d'œufs de poulet pourrait aussi complétée, par la détermination de l'effet de l'inhibition des calpaïnes, sur le développement *in vivo* des tumeurs.
Cette étude de l'implication des calpaïnes dans le développement des tumeurs ainsi que dans le processus métastatique pourrait être complétée par une approche de transplantation sur les mammifères, en prenant comme modèle la souris nude athymique, par exemple.

Les résultats préliminaires sur les conséquences de la transfection de la tropomyosine sur le cytosquelette des rhabdomyosarcomes pourraient être complétés par une étude plus approfondie du phénotype des cellules transfectées ainsi que par l'étude de leurs caractéristiques adhésive, migratoire et invasive.

Enfin, à long terme, ces différentes expérimentations pourraient tendre à une stratégie visant à diminuer l'activité calpaïne soit en diminuant l'activité calpaïne elle-même (RNAI, morpholino, anticorps) ou en surexprimant la calpastatine (plasmide) afin d'enrayer la capacité métastatique chez l'homme.

En résumé, les travaux présentés dans ce manuscrit mettent donc en évidence un rôle de la µ-calpaïne et de la m-calpaïne dans la migration et l'invasion cellulaires des cellules tumorales et non-tumorales. La mise en évidence d'une corrélation linéaire positive entre l'activité calpaïne et la vitesse de migration, couplée à des aires de dispersions similaires et un pouvoir invasif entre les RMS traités avec un inhibiteur des calpaïnes et les

cellules non-tumorales, indiquent l'activité calpaïne comme marqueur potentiel de l'agressivité tumoral.

Enfin, l'analyse protéomique, couplée à la spectrométrie de masse, a permis de mettre en évidence de nouvelles cibles protéiques, pouvant être impliquées dans les processus métastatiques, potentiellement régulées par les calpaïnes.

Ces différentes implications du système protéolytique neutre calcium-dépendant dans la migration et l'invasion qui sont les étapes principales de la dissémination métastatique, font des calpaïnes ubiquitaires de potentielles cibles thérapeutiques pour tenter de limiter ou même enrayer l'invasion tumorale ainsi que le développement de métastases.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Acevedo VD, Gangula RD, Freeman KW, Li R, Zhang Y, Wang F, Ayala GE, Peterson LE, Ittmann M, Spencer DM. Inducible FGFR-1 activation leads to irreversible prostate adenocarcinoma and an epithelial-to-mesenchymal transition. Cancer Cell. 2007, 12:559-71.

Agnew BJ, Minamide LS, Bamburg JR. Reactivation of phosphorylated acting depolymerising factor and identification of the regulatory site. J Biol Chem. 1995, 270:17582-7.

Ahlberg J, Berkenstam A, Henell F, Glaumann H. Degradation of short and long lived proteins in isolated rat liver lysosomes. Effects of pH, temperature, and proteolytic inhibitors. J Biol Chem. 1985, 260:5847-54.

Asakura A, Seale P, Girgis-Gabardo A, Rudnicki MA. Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. J Cell Biol. 2002, 159:123-34.

Albigès-Rizo C, Frachet P, Block MR. Down regulation of talin alters cell adhesion and the processing of the alpha 5 beta 1 integrin. J Cell Sci. 1995, 108:3317-29.

Allain F, Vanpouille C, Carpentier M, Slomianny MC, Durieux S, Spik G . Interaction with glycosaminoglycans is required for cyclophilin B to trigger integrin-mediated adhesion of peripheral blood T lymphocytes to extracellular matrix. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002, 99:2714-9.

Allan JA, Docherty AJ, Barker PJ, Huskisson NS, Reynolds JJ, Murphy G. Binding of gelatinases A and B to type-I collagen and other matrix components. Biochem J. 1995, 309:299-306.

Amano M, Ito M, Kimura K, Fukata Y, Chihara K, Nakano T, Matsuura Y, Kaibuchi K. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho- kinase). J Biol Chem. 1996, 271:20246-49.

Anastasiadis PZ. p120-ctn: A nexus for contextual signaling via Rho GTPases. Biochim Biophys Acta. 2007, 1773:34-46.

Anderson LV, Davison K, Moss JA, Richard I, Fardeau M, Tome FM, Hubner C, Lasa A, Colomer J, Beckmann JS. Characterization of monoclonal antibodies to calpain 3 and protein expression in muscle from patients with limb-girdle muscular dystrophy type 2A. Am J Pathol. 1998, 153:1169-79.

Andresen K, Tom TD, Strand M. Characterization of cDNA clones encoding a novel calcium-activated neutral proteinase from Schistosoma mansoni. J Biol Chem. 1991, 266:15085-90

Angers-Loustau A, Cote JF, Charest A, Dowbenko D, Spencer S, Lasky LA, Tremblay ML. Protein tyrosine phosphatase- PEST regulates focal adhesion disassembly, migration, and cytokinesis in fibroblasts. J Cell Biol. 1999, 144:1019–31.

Aoyama A, Chen WT. A 170-kDa membrane-bound protease is associated with the expression of invasiveness by human malignant melanoma cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990, 87:8296-300.

Aoyama Y, Avruch J, Zhang XF. Nore1 inhibits tumor cell growth independent of Ras or the MST1/2 kinases. Oncogene. 2004, 23:3426-33.

Araya J, Cambier S, Morris A, Finkbeiner W, Nishimura SL. Integrin-mediated transforming growth factor-beta activation regulates homeostasis of the pulmonary epithelial-mesenchymal trophic unit. Am J Pathol. 2006, 169:405-15.

Arce L, Yokoyama NN, Waterman ML. Diversity of LEF/TCF action in development and disease. Oncogene. 2006, 25:7492-504.

Aronheim A, Broder YC, Cohen A, Fritsch A, Belisle B, Abo A. Chp, a homologue of the GTPase Cdc42Hs, activates the JNK pathway and is implicated in reorganizing the actin cytoskeleton. Curr Biol. 1998, 8:1125-8.

Artym VV, Kindzelskii AL, Chen WT, Petty HR. Molecular proximity of seprase and the urokinase-type plasminogen activator receptor on malignant melanoma cell membranes: dependence on beta1 integrins and the cytoskeleton. Carcinogenesis. 2002, 23:1593-601.

Artym VV, Zhang Y, Seillier-Moiseiwitsch F, Yamada KM, Mueller SC. Dynamic interactions of cortactin and membrane type 1 matrix metalloproteinase at invadopodia: defining the stages of invadopodia formation and function. Cancer Res. 2006, 66:3034-43.

Attaix D, Aurousseau E, Combaret L, Kee A, Larbaud D, Rallière C, Souweine B, Taillandier D, Tilignac T. Ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis in skeletal muscle.Reprod Nutr Dev. 1998, 38:153-65.

Attaix D, Combaret L, Pouch MN, Taillandier D. Regulation of proteolysis. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2001, 4:45-9.

Azuma T, Witke W, Stossel TP, Hartwig JH, Kwiatkowski DJ. Gelsolin is a downstream effector of rac for fibroblast motility. EMBO J. 1998, 17:1362–70.

Baghdiguian S, Richard I, Martin M, Coopman P, Beckmann JS, Mangeat P, Lefranc G. Pathophysiology of limb girdle muscular dystrophy type 2A: hypothesis and new insights into the IkappaBalpha/NF-kappaB survival pathway in skeletal muscle. J Mol Med. 2001, 79:254-61.

Bai DS, Dai Z, Zhou J, Liu YK, Qiu SJ, Tan CJ, Shi YH, Huang C, Wang Z, He YF, Fan J. Capn4 overexpression underlies tumor invasion and metastasis after liver transplantation for hepatocellular carcinoma. Hepatology. 2009, 49:460-70.

Baki A, Tompa P, Alexa A, Molnár O, Friedrich P. Autolysis parallels activation of mu-calpain. Biochem J. 1996, 318:897-901.

Balcerzak D, Poussard S, Brustis JJ, Elamrani N, Soriano M, Cottin P, Ducastaing A. An antisense oligodeoxyribonucleotide to m-calpain mRNA inhibits myoblast fusion. J Cell Sci. 1995, 108:2077-82.

Barbero S, Mielgo A, Torres V, Teitz T, Shields DJ, Mikolon D, Bogyo M, Barilà D, Lahti JM, Schlaepfer D, Stupack DG. Caspase-8 association with the focal adhesion complex promotes tumor cell migration and metastasis. Cancer Res. 2009, 69:3755-63.

Barnes TM, Hodgkin J. The tra-3 sex determination gene of Caenorhabditis elegans encodes a member of the calpain regulatory protease family. EMBO J. 1996, 15:4477-84.

Barnoy S, T Glasner T, Kosower NS. The role of calpastatin (the specific calpain inhibitor) in myoblast differentiation and fusion. Biochem Biophys Res Commun. 1996, 220:933-38.

Bates RC, Bellovin DI, Brown C, Maynard E, Wu B, Kawakatsu H, Sheppard D, Oettgen P, Mercurio AM. Transcriptional activation of integrin beta6 during the epithelial-mesenchymal transition defines a novel prognostic indicator of aggressive colon carcinoma. J Clin Invest. 2005, 115:339-47.

Bear JE, Loureiro JJ, Libova I, Fässler R, Wehland J, Gertler FB. Negative Regulation of Fibroblast Motility by Ena/VASP Proteins. Cell. 2000, 101:717–28.

Becker JW, Marcy AI, Rokosz LL, Axel MG, Burbaum JJ, Fitzgerald PM, Cameron PM, Esser CK, Hagmann WK, Hermes JD, Springer JP. Stromelysin-1: three-dimensional structure of the inhibited catalytic domain and of the C-truncated proenzyme. Protein Sci. 1995, 4:1966-76.

Bellovin DI, Bates RC, Muzikansky A, Rimm DL, Mercurio AM. Altered localization of p120 catenin during epithelial to mesenchymal transition of colon carcinoma is prognostic for aggressive disease. Cancer Res. 2005, 65:10938-45.

Ben-Aharon I, Brown PR, Shalgi R, Eddy EM. Calpain 11 is unique to mouse spermatogenic cells. Mol Reprod Dev. 2006, 73:767-73.

Benaroudj N, Tarcsa E, Cascio P, Goldberg AL. The unfolding of substrates and ubiquitin-independent protein degradation by proteasomes. Biochimie. 2001, 83:311-8.

Bermpohl F, Löster K, Reutter W, Baum O. Rat dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) exhibits endopeptidase activity with specificity for denatured fibrillar collagens. FEBS Lett. 1998, 428:152-6.

Bernstein BW, Bamburg JR. Tropomyosin binding to F-actin protects the F-actin from disassembly by brain actin-depolymerizing factor (ADF). Cell Motil 1982, 2:1-8.

Bhatt A, Kaverina I, Otey C, Huttenlocher A. Regulation of focal complex composition and disassembly by the calcium-dependent protease calpain. J Cell Sci. 2002, 115:3415-25.

Blanchard, A., Ohanian, V., and Critchley, D. The structure and function of alpha-actinin. J Muscle Res Cell Motil. 1989, 10:280-289.

Blanchoin L, Pollard TD, Hitchcock-DeGregori SE. Inhibition of the Arp2/3 complex-nucleated actin polymerization and branch formation by tropomyosin. Curr Biol. 2001, 11:1300-1304.

Blanchoin L, Pollard TD. Hydrolysis of bound ATP by polymerized actin depends on the bound divalent cation but not profilin. Biochemistry. 2002, 41:597–602.

Bode W. A helping hand for collagenases: the haemopexin-like domain. Structure. 1995, 3:527-30.

Bode W, Fernandez-Catalan C, Grams F, Gomis-Rüth FX, Nagase H, Tschesche H, Maskos K. Insights into MMP-TIMP interactions. Ann N Y Acad Sci. 1999, 878:73-91.

Bolton SJ, Barry ST, Mosley H, Patel B, Jockusch BM, Wilkinson JM, Critchley DR. Monoclonal antibodies recognizing the Nand C-terminal regions of talin disrupt actin stress fibres when microinjected into human fibroblasts. Cell Motil Cytoskeleton. 1997, 36:363-76.

Bowden ET, Barth M, Thomas D, Glazer RI, Mueller SC. An invasion-related complex of cortactin, paxilline and PKCmu associates with invadopodia at sites of extracellular matrix degradation. Oncogene. 1999, 18:4440-9.

Bowden ET, Onikoyi E, Slack R, Myoui A, Yoneda T, Yamada KM, Mueller SC. Co-localization of cortactin and phosphotyrosine identifies active invadopodia in human breast cancer cells. Exp Cell Res. 2006, 312:1240-53.

Braga VM, Yap AS. The challenges of abundance: epithelial junctions and small GTPase signalling. Curr Opin Cell Biol. 2005, 17:466-74.

Brakebusch C, Fillatreau S, Potocnik AJ, Bungartz G, Wilhelm P, Svensson M, Kearney P, Körner H, Gray D, Fässler R. Beta1 integrin is not essential for hematopoiesis but is necessary for the T cell-dependent IgM antibody response. Immunity. 2002, 16:465-77.

Branca D. Calpain-related diseases. Biochem Biophys Res Commun. 2004, 322:1098-104.

Braun BC, Glickman M, Kraft R, Dahlmann B, Kloetzel PM, Finley D, Schmidt M. The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. Nat Cell Biol. 1999a, 1:221-6.

Braun C, Engel M, Seifert M, Theisinger B, Seitz G, Zang KD, Welter C. Expression of calpain I messenger RNA in human renal cell carcinoma: correlation with lymph node metastasis and histological type. Int J Cancer. 1999b, 84:6-9.

Brindle NP, Holt MR, Davies JE, Price CJ, Critchley DR.The focal-adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP. binds to the proline-rich domain in vinculin. Biochem J. 1996, 318:753-57.

Broderick MJ, Winder SJ. Spectrin, alpha-actinin, dystrophin. Adv Protein Chem. 2005, 70:203-246.

Brown MC, Curtis MS, Turner CE. Paxillin LD motifs may define a new family of protein recognition domains. Nat. Struct. Biol. 1998, 5:677-678.

Bryce NS, Clark ES, Leysath JL, Currie JD, Webb DJ, Weaver AM. Cortactin promotes cell motility by enhancing lamellipodial persistence. Curr Biol. 2005,15:1276-85.

Buccione R, Orth JD, McNiven MA. Foot and mouth: podosomes, invadopodia and circular dorsal ruffles. Nat Rev Mol Cell Biol. 2004, 5:647-57.

Burnham MR, Harte MT, Richardson A, Parsons JT, Bouton AH. The identification of p130cas-binding proteins and their role in cellular transformation. Oncogene 1996, 12:2467-72.

Burns, S. Thrasher AJ, Blundell MP, Machesky L, Jones GE. Configuration of human dendritic cell cytoskeleton by Rho GTPases, the WAS protein, and differentiation. Blood. 2001, 98:1142-49.

Burridge K, Mangeat P. An interaction between vinculin and talin. Nature. 1984, 308:744-746.

Burridge K, Fath K, Kelly T, Nuckolls G, Turner C. Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. Annu. Rev Cell Biol. 1988, 4:487-525.

Burridge K, Turner CE, Romer LH. Tyrosine phosphorylation of paxillin and pp125FAK accompanies cell adhesion to extracellular matrix: a role in cytoskeletal assembly. J Cell Biol. 1992, 119:893-903.

Burridge K, Wennerberg K. Rho and Rac take center stage. Cell. 2004, 116:167-79.

Calalb MB, Polte TR, Hanks SK. Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. Mol Cell Biol. 1995, 15:954-963.

Calderwood DA. Integrin activation. J Cell Sci. 2004a, 117:657-666.

Calderwood DA. Talin controls integrin activation. Biochem Soc Trans. 2004b, 32:434-7.

Calle Y, Carragher NO, Thrasher AJ, Jones GE. Inhibition of calpain stabilises podosomes and impairs dendritic cell motility. J Cell Sci . 2006, 119:2375-85.

Cance WG, Harris JE, Iacocca MV, Roche E, Yang X, Chang J, Simkins S, Xu L. Immunohistochemical analyses of focal adhesion kinase expression in benign and malignant human breast and colon tissues: correlation with preinvasive and invasive phenotypes. Clin Cancer Res. 2000, 6:2417-23.

Cao Y, Zhao H, Grunz H. XCL-2 is a novel m-type calpain and disrupts morphogenetic movements during embryogenesis in Xenopus laevis. Dev Growth Differ. 2001, 43:563-71.

Cao J, Chiarelli C, Richman O, Zarrabi K, Kozarekar P, Zucker S. Membrane type 1 matrix metalloproteinase induces epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer. J Biol Chem. 2008, 283:6232-40.

Carillo S, Pariat M, Steff AM, Jariel-Encontre I, Poulat F, Berta P, Piechaczyk M. PEST motifs are not required for rapid calpain-mediated proteolysis of c-fos protein. Biochem J. 1996, 313:245-251.

Carlier MF, Pantaloni D. Direct evidence for ADP-Pi-F-actin as the major intermediate in ATP-actin polymerization. Rate of dissociation of Pi from actin filaments. Biochemistry 1986, 25:7789–92.

Carlier MF, Jean C, Rieger KJ, Lenfant M, Pantaloni D. Modulation of the interaction between G-actin and thymosin beta 4 by the ATP/ADP ratio: possible implication in the regulation of actin dynamics. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993, 90:5034-8.

Carpenter CL, Cantley LC. Phosphoinositide kinases. Curr Opin Cell Biol. 1996, 8:153-8.

Carragher NO, Fincham VJ, Riley D, Frame MC. Cleavage of focal adhesion kinase by different proteases during SRC-regulated transformation and apoptosis. Distinct roles for calpain and caspases. J Biol Chem. 2001, 276:4270-5.

Carragher NO, Westhoff MA, Fincham VJ, Schaller MD, Frame MC. A novel role for FAK as a protease-targeting adaptor protein: regulation by p42 ERK and Src. Curr Biol. 2003, 13:1442-50.

Carragher NO, Fonseca BD, Frame MC. Calpain activity is generally elevated during transformation but has oncogene-specific biological functions. Neoplasia. 2004, 6:53-73.

Carragher NO, Walker SM, Scott Carragher LA, Harris F, Sawyer TK, Brunton VG, Ozanne BW, Frame MC. Calpain 2 and Src dependence distinguishes mesenchymal and amoeboid modes of tumour cell invasion: a link to integrin function. Oncogene. 2006, 25:5726-40.

Cary LA, Chang JF, Guan JL. Stimulation of cell migration by overexpression of focal adhesion kinase and its association with Src and Fyn. J Cell Sci. 1996, 109:1787-94.

Cary LA, Han DC, Polte TR, Hanks SK, Guan JL. Identification of p130Cas as a mediator of focal adhesion kinasepromoted cell migration. J Cell Biol. 1998, 140:211-221.

Cavey M, Rauzi M, Lenne PF, Lecuit T. A two-tiered mechanism for stabilization and immobilization of E-cadherin. Nature. 2008, 453:751-6.

Charytonowicz E, Cordon-Cardo C, Matushansky I, Ziman M. Alveolar rhabdomyosarcoma: is the cell of origin a mesenchymal stem cell? Cancer Lett. 2009, 279:126-36.

Chen WT. Mechanism of retraction of the trailing edge during fibroblast movement. J Cell Biol. 1981, 90:187-200.

Chen WT, Olden K, Bernard BA, Chu FF. Expression of transformation-associated protease(s) that degrade fibronectin at cell contact sites. J Cell Biol. 1984, 98-1546-55.

Chen WT, Chen JM, Parsons SJ, Parsons JT. Local degradation of fibronectin at sites of expression of the transforming gene product pp60src. Nature. 1985, 316:156-8.

Chen WT.Proteolytic activity of specialized surface protrusions formed at rosette contact sites of transformed cells. J Exp Zool. 1989, 251:167-85.

Chen WT, Lee CC, Goldstein L, Bernier S, Liu CH, Lin CY, Yeh Y, Monsky WL, Kelly T, Dai M, Zhou JY, Mueller SC. Membrane proteases as potential diagnostic and therapeutic targets for breast malignancy. Breast Cancer Res Treat. 1994, 31:217-26.

Chen, HC, Appeddu PA, Parsons JT, Hildebrand JD, Schaller MD, Guan JL. Interaction of focal adhesion kinase with cytoskeletal protein talin. J Biol Chem. 1995, 270:16995-9.

Chen HC, Appeddu PA, Isoda H, Guan JL. Phosphorylation of tyrosine 397 in focal adhesion kinase is required for binding phosphatidylinositol 3-kinase. J Biol Chem. 1996, 271:26329-34.

Chen WT, Kelly T. Seprase complexes in cellular invasiveness Cancer Metastasis. 2003, 22:259-69.

Chi XJ, Hiwasa T, Maki M, Sugaya S, Nomura J, Kita K, Suzuki N. Suppression of okadaic acid-induced apoptosis by overexpression of calpastatin in human UV(r)-1 cells. FEBS Lett. 1999, 459:391-4.

Chiang HL, Dice JF. Peptide sequences that target proteins for enhanced degradation during serum withdrawal. J Biol Chem. 1988, 263:6797-805.

Choi YH, Lee SJ, Nguyen P, Jang JS, Lee J, Wu ML, Takano E, Maki M, Henkart PA, Trepel JB. Regulation of cyclin D1 by calpain protease. J Biol Chem. 1997, 272:28479-84.

Chong LD, Traynor-Kaplan A, Bokoch GM, Schwartz MA. The small GTP-binding protein Rho regulates a phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in mammalian cells. Cell. 1994, 79:507-13.

Christiansen JJ, Rajasekaran AK. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. Cancer Res. 2006, 66:8319-26.

Chua BT, Guo K, Li P. Direct cleavage by the calcium-activated protease calpain can lead to inactivation of caspases. J Biol Chem. 2000, 275:5131-35.

Cichy J, Pure E. The liberation of CD44. J Cell Biol. 2003, 161:839-43.

Clark IM, Cawston TE. Fragments of human fibroblast collagenase. Purification and characterization. Biochem J. 1989, 263:201-6.

Clark EA, Brugge JS. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. Science. 1995, 268:233-9.

Clark ES, Whigham AS, Yarbrough WG, Weaver AM. Cortactin is an essential regulator of matrix metalloproteinase secretion and extracellular matrix degradation in invadopodia. Cancer Res. 2007, 67:4227-35.

Cong M, Thompson VF, Goll DE, Antin PB. The bovine calpastatin gene promoter and a new N-terminal region of the protein are targets for cAMP-dependent protein kinase activity. J Biol Chem. 1998, 273:660-6.

Cong J, Thompson VF, Goll DE. Phosphorylation of the calpains. Mol Biol Cell, 2000 11:386.

Coolican SA, Hathaway DR. Effect of L-alpha-phosphatidylinositol on a vascular smooth muscle Ca2+-dependent protease. Reduction of the Ca2+ requirement for autolysis. J Biol Chem. 1984, 259:11627-30.

Cook TA, Nagasaki T, Gundersen GG. Rho guanosine triphosphatase mediates the selective stabilization of microtubules induced by lysophosphatidic acid. J Cell Biol. 1998, 141:175-85.

Cooper JA, Gould KL, Cartwright CA, Hunter T. Tyr527 is phosphorylated in pp60c-src: implications for regulation. Science. 1986, 231:1431-4.

Cooper MG. The cell: a molecular Approch. 2000, Second Edition Sinauer Associates, Inc.

Coppolino MG, Woodside MJ, Demaurex N, Grinstein S, St- Arnaud R, Dedhar S. Calreticulin is essential for integrinmediated calcium signalling and cell adhesion. Nature. 1997, 386:843-7.

Cornillon J, Campos L, Guyotat D. Focal adhesion kinase (FAK), une protéine aux fonctions multiples. Médecine/sciences. 2003, 19:743-52

Cottin P, Brustis JJ, Poussard S, Elamrani N, Broncard S, Ducastaing A. Ca(2+)-dependent proteinases (calpains) and muscle cell differentiation. Biochim Biophys Acta. 1994, 1223:170-8.

Cottin P, Poussard S, Dargelos E, Balcerzak D, Aragon B, Brustis JJ, Ducastaing A. Calpains and myogenesis. Methods Mol Biol. 2000, 144:173-80.

Couchman JR, Chen L, Woods A. Syndecans and cell adhesion. Int Rev Cytol. 2001, 207:113-50.

Coux O, Tanaka K, Goldberg AL. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. Annu Rev Biochem. 1996, 65:801-47.

Crawford HC, Fingleton BM, Rudolph-Owen LA, Goss KJ, Rubinfeld B, Polakis P, Matrisian LM. The metalloproteinase matrilysin is a target of beta-catenin transactivation in intestinal tumors. Oncogene. 1999, 18:2883-91.

Critchley DR. Alpha-actinins. In: Kreis T, Vale R, editors. Guidebook to the Cytoskeletal and Motor Proteins. Oxford: Oxford University Press. 1993, pp. 22-3.

Croall DE, DeMartino GN. Calcium-activated neutral protease (calpain) system: structure, function, and regulation. Physiol Rev. 1991, 71:813-47.

Croce K, Flaumenhaft R, Rivers M, Furie BC, Herman IM, Potter DA Inhibition of calpain blocks platelet secretion, aggregation, and spreading. J Biol Chem. 1999, 274:36321-7.

Cryns, V., & Yuan, J. Proteases to die for. Genes Dev. 1998, 12:1551-70.

Cunningham, C.C., Stossel, T.P., Kwiatkowski, D.J. Enhanced motility in NIH 3T3 fibroblasts that overexpress gelsolin. Science, 1991, 251:1233-6.

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

Daly RJ. Cortactin signalling and dynamic actin networks. Biochem J. 2004, 382:13-25.

David LL, Shearer TR, Shih M. Sequence analysis of lens beta-crystallins suggests involvement of calpain in cataract formation. J Biol Chem. 1993, 268:1937-40.

Dayton WR, Goll DE, Zeece MG, Robson RM, Reville WJ. A Ca2+-activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Purification from porcine muscle. Biochemistry. 1976, 15:2150-8.

Dean RT. Direct evidence of importance of lysosomes in degradation of intracellular proteins. Nature. 1975, 257:414-6.

Dear N, Matena K, Vingron M, Boehm T. A new subfamily of vertebrate calpains lacking a calmodulin-like domain: implications for calpain regulation and evolution. Genomics. 1997, 45:175-84.

Dear TN, Boehm T. Diverse mRNA expression patterns of the mouse calpain genes Capn5, Capn6 and Capn11 during development. Mech Dev. 1999a, 89:201-9.

Dear TN, Möller A, Boehm T. CAPN11: A calpain with high mRNA levels in testis and located on chromosome 6. Genomics. 1999b, 59:243-7.

Dear TN, Meier NT, Hunn M, Boehm T. Gene structure, chromosomal localization, and expression pattern of Capn12, a new member of the calpain large subunit gene family. Genomics. 2000, 68:152-60.

Dear TN, Boehm T. Identification and characterization of two novel calpain large subunit genes. Gene. 2001, 274:245-52.

Dedieu S, Mazères G, Poussard S, Brustis JJ, Cottin P. Myoblast migration is prevented by a calpain-dependent accumulation of MARCKS. Biol Cell. 2003 95:615-23.

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

De La Cruz EM, Ostap EM, Brundage RA, Reddy KS, Sweeney HL, Safer D. Thymosin-beta(4) changes the conformation and dynamics of actin monomers. Biophys J. 2000, 78:2516-27.

Delaissé JM, Engsig MT, Everts V, del Carmen Ovejero M, Ferreras M, Lund L, Vu TH, Werb Z, Winding B, Lochter A, Karsdal MA, Troen T, Kirkegaard T, Lenhard T, Heegaard AM, Neff L, Baron R, Foged NT. Proteinases in bone resorption: obvious and less obvious roles. Clin Chim Acta. 2000, 291:223-34.

Delaney SJ, Hayward DC, Barleben F, Fischbach KF, Miklos GL. Molecular cloning and analysis of small optic lobes, a structural brain gene of Drosophila melanogaster. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991, 88:7214-8.

De Nichilo MO, Yamada KM. Integrin alpha v beta 5-dependent serine phosphorylation of paxillin in cultured human macrophages adherent to vitronectin. J Biol Chem. 1996, 271:11016-22.

Destaing O, Saltel F, Géminard JC, Jurdic P, Bard F. Podosomes display actin turnover and dynamic self-organization in osteoclasts expressing actin-green fluorescent protein. Mol Biol Cell. 2003, 14:407-16.

Di Lisa F, De Tullio R, Salamino F, Barbato R, Melloni E, Siliprandi N, Schiaffino S, Pontremoli S. Specific degradation of troponin T and I by mu-calpain and its modulation by substrate phosphorylation. Biochem J. 1995, 308:57-61.

Dias P, Parham DM, Shapiro DN, Webber BL, Houghton PJ. Myogenic regulatory protein (MyoD1) expression in childrhood solid tumors: diagnostic utility in rhabdomyosarcoma. Am J Pathol. 1990, 137:1283-91.

Diaz BG, Moldoveanu T, Kuiper MJ, Campbell, Davies PL. Insertion sequence 1 of muscle-specific calpain, p94, acts as an internal propeptide. J Biol Chem. 2004, 279:27656-66.

Ding Z, Chen ZS, Chen XL, Guo H, Gong NQ. Inducing of epithelial mesenchymal transition of HK-2 cells by connective tissue growth factor in vitro. Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi. 2009, 38:462-5.

Dourdin N, Brustis JJ, Balcerzak D, Elamrani N, Poussard S, Cottin P, Ducastaing A. Myoblast fusion requires fibronectin degradation by exteriorized m-calpain. Exp Cell Res. 1997, 235:385-94.

Dourdin N, Bhatt AK, Dutt P, Greer PA, Arthur JS, Elce JS, Huttenlocher A. Reduced cell migration and disruption of the actin cytoskeleton in calpain-deficient embryonic fibroblasts. J Biol Chem. 2001, 276:48382-8.

Donninger H, Vos MD, Clark GJ. The RASSF1A tumor suppressor. J Cell Sci. 2007, 120:3163-72.

Duong LT, Rodan GA. PYK2 is an adhesion kinase in macrophages, localized in podosomes and activated by beta(2)-integrin ligation. Cell Motil Cytoskeleton. 2000, 47:174–88.

Edwards DC, Gill GN. Structural features of LIM kinase that control effects on the actin cytoskeleton. J Biol Chem. 1999, 274:11352-61.

El-Badry OM, Minniti C, Kohn EC, Houghton PJ, Daughaday WH, Helman LJ. Insulin-like growth factor II acts as an autocrine growth and motility factor in human rhabdomyosarcoma tumors. Cell Growth Differ. 1990, 1:325-31.

El-Sibai M, Nalbant P, Pang H, Flinn RJ, Sarmiento C, Macaluso F, Cammer M, Condeelis JS, Hahn KM, Backer JM. Cdc42 is required for EGF-stimulated protrusion and motility in MTLn3 carcinoma cells. J Cell Sci. 2007, 120:3465-74.

Emori Y, Kawasaki H, Imajoh S, Minami Y, Suzuki K. All four repeating domains of the endogenous inhibitor for calcium- dependent protease independently retain inhibitory activity. Expression of the cDNA fragments in Escherichia coli. J Biol Chem. 1988, 263:2364-70.

Emori Y, Saigo K. Calpain localization changes in coordination with actin-related cytoskeletal changes during early embryonic development of Drosophila. J Biol Chem. 1994, 269:25137-42.

Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. Cell. 2006, 126:677-89.

Faix J, Rottner K. The making of filopodia. Curr Opin Cell Biol. 2006, 18:18-25.

Fan DG, Dai JY, Tang J, Wu MM, Sun SG, Jiang JL, Fan QY. Silencing of calpain expression reduces the metastatic potential of human osteosarcoma cells. Cell Biol Int. 2009 Sep 9. [Epub ahead of print]

Fedorov AA, Lappalainen P, Fedorov EV, Drubin DG, Almo SC. Structure determination of yeast cofilin. Nat Struct Biol. 1997, 4:366-9.

Flanagan LA, Chou J, Falet H, Neujahr R, Hartwig JH, TP Stossel. Filamin A, the Arp2/3 complex, and the morphology and function of cortical actin filaments in human melanoma cells. J Cell Biol. 2001, 155:511-7.

Franco SJ, Rodgers MA, Perrin BJ, Han J, Bennin DA, Critchley DR, Huttenlocher A. Calpain-mediated proteolysis of talin regulates adhesion dynamics. Nat Cell Biol. 2004, 6:977-83.

Franco SJ, Huttenlocher A. Regulating cell migration: calpains make the cut. J Cell Science. 2005, 118:3829-38.

Franz T, Vingron M, Boehm T, Dear TN. Capn7: a highly divergent vertebrate calpain with a novel C-terminal domain. Mamm Genome. 1999, 10:318-21.

Fredriksen K, McKay RDG. Proliferation and differentiation of the rat neuroepithelial precursor cells in vivo. J Neurosci. 1988, 8:1144-51.

Friedl P, Entschladen F, Conrad C, Niggemann B, Zänker KS. CD4+ T lymphocytes migrating in three-dimensional collagen lattices lack focal adhesions and utilize beta1 integrin-independent strategies for polarization, interaction with collagen fibers and locomotion. Eur J Immunol. 1998, 28:2331-43.

Friedl P, Brocker EB. The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. Cell Mol Life Sci. 2000, 57:41–64.

Friedl P, Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. Nat Rev Cancer. 2003, 3:362-74.

Friedl P. Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration. Curr Opin Cell Biol. 2004, 16:14-23.

Friedl P, Hegerfeldt Y, Tusch M. Collective cell migration in morphogenesis and cancer. Int J Dev Biol. 2004, 48:441-9.

Friedl P, Weigelin B. Interstitial leukocyte migration and immune function. Nat Immunol. 2008, 9:960-9.

Friedl P, Gilmour D. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. Nat Rev Mol Cell Biol. 2009, 10:445-57.
Friedl P, Wolf K. Proteolytic interstitial cell migration: a five-step process Cancer Metastasis Rev. 2009, 28:129-35.
Friedrich P, Tompa P, Farkas A. The calpain-system of Drosophila melanogaster: coming of age. Bioessays. 2004 26:1088-96..
Frisch SM. Caspase-8: fly or die. Cancer Res. 2008, 68:4491-3.
Fritz G, Just I, Kaina B. Rho GTPases are over-expressed in human tumors. Int J Cancer. 1999, 81:682-7.
Fukami K, Endo T, Imamura M, Takenawa T. alpha-Actinin and vinculin are PIP2-binding proteins involved in signaling by tyrosine kinase. J Biol Chem. 1994, 269:1518-22.
Fukuda M. Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking. J Biol Chem 1991; 266,1327-30.
Gafni J, Ellerby LM. Calpain activation in Huntington's disease. J Neurosci. 2002, 22:4842-9.
Gafni J, Hermel E, Young JE, Wellington CL, Hayden MR, Ellerby LM. Inhibition of calpain cleavage of huntingtin reduces toxicity: accumulation of calpain/caspase fragments in the nucleus. J Biol Chem. 2004, 279:20211-20.
Galbraith CG, Yamada KM, Galbraith JA. Polymerizing actin fibers position integrins primed to probe for adhesion sites. Science. 2007, 315:992–5.
Gang EJ, Bosnakovski D, Simsek T, To K, Perlingeiro RC. Pax3 activation promotes the differentiation of mesenchymal stem cells toward the myogenic lineage. Exp Cell Res. 2008, 314:1721-33.
Garcia GL, Parent CA. Signal relay during chemotaxis. J Microsc. 2008, 231:529-34.
Gastaldi T, Bonvini P, Sartori F, Marrone A, Iolascon A, Rosolen A. Plakoglobin is differentially expressed in alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma and is regulated by DNA methylation and histone acetylation. Carcinogenesis. 2006, 27:1758-67.
Gavazzi I, Nermut MV, Marchisio PC. Ultra-structure and gold-immunolabelling of cell-substratum adhesions (podosomes) in RSV-transformed BHK cells. J Cell Sci. 1989, 94:85-9.
Geiger B. A 130K protein from chicken gizzard: its localization at the termini of microfilament bundles in cultured chicken cells. Cell. 1979, 18:193-205.
Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. Science. 1999, 285:1028-32.
Giancotti FG. A structural view of integrin activation and signaling. Dev Cell. 2003, 4:149-51.
Gilmore AP, Burridge K. Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidyl-inositol-4-5-bisphosphate. Nature. 1996, 381:531-5.
Gilot D, Serandour AL, Ilyin GP, Lagadic-Gossmann D, Loyer P, Corlu A, Coutant A, Baffet G, Peter ME, Fardel O, Guguen-Guillouzo C. A role for caspase-8 and c-FLIPL in proliferation and cell-cycle progression of primary hepatocytes. Carcinogenesis. 2005, 26:2086-94.
Gil-Parrado S, Popp O, Knoch TA, Zahler S, Bestvater F, Felgenträger M, Holloschi A, Fernández-Montalván A, Auerswald EA, Fritz H, Fuentes-Prior P, Machleidt W, Spiess E. Subcellular localization and in vivo subunit interactions of ubiquitous mu-calpain. J Biol Chem. 2003, 278:16336-46.

Gimona M, Grashoff C, Kopp P. Oktoberfest for adhesion structures. EMBO Rep. 2005, 6:922-6.

Glading A, Chang P, Lauffenburger DA, Wells A. Epidermal growth factor receptor activation of calpain is required for fibroblast motility and occurs via an ERK/MAP kinase signaling pathway. J Biol Chem. 2000, 275:2390-8.

Glading A, Lauffenburger DA, Wells A. Cutting to the chase: calpain proteases in cell motility. Trends Cell Biol. 2002, 12:46-54.

Glading A, Bodnar RJ, Reynolds IJ, Shiraha H, Satish L, Potter DA, Blair HC, Wells A. Epidermal growth factor activates m-calpain (calpain II), at least in part, by extracellular signal-regulated kinase-mediated phosphorylation. Mol Cell Biol. 2004, 24:2499-512.

Gluck U, Kwiatkowski DJ, Ben-Ze'ev A. Suppression of tumorigenicity in simian virus 40-transformed 3T3 cells transfected with alpha-actinin cDNA. Proc Natl Acad Sci. 1993, 90:383-7.

Gluck U, Ben-Ze'ev A. Modulation of alpha-actinin levels affects cell motility and confers tumorigenicity on 3T3 cells. J Cell Sci. 1994, 107:1773-82.

Goll DE, Thompson VF, Taylor RG, Zalewska T. Is calpain activity regulated by membranes and autolysis or by calcium and calpastatin? Bioessays. 1992, 14:549-56.

Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J. The calpain system. Physiol Rev. 2003, 83:731-801.

Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. Eur J Cell Biol. 1997, 74:111-22.

Gómez del Pulgar T, Benitah SA, Valerón PF, Espina C, Lacal JC. Rho GTPase expression in tumourigenesis: evidence for a significant link. Bioessays. 2005, 27:602-13.

Gonen H, Shkedy D, Barnoy S, Kosower NS, Ciechanover A. On the involvement of calpains in the degradation of the tumor suppressor protein p53. FEBS Lett. 1997, 406:17-22.

Goswami S, Sahai E, Wyckoff JB, Cammer M, Cox D, Pixley FJ, Stanley ER, Segall JE, Condeelis JS. Macrophages promote the invasion of breast carcinoma cells via a colony-stimulating factor-1/epidermal growth factor paracrine loop. Cancer Res. 2005, 65:5278-83.

Gouw LG, Reading NS, Jenson SD, Lim MS, Elenitoba-Johnson KS. Expression of the Rho-family GTPase gene RHOF in lymphocyte subsets and malignant lymphomas. Br J Haematol. 2005, 129:531-3.

Graham TR, Zhau HE, Odero-Marah VA, Osunkoya AO, Kimbro KS, Tighiouart M, Liu T, Simons JW, O'Regan RM. Insulin-like growth factor-I-dependent up-regulation of ZEB1 drives epithelial-to-mesenchymal transition in human prostate cancer cells. Cancer Res. 2008, 68:2479-88.

Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW, Bell K, Barucci N, Lee D, Goodyear LJ, Kraegen EW, White MF, Shulman GI. Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. Diabetes. 1999, 48:1270-4.

Grinnell F, Zhu M, Carlson MA, Abrams JM. Release of mechanical tension triggers apoptosis of human fibroblasts in a model of regressing granulation tissue. Exp Cell Res. 1999, 248:608-19.

Grynspan F, Griffin WR, Cataldo A, Katayama S, Nixon RA. Active site-directed antibodies identify calpain II as an early-appearing and pervasive component of neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. Brain Res. 1997, 763:145-58.

Gu J, Tamura M, Yamada KM. Tumour suppressor PTEN inhibits integrin- and growth factor-mediated mitogen-activated protein (MAP) kinase signalling pathways. J Cell Biol. 1998, 143:1375-83.

Guan JL, Shalloway D. Regulation of focal adhesion-associated protein tyrosine kinase by both cellular adhesion and oncogenic transformation. Nature. 1992, 358:690-2.

Gupton SL, Gertler FB. Filopodia: the fingers that do the walking. Sci. STKE. 2007, re5 (2007).

Guroff G. A neutral, calcium-activated proteinase from the soluble fraction of rat brain. J Biol Chem. 1964, 239:149-55.

Hall A. Small GTP-binding proteins and the regulation of the actin cytoskeleton. Annu Rev Cell Biol. 1994, 10:31–54.

Hall CL, Lange LA, Prober DA, Zhang S, Turley EA. pp60(c-src) is required for cell locomotion regulated by the hyaluronanreceptor RHAMM. Oncogene. 1996, 13:2213-24.

Hall A. Rho GTPases and the control of cell behaviour. Biochem Soc Trans. 2005, 33:891-5.

Hanis CL, Boerwinkle E, Chakraborty R, Ellsworth DL, Concannon P Stirling B, Morrison VA, Wapelhorst B, Spielman RS, Gogolin-Ewens KJ, Shepard JM, Williams SR, Risch N, Hinds D, Iwasaki N, Ogata M, Omori Y, Petzold C, Rietzch H, Schröder HE, Schulze J, Cox NJ, Menzel S, Boriraj VV, Chen X, Lim LR, Lindner T, Mereu LE, Wang YQ, Xiang K, Yamagata K, Yang Y, Bell GI. A genome-wide search for human non-insulin-dependent (type 2) diabetes genes reveals a major susceptibility locus on chromosome 2. Nat Genet. 1996, 13:161-6.

Haraguchi M, Okubo T, Miyashita Y, Miyamoto Y, Hayashi M, Crotti TN, McHugh KP, Ozawa M. Snail regulates cell-matrix adhesion by regulation of the expression of integrins and basement membrane proteins. J Biol Chem. 2008, 283:23514-23.

Harris AS, Croall DE, Morrow JS. Calmodulin regulates fodrin susceptibility to cleavage by calcium-dependent protease I. J Biol Chem. 1989, 264:17401-8.

Harte MT, Hildebrand JD, Burnham MR, Bouton AH, Parsons JT. p130Cas, a substrate associated with v-Src and v-Crk, localizes to focal adhesions and binds to focal adhesion kinase. J Biol Chem. 1996, 271:13649-55.

Hartwig JH, Kwiatkowski DJ. Actin-binding proteins. Curr Opin Cell Biol.1991, 3:87-97.

Hata S, Koyama S, Kawahara H, Doi N, Maeda T, Toyama-Sorimachi N, Abe K, Suzuki K, Sorimachi H. Stomach-specific calpain, nCL-2, localizes in mucus cells and proteolyzes the beta-subunit of coatomer complex, beta-COP. J Biol Chem. 2006, 281:11214-24.

Hata S, Doi N, Kitamura F, Sorimachi H. Stomach-specific calpain, nCL-2/calpain 8, is active without calpain regulatory subunit and oligomerizes through C2-like domains. J Biol Chem. 2007, 282:27847-56.

Hatanaka H, Ogura K, Moriyama K, Ichikawa S, Yahara I, Inagaki F. Tertiary structure of destrin and structural similarity between two actin-regulating protein families. Cell. 1996, 85:1047-55.

Hauck CR, Hsia DA, Ilic D, Schlaepfer DD. v-Src SH3-enhanced interaction with focal adhesion kinase at beta 1 integrin-containing invadopodia promotes cell invasion. J Biol Chem. 2002, 277:12487-90.

Hawkins M, Pope B, Maciver SK, Weeds AG. Human actin depolymerizing factor mediates a pH-sensitive destruction of actin filaments. Biochemistry. 1993, 32:9985-93.

Hay WW, Groodthuis JR, Hayward AR, Levin MJ. Rhabdomyosarcoma – Appleton and Lange (ed.). Pediatric Diagnosis and Treatment. 1995, 1170-1173.

Hayashi M, Saito Y, Kawashima S. Calpain activation is essential for membrane fusion of erythrocytes in the presence of exogenous Ca2+. Biochem Biophys Res Commun. 1992, 182:939-46.

Hayashi Y, Haimovich B, Reszka A, Boettiger D, Horwitz A. Expression and function of chicken integrin beta 1 subunit and its cytoplasmic domain mutants in mouse NIH 3T3 cells. J Cell Biol. 1990, 110:175–84.

Hayden SM, Miller PS, Brauweiler A, Bamburg JR. Analysis of the interactions of actin depolymerizing factor with G- and F-actin. Biochemistry. 1993, 32:9994-10004.

Hayes-Jordan A, Andrassy R. Rhabdosarcoma in children. Curr Opin Pediatr. 2009, 21:373-8.

Helfer B, Boswell BC, Finlay D, Cipres A, Vuori K, Bong Kang T, Wallach D, Dorfleutner A, Lahti JM, Flynn DC, Frisch SM. Caspase-8 promotes cell motility and calpain activity under nonapoptotic conditions. Cancer Res. 2006, 66:4273-8.

Herasse M, Ono Y, Fougerousse F, Kimura E, Stockholm D, Beley C, Montarras D, Pinset C, Sorimachi H, Suzuki K, Beckmann JS, Richard I. Expression and functional characteristics of calpain 3 isoforms generated through tissue-specific transcriptional and posttranscriptional events. Mol Cell Biol. 1999, 19:4047-55.

Hesson L, Dallol A, Minna JD, Maher ER, Latif F. NORE1A, a homologue of RASSF1A tumour suppressor gene is inactivated in human cancers. Oncogene. 2003, 22:947-54.

Hitchcock-DeGregori SE, Sampath P, Pollard TD. Tropomyosin inhibits the rate of actin polymerization by stabilizing actin filaments. Biochemistry. 1988, 27:9182–5.

Hildebrand JD, Schaller MD, Parsons JT. Paxillin, a tyrosine phosphorylated focal adhesion-associated protein binds to the carboxyl terminal domain of focal adhesion kinase. Mol Biol Cell. 1995, 6:637–47.

Hirai S, Kawasaki H, Yaniv M, Suzuki K. Degradation of transcription factors, c-Jun and c-Fos, by calpain. FEBS Lett. 1991, 287:57-61.

Hordijk PL, ten Klooster JP, van der Kammen RA, Michiels F, Oomen LC, Collard JG. Inhibition of invasion of epithelial cells by Tiam1-Rac signaling. Science. 1997, 278:1464-6.

Horikawa Y, Oda N, Cox NJ, Li X, Orho-Melander M, Hara M, Hinokio Y, Lindner TH, Mashima H, Schwarz PE, del Bosque-Plata L, Horikawa Y, Oda Y, Yoshiuchi I, Colilla S, Polonsky KS, Wei S, Concannon P, Iwasaki N, Schulze J, Baier LJ, Bogardus C, Groop L, Boerwinkle E, Hanis CL, Bell GI. Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. Nat Genet. 2000, 26:163-75.

Horwitz A, Duggan K, Buck C, Beckerle MC, Burridge K. Interaction of plasma membrane fibronectin receptor with talin—a transmembrane linkage. Nature. 1986, 320:531-3.

Hosoi H, Sugimoto T, Hayashi Y, Inaba T, Horii Y, Morioka H, Fushiki S, Hamazaki M, Sawada T. Differential expression of myogenic regulatory genes, MyoD1 and myogenin, in human rhabdomyosarcoma sublines. Int J Cancer. 1992, 50:977-83.

Hotchin NA, Hall A. The assembly of integrin adhesion complexes requires both extracellular matrix and intracellular rho/ rac GTPases. J Cell Biol. 1995, 131:1857–65.

Howard EW, Leung SC, Yuen HF, Chua CW, Lee DT, Chan KW, Wang X, Wong YC. Decreased adhesiveness, resistance to anoikis and suppression of GRP94 are integral to the survival of circulating tumor cells in prostate cancer. Clin Exp Metastasis. 2008, 25:497-508.

Howe A, Aplin AE, Alahari SK, Juliano RL. Integrin signaling and cell growth control. Curr Opin Cell Biol. 1998, 10:220-31.

Hsia DA, Mitra SK, Hauck CR, Streblow DN, Nelson JA, Ilic D, Huang S, Li E, Nemerow GR, Leng J, Spencer KS, Cheresh DA, Schlaepfer DD. Differential regulation of cell motility and invasion by FAK. J Cell Biol. 2003, 160:753-67.

Huang YL, Shi GY, Lee H, Jiang MJ, Huang BM, Wu HL, Yang HY. Thrombin induces nestin expression via the transactivation of EGFR signalings in rat vascular smooth muscle cells. Cell Signal. 2009, 21:954-68.

Huang Y, Wang KK. The calpain family and human disease. Trends Mol Med. 2001, 7:355-62.

Hulit J, Suyama K, Chung S, Keren R, Agiostratidou G, Shan W, Dong X, Williams TM, Lisanti MP, Knudsen K, Hazan RB. N-cadherin signaling potentiates mammary tumor metastasis via enhanced extracellular signal-regulated kinase activation. Cancer Res. 2007, 67:3106-16.

Huttenlocher A, Palecek SP, Lu Q, Zhang W, Mellgren RL, Lauffenburger DA, Ginsberg MH, Horwitz AF. Regulation of cell migration by the calcium-dependent protease calpain. J Biol Chem. 1997, 272:32719-22.

Hyatt SL, Liao L, Chapline C, Jaken S. Identification andcharacterization of alpha-protein kinase C binding proteins in normal and transformed REF52 cells. Biochemistry. 1994, 33:1223–8.

Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. Cell. 2002, 110:673-87.

Ikura M. Calcium binding and conformational response in EF-hand proteins. Trends Biochem Sci. 1996, 21:14-7.

Ilic D, Furuta Y, Kanazawa S, Takeda N, Sobue K, Nakatsuji N, Nomura S, Fujimoto J, Okada M, Yamamoto T. Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. Nature. 1995, 377:539-44.

Imajoh S, Suzuki K. Reversible interaction between Ca2+-activated neutral protease (CANP) and its endogenous inhibitor. FEBS Lett. 1985, 187:47-50.

Ito A, Kataoka TR, Watanabe M, Nishiyama K, Mazaki Y, Sabe H, Kitamura Y, Nojima H. A truncated isoform of the PP2A B56 subunit promotes cell motility through paxillin phosphorylation. EMBO J. 2000, 19:562–71.

Jancso A, Graceffa P. Smooth muscle tropomyosin coiled-coil dimers. Subunit composition, assembly, end-to-end interaction. J Biol Chem. 1991, 266:5891–7.

Jékely G, Friedrich P. Characterization of two recombinant Drosophila calpains. CALPA and a novel homolog, CALPB. J Biol Chem. 1999, 274:23893-900.

Jia L, Xu H, Zhao Y, Jiang L, Yu J, Zhang J . Expression of CD147 mediates tumor cells invasion and multidrug resistance in hepatocellular carcinoma. Cancer Invest. 2008, 26:977-83.

Jockusch BM, Bubeck P, Giehl K, Kroemker M, Moschner J, Rothkegel M, Rudiger M, Schluter K, Stanke G, Winkler J. The molecular architecture of focal adhesions. Annu Rev Cell Dev Biol. 1995, 11:379–416.

Johnson RP, Craig SW. An intramolecular association between the head and tail domains of vinculin modulates talin binding. J Biol Chem. 1994, 269:12611–9.

Johnson RP, Craig SW. F-actin binding site masked by the intramolecular association of vinculin head and tail domains. Nature. 1995, 373:261–4.

Johnson JD, Han Z, Otani K, Ye H, Zhang Y, Wu H, Horikawa Y, Misler S, Bell GI, Polonsky KS. RyR2 and calpain-10 delineate a novel apoptosis pathway in pancreatic islets. J Biol Chem. 2004, 279:24794-802.

Jones GE, Allen WE, Ridley AJ. The Rho GTPases in macrophage motility and chemotaxis. Cell Adhes Commun. 1998, 6:237–45.

Kahana O, Micksche M, Witz IP, Yron I. The focal adhesion kinase (P125FAK) is constitutively active in human malignant melanoma. Oncogene. 2002, 21:3969-77.

Kalebic T, Tsokos M, Helman LJ. In vivo treatment with antibody against IGF-1 receptor suppresses growth of human rhabdomyosarcoma and down-regulates p34cdc2. Cancer Res. 1994, 54:5531-4.

Kamei M, Webb GC, Young IG, Campbell HD. SOLH, a human homologue of the Drosophila melanogaster small optic lobes gene is a member of the calpain and zinc-finger gene families and maps to human chromosome 16p13.3 near CATM (cataract with microphthalmia). Genomics. 1998, 51:197-206.

Kao WJ. Evaluation of protein-modulated macrophage behaviour on biomaterials: Designing biomimetic materials for cellular engineering. Biomaterials. 1999, 20:2213-21.

Kaplan KB, Swedlow JR, Morgan DO, Varmus HE. c-Src enhances the spreading of src–/– fibroblasts on fibronectin by a kinase-independent mechanism. Genes Dev. 1995, 9:1505-17.

Kapprell HP, Goll DE. Effect of Ca2+ on binding of the calpains to calpastatin. J Biol Chem. 1989, 264:17888-96.

Katoh K, Kano Y, Ookawara S. Rho-kinase dependent organization of stress fibers and focal adhesions in cultured fibroblasts. Genes to Cells. 2007, 12:623-38.

Kawasaki H, Emori Y, Imajoh-Ohmi S, Minami Y, Suzuki K. Identification and characterization of inhibitory sequences in four repeating domains of the endogenous inhibitor for calcium-dependent protease. J Biochem. 1989, 106:274-81.

Keely PJ, Fong AM, Zutter MM, Santoro SA. Alteration of collagen-dependent adhesion, motility, and morphogenesis by the expression of antisense alpha 2 integrin mRNA in mammary cells. J Cell Sci. 1995, 108:595-607.

Keller C, Hansen MS, Coffin CM, Capecchi MR. Pax3:Fkhr interferes with embryonic Pax3 and Pax7 function: implications for alveolar rhabdomyosarcoma cell of origin. Genes Dev. 2004a, 18:2608-13.

Keller C, Arenkiel BR, Coffin CM, El-Bardeesy N, DePinho RA, Capecchi MR. Alveolar rhabdomyosarcomas in conditional Pax3:Fkhr mice: cooperativity of Ink4a/ARF and Trp53 loss of function. Genes Dev. 2004b, 18:2614-26.

Kelly KM, Womer RB, Sorensen PH, Xiong QB, Barr FG. Common and variant gene fusions predict distinct clinical phenotypes in rhabdomyosarcoma. J Clin Oncol. 1997, 15:1831-6.

Kelly T, Yan Y, Osborne RL, Athota AB, Rozypal TL, Colclasure JC, Chu WS. Proteolysis of extracellular matrix by invadopodia facilitates human breast cancer cell invasion and is mediated by matrix metalloproteinases. Clin Exp Metastasis. 1998, 16:501-12.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR.
Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer. 1972, 26:239-57.

Khorchid A, Ikura M. How calpain is activated by calcium. Nat Struct Biol. 2002, 9:239-41.

Kidd VJ, Lahti JM, Teitz T. Proteolytic regulation of apoptosis. Semin Cell Dev Biol. 2000, 11:191-201.

Kiema T, Lad Y, Jiang P, Oxley CL, Baldassarre M, Wegener KL, Campbell ID, Ylänne J, Calderwood DA. The molecular basis of filamin binding to integrins and competition with talin. Mol Cell. 2006, 21:337-47.

Kim JH, Hahm B, Kim YK, Choi M, Jang SK. Protein-protein interaction among hnRNPs shuttling between nucleus and cytoplasm. J Mol Biol. 2000, 298:395-405.

Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng J, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). Science. 1996, 273:245-8.

Kimura Y, Saya H, Nakao M. Calpain-dependent proteolysis of NF2 protein: involvement in schwannomas and meningiomas. Neuropathology. 2000, 20:153-60.

Kinbara K, Ishiura S, Tomioka S, Sorimachi H, Jeong SY, Amano S, Kawasaki H, Kolmerer B, Kimura S, Labeit S, Suzuki K. Purification of native p94, a muscle-specific calpain, and characterization of its autolysis. Biochem J. 1998, 335:589-96.

Kioka N, Sakata S, Kawauchi T, Amachi T, Akiyama SK, Okazaki K, Yaen C, Yamada KM, Aota S. Vinexin: a novel vinculinbinding protein with multiple SH3 domains enhances actin cytoskeletal organization. J Cell Biol. 1999, 144:59-69.

Kleer CG, van Golen KL, Zhang Y, Wu ZF, Rubin MA, Merajver SD. Characterization of RhoC expression in benign and malignant breast disease: a potential new marker for small breast carcinomas with metastatic ability. Am J Pathol. 2002, 160:579-84.

Klemke RL, Leng J, Molander R, Brooks PC, Vuori K, Cheresh DA. CAS/Crk coupling serves as a "molecular switch" for induction of cell migration. J Cell Biol. 1998, 140:961-72.

Kobayashi M, Sjöberg G, Söderhäll S, Lendahl U, Sandstedt B, Sejersen T.
Pediatric rhabdomyosarcomas express the intermediate filament nestin.
Pediatr Res. 1998, 43:386-92.

Koenig A, Mueller C, Hasel C, Adler G, Menke A.
Collagen type I induces disruption of E-cadherin-mediated cell-cell contacts and promotes proliferation of pancreatic carcinoma cells.
Cancer Res. 2006, 66:4662-71.

Kolch W. Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. Nat Rev Mol Cell Biol. 2005, 6:827-37.

Konig N, Raynaud F, Feane H, Durand M, Mestre-Frances N, Rossel M, Ouali A, Benyamin Y. Calpain 3 is expressed in astrocytes of rat and Microcebus brain. J. Chem. Neuroanat. 2003, 25:129-36.

Kornberg LJ. Focal adhesion kinase and its potential involvement in tumor invasion and metastasis. Head Neck. 1998, 20:745-52.

Kretsinger RH. Gene triplication deduced from the tertiary structure of a muscle calcium binding protein. Nat New Biol. 1972, 240:85-8.

Kroemker M, Rudiger AH, Jockusch BM, Rudiger M. Intramolecular interactions in vinculin control alpha-actinin binding to the vinculin head. FEBS Lett. 1994, 355:259-62.

Kubbutat MH, Vousden KH. Proteolytic cleavage of human p53 by calpain: a potential regulator of protein stability. Mol Cell Biol. 1997, 17:460-8.

Kulkarni S, Saido TC, Suzuki K, Fox JE. Calpain mediates integrin-induced signaling at a point upstream of Rho family members. J Biol Chem. 1999, 274:21265-75.

Kulkarni S, Goll DE, Fox JE. Calpain cleaves RhoA generating a dominant-negative form that inhibits integrin-induced actin filament assembly and cell spreading. J Biol Chem. 2002, 277:24435-41.

Kumar A, Shafiq S, Wadgaonkar R, Stracher A. The effect of protease inhibitors, leupeptin and E64d, on differentiation of C2C12 myoblasts in tissue culture. Cell Mol Biol. 1992, 38:687-91.

Kusakawa G, Saito T, Onuki R, Ishiguro K, Kishimoto T, Hisanaga S. Calpain-dependent proteolytic cleavage of the p35 cyclin-dependent kinase 5 activator to p25. J Biol Chem. 2000, 275:17166-72.

Kuznetsov S, Khokhlatchev AV. The growth and tumor suppressors NORE1A and RASSF1A are targets for calpain-mediated proteolysis. PLoS One. 2008, 3:e3997.

Kwiatkowski DJ. Functions of gelsolin: motility, signalling, apoptosis, cancer. Curr Opin Cell Biol. 1999, 11:103-8.

Kwak KB, Kambayashi J, Kang MS, Ha DB, Chung CH. Cell-penetrating inhibitors of calpain block both membrane fusion and filamin cleavage in chick embryonic myoblasts. FEBS Lett. 1993, 323:151-4.

La Flamme SE, Akiyama SK, Yamada KM. Regulation of fibronectin receptor distribution. J Cell Biol. 1992, 117:437-47.

Lakshmikuttyamma A, Selvakumar P, Kanthan R, Kanthan SC, Sharma RK. Overexpression of m-calpain in human colorectal adenocarcinomas. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2004, 13:1604-9.

Lal AA, Korn ED. Effect of muscle tropomyosin on the kinetics of polymerization of muscle actin. Biochemistry. 1986, 25:1154-8.

Lambrechts A, Van Troys M, Ampe C. The actin cytoskeleton in normal and pathological cell motility. Int J Biochem Cell Biol. 2004, 36:1890-909.

Lang P, Gesbert F, Delespine-Carmagnat M, Stancou R, Pouchelet M, Bertoglio J. Protein kinase A phosphorylation of RhoA mediates the morphological and functional effects of cyclic AMP in cytotoxic lymphocytes. EMBO J. 1996, 15:510-9.

Lee WJ, Ma H, Takano E, Yang HQ, Hatanaka M, Maki M. Molecular diversity in amino-terminal domains of human calpastatin by exon skipping. J Biol Chem. 1992, 267:8437-42.

Lee HJ, Sorimachi H, Jeong SY, Ishiura S, Suzuki K. Molecular cloning and characterization of a novel tissue-specific calpain predominantly expressed in the digestive tract. Biol Chem. 1998, 379:175-83.

Lee HJ, Tomioka S, Kinbara K, Masumoto H, Jeong SY, Sorimachi H, Ishiura S, Suzuki K. Characterization of a human digestive tract-specific calpain, nCL-4, expressed in the baculovirus system. Arch Biochem Biophys. 1999, 362:22-31.

Lee MS, Kwon YT, Li M, Peng J, Friedlander RM Tsai LH. Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. Nature. 2000, 405:360-4.

Lee SU, Rhee M, Min YK, Kim SH. Involvement of peroxiredoxin IV in the 16alpha-hydroxyestrone-induced proliferation of human MCF-7 breast cancer cells. Cell Biol Int. 2008, 32:401-5.

Lehrer SS, Qian YD, Hvidt S. Assembly of the native hétérodimère of Rana esculenta tropomyosin by chain exchange. Science. 1989, 246:926-8.

Leissring MA, Akbari Y, Fanger CM, Cahalan MD, Mattson MP, LaFerla FM. Capacitative calcium entry deficits and elevated luminal calcium content in mutant presenilin-1 knockin mice. J Cell Biol. 2000, 149:793-8.

Lemmers B, Salmena L, Bidère N, Su H, Matysiak-Zablocki E, Murakami K, Ohashi PS, Jurisicova A, Lenardo M, Hakem R, Hakem A. Essential role for caspase-8 in Toll-like receptors and NFkappaB signaling. J Biol Chem. 2007, 282:7416-23.

Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. Cell. 1990, 60:585-95.

Lenter M, Vestweber D. The integrin chains beta 1 and alpha 6 associate with the chaperone calnexin prior to integrin assembly. J Biol Chem. 1994, 269:12263-8.

Lens SM, Kataoka T, Fortner KA, Tinel A, Ferrero I, MacDonald RH, Hahne M, Beermann F, Attinger A, Orbea HA, Budd RC, Tschopp J. The caspase 8 inhibitor c-FLIP(L) modulates T-cell receptor-induced proliferation but not activation-induced cell death of lymphocytes. Mol Cell Biol. 2002, 22:5419-33.

Leonard SA, Gittis AG, Petrella EC, Pollard TD, Lattman EE. Crystal structure of the actin-binding protein actophorin from Acanthamoeba. Nat Struct Biol. 1997, 4:369-73.

Leung T, Manser E, Tan L, Lim L. A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes. J Biol Chem. 1995, 270:29051-4.

Lewis AK, Bridgman PC. Nerve growth cone lamellipodia contain two populations of actin filaments that differ in organization and polarity. J Cell Biol. 1992, 119:1219-43.

Liliental J, Chang DD. Rack1, a receptor for activated protein kinase C, interacts with integrin beta subunit. J Biol Chem. 1998, 273:2379-83.

Lin JJ, Helfman DM, Hughes SH, Chou CS. Tropomyosin isoforms in chicken embryo fibroblasts: purification, characterization, changes in Rous sarcoma virus-transformed cells. J Cell Biol. 1985, 100:692-703.

Linder S, Nelson D, Weiss M, Aepfelbacher M. Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates podosomes in primary human macrophages. Proc Natl Acad Sci. 1999, 96:9648-53.

Linder S, Aepfelbacher M. Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells. Trends Cell Biol. 2003, 13:376-85.

Linder S. The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation. Trends Cell Biol. 2007, 17:107-17.

Lindon C, Montarras D, Pinset C. Cell cycle-regulated expression of the muscle determination factor Myf5 in proliferating myoblasts. J Cell Biol. 1998, 140:111-8.

Liu S, Thomas SM, Woodside DG, Rose DM, Kiosses WB, Pfaff M, Ginsberg MH. Binding of paxillin to alpha4 integrins modifies integrin-dependent biological responses. Nature 1999, 402:676-81.

Liu K, Li L, Cohen SN. Antisense RNA-mediated deficiency of the calpain protease, nCL-4, in NIH3T3 cells is associated with neoplastic transformation and tumorigenesis. J Biol Chem. 2000, 275:31093-8.

Lo SH, Janmey PA, Hartwig JH, Chen LB. Interactions of tensin with actin and identification of its three distinct actin-binding domains. J Cell Biol. 1994, 125:1067-75.

Lo CM, Wang HB, Dembo M, Wang YL. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. Biophys J. 2000, 79:144-52.

Lo HW, Hsu SC, Xia W, Cao X, Shih JY, Wei Y, Abbruzzese JL, Hortobagyi GN, Hung MC. Epidermal growth factor receptor cooperates with signal transducer and activator of transcription 3 to induce epithelial-mesenchymal transition in cancer cells via up-regulation of TWIST gene expression. Cancer Res. 2007, 67:9066-76.

Lochter A, Galosy S, Muschler J, Freedman N, Werb Z, Bissell MJ. Matrix metalloproteinasr stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that leads to stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells. J Cell Biol. 1997, 139:1861-72.

Lorenz M, Poole KJ, Popp D, Rosenbaum G, Holmes KC. An atomic model of the unregulated thin filament obtained by X-ray fiber diffraction on oriented actin-tropomyosin gels. J Mol Biol. 1995, 246:108-19.

Lorenz M, Yamaguchi H, Wang Y, Singer RH, Condeelis J. Imaging sites of N-wasp activity in lamellipodia and invadopodia of carcinoma cells. Curr Biol. 2004, 14:697-703.

Lozano E, Betson M, Braga VM. Tumor progression: Small GTPases and loss of cell-cell adhesion. Bioessays. 2003, 25:452-63.

Lu T, Xu Y, Mericle MT, Mellgren RL. Participation of the conventional calpains in apoptosis. Biochim Biophys. 2002, 1590:16-26.

Lukashev ME, Sheppard D, Pytela R. Disruption of intégrine function and induction of tyrosine phosphorylation by the autonomously expressed beta 1 integrin cytoplasmic domain. J Biol Chem. 1994, 269:18311-4.

Ma H, Yang HQ, Takano E, Hatanaka M, Maki M. Amino-terminal conserved region in proteinase inhibitor domain of calpastatin potentiates its calpain inhibitory activity by interacting with calmodulin-like domain of the proteinase. J Biol Chem. 1994, 269:24430-6.

Ma H, Fukiage C, Azuma M, Shearer TR. Cloning and expression of mRNA for calpain Lp82 from rat lens: splice variant of p94. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1998a, 39:454-61.

Ma H, Shih M, Hata I, Fukiage C, Azuma M Shearer TR. Protein for Lp82 calpain is expressed and enzymatically active in young rat lens. Exp Eye Res. 1998b, 67:221-9.

Ma H, Fukiage C, Kim YH, Duncan MK, Reed NA, Shih M, Azuma M, Shearer TR. Characterization and expression of calpain 10. A novel ubiquitous calpain with nuclear localization. J Biol Chem. 2001, 276:28525-31.

Makawita S, Ho M, Durbin AD, Thorner PS, Malkin D, Somers GR. Expression of insulin-like growth factor pathway proteins in rhabdomyosarcoma: IGF-2 expression is associated with translocation-negative tumors. Pediatr Dev Pathol. 2009, 12:127-35.

Maki M, Takano E, Osawa T, Ooi T, Murachi T, Hatanaka M. Analysis of structure-function relationship of pig calpastatin by expression of mutated cDNAs in Escherichia coli. J Biol Chem. 1988, 263:10254-61.

Maki M, Bagci H, Hamaguchi K, Ueda M, Murachi T, Hatanaka M. Inhibition of calpain by a synthetic oligopeptide corresponding to an exon of the human calpastatin gene. J Biol Chem. 1989, 264:18866-9.

Maki M, Hatanaka M, Takano E, Murachi T. Structure-function relationship of the calpastatins. Intracellular calcium-dependent proteolysis. CRC Press. Inc. Boca Raton. 1990, 32-51.

Malinari M, Anagli J, Carafolie E. PEST sequences do not influence substrate susceptibility to calpain proteolysis. J Biol Chem. 1995, 270:2032-5.

Mallavarapu A, Mitchison T. Regulated actin cytoskeleton assembly at filopodium tips controls their extension and retraction. J Cell Biol. 1999, 146:1097-106.

Mamoune A, Luo JH, Lauffenburger DA, Wells A. Calpain-2 as a target for limiting prostate cancer invasion. Cancer Res. 2003, 63:4632-40.

Markmann A, Schäfer S, Linz W, Löhn M, Busch AE, Wohlfart P. Down-regulation of calpain 9 is linked to hypertensive heart and kidney disease. Cell Physiol Biochem. 2005, 15:109-16.

Marchisio PC, Bergui L, Corbascio GC, Cremona O, D'Urso N, Schena M, Tesio L, Caligaris-Cappio F. Vinculin, talin, and integrins are localized at specific adhesion sites of malignant B lymphocytes. Blood. 1988, 72:830-3.

Martin SJ, O'brien GA, Nishioka WK, Mcgahon AJ, Mahboubi A, Saido TC, Green DR. Proteolysis of fodrin (non-erythroid spectrin) during apoptosis. J Biol Chem. 1995, 270:6425-8.

Matena K, Boehm T, Dear N. Genomic organization of mouse Capn5 and Capn6 genes confirms that they are a distinct calpain subfamily. Genomics. 1998, 48:117-20.

Matsumura F, Yamashiro-Matsumura S. Purification and characterization of multiple isoforms of tropomyosin from rat cultured cells. J Biol Chem. 1985, 260:13851-9.

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

McGough A, Way M. Molecular model of an actin filament capped by a severing protein. J Struct Biol. 1995, 115:144-50.

McLachlan AD, Stewart M. Tropomyosin coiled-coil interactions: evidence for an unstaggered structure. J Mol Biol. 1975, 98:293-304.

Meng XN, Jin Y, Yu Y, Bai J, Liu GY, Zhu J, Zhao YZ, Wang Z, Chen F, Lee KY, Fu SB. Characterisation of fibronectin-mediated FAK signalling pathways in lung cancer cell migration and invasion. Br J Cancer. 2009, 101:327-34.

Menkel AR, Kroemker M, Bubeck P, Ronsiek M, Nikolai G, Jockusch BM. Characterization of an F-actin-binding domain in the cytoskeletal protein vinculin. J Cell Biol. 1994, 126:1231-40.

Miki H, Suetsugu S, Takenawa T. WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. EMBO J. 1998, 17:6932-41.

Miyamoto S, Teramoto H, Coso OA, Gutkind JS, Burbelo PD, Akiyama SK, Yamada KM. Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signalling molecules. J Cell Biol. 1995, 131:791-805.

Mizutani K, Miki H, He H, Maruta H, Takenawa T. Essential role of neural Wiskott-Aldrich syndrome protein in podosome formation and degradation of extracellular matrix in src-transformed fibroblasts. Cancer Res. 2002, 62:669-74.

Moldoveanu T, Jia Z, Davies PL. Calpain activation by cooperative Ca2+ binding at two EF-hand sites. J Biol Chem. 2004, 279:6106-14.

Monsky WL, Lin CY, Aoyama A, Kelly T, Akiyama SK, Mueller SC, Chen WT. A potential marker protease of invasiveness, seprase, is localized on invadopodia of human malignant melanoma cells. Cancer Res. 1994, 54:5702-10.

Montell DJ. Morphogenetic cell movements: diversity from modular mechanical properties. Science. 2008, 322:1502-5.

Morgenstern DA, Rees H, Sebire NJ, Shipley J, Anderson J. Rhabdomyosarcoma subtyping by immunohistochemical assessment of myogenin: tissue array study and review of the literature. Pathol Oncol Res. 2008, 14:233-8.

Mortimore GE, Pösö AR. Lysosomal pathways in hepatic protein degradation: regulatory role of amino acids. Fed Proc. 1984, 43:1289-94.

Moshnikova A, Frye J, Shay JW, Minna JD, Khokhlatchev AV. The growth and tumor suppressor NORE1A is a cytoskeletal protein that suppresses growth by inhibition of the ERK pathway. J Biol Chem. 2006, 281:8143-52.

Mostafavi-Pour Z, Askari JA, Parkinson SJ, Parker PJ, Ng TT, Humphries MJ. Integrin-specific signaling pathways controlling focal adhesion formation and cell migration. J Cell Biol. 2003, 161:155-67.

Mozdziak PE, Dibner JJ, McCoy DW. The effect of early posthatch starvation on calpain mRNA levels. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 2002, 133:221-6.

Mudry RE, Perry CN, Richards M, Fowler VM, Gregorio CC. The interaction of tropomodulin with tropomyosin stabilizes thin filaments in cardiac myocytes. J Cell Biol. 2003, 162:1057–68.

Mueller SC, Chen WT. Cellular invasion into matrix beads: localization of beta 1 integrins and fibronectin to the invadopodia. J Cell Sci. 1991, 99:213-25.

Mueller SC, Ghersi G, Akiyama SK, Sang QX, Howard L, Pineiro-Sanchez M, Nakahara H, Yeh Y, Chen WT. A novel protease-docking function of integrin at invadopodia. J Biol Chem. 1999, 274:24947-52.

Mugita N, Kimura Y, Ogawa M, Saya H, Nakao M. Identification of a novel, tissue-specific calpain htra-3; a human homologue of the Caenorhabditis elegans sex determination gene. Biochem Biophys Res Commun. 1997, 239:845-50.

Murphy-Ullrich JE, Lightner VA, Aukhil I, Yan YZ, Erickson HP, Hook M. Focal adhesion integrity is downregulated by the alternatively spliced domain of human tenascin. J Cell Biol. 1991, 115:1127-36.

Murphy-Ullrich JE, Pallero MA, Boerth N, Greenwood JA, Lincoln TM, Cornwell TL. Cyclic GMP-dependent protein kinase is required for thrombospondin and tenascin mediated focal adhesion disassembly. J Cell Sci. 1996, 109:2499-508.

Mykles DL, Skinner DM. Four Ca2+-dependent proteinase activities isolated from crustacean muscle differ in size, net charge, and sensitivity to Ca2+ and inhibitors. J Biol Chem. 1986, 261:9865-71

Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. J Biol Chem. 1999, 274:21491-4.

Nakagawa T, Yuan J. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. J Cell Biol. 2000, 150: 887-94.

Nakahara H, Nomizu M, Akiyama SK, Yamada Y, Yeh Y, Chen WT. A mechanism for regulation of melanoma invasion. Ligation of alpha6beta1 integrin by laminin G peptides. J Biol Chem. 1996, 271:27221-4.

Nakahara H, Mueller SC, Nomizu M, Yamada Y, Yeh Y, Chen WT. Activation of beta1 integrin signaling stimulates tyrosine phosphorylation of p190RhoGAP and membrane-protrusive activities at invadopodia. J Biol Chem. 1998, 273:9-12.

Nakahara H, Otani T, Sasaki T, Miura Y, Takai Y, Kogo M. Involvement of Cdc42 and Rac small G proteins in invadopodia formation of RPMI7951 cells. Genes Cells. 2003, 8:1019-27.

Nakamura N, Tanaka J, Sobue K. Rous sarcoma virus-transformed cells develop peculiar adhesive structures along the cell periphery. J. Cell Sci. 1993, 106:1057–69.

Nakamura Y, Fukiage C, Shih M, Ma H, David LL Azuma M, Shearer TR. Contribution of calpain Lp82-induced proteolysis to experimental cataractogenesis in mice. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2000, 41:1460-6.

Neff NT, DeMartino GN, Goldberg AL. The effect of protease inhibitors and decreased temperature on the degradation of different classes of proteins in cultured hepatocytes. J Cell Physiol. 1979, 101:439-57.

Neely AN, Cox JR, Fortney JA, Schworer CM, Mortimore GE. Alterations of lysosomal size and density during rat liver perfusion. Suppression by insulin and amino acids. J Biol Chem. 1977, 252:6948-54.

Neumar RW, Hagle SM, Degracia DJ, Krause GS, White BC. Brain mu-calpain autolysis during global cerebral ischemia. J Neurochem. 1996, 66:421-24.

Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. Trends Biochem Sci. 1997, 22:299-306.

Nieman MT, Prudoff RS, Johnson KR, Wheelock MJ. N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. J Cell Biol. 1999, 147:631-44.

Nishida E, Maekawa S, Sakai H. Cofilin, a protein in porcine brain that binds to actin filaments and inhibits their interactions with myosin and tropomyosin. Biochemistry. 1984, 23:5307-13.

Nuckolls GH, Romer LH, Burridge K. Microinjection of antibodies against talin inhibits the spreading and migration of fibroblasts. J Cell Sci. 1992, 102:753-62.

Ogata S, Misumi Y, Ikehara Y. Primary structure of rat liver dipeptidyl peptidase IV deduced from its cDNA and identification of the N-terminal signal sequence as the membrane-anchoring domain. J Biol Chem. 1989, 264:3596-3601.

Okada M, Nakagawa H. A protein tyrosine kinase involved in regulation of pp60c-src function. J Biol Chem. 1989, 264:20886-93.

Ono Y, Sorimachi H, Suzuki K. Structure and physiology of calpain, an enigmatic protease. Biochem Biophy Res Commun. 1998a, 245:289-94.

Ono Y, Shimada H, Sorimachi H, Richard I, Saido TC, Beckmann JS, Ishiura S, Suzuki K. Functional defects of a muscle-specific calpain, p94, caused by mutations associated with limb-girdle muscular dystrophy type 2A. J Biol Chem. 1998b, 273:17073-8.

Orho-Melander M, Klannemark M, Svensson MK, Ridderstrale M, Lindgren CM, Groop L. Variants in the calpain-10 gene predispose to insulin resistance and elevated free fatty acid levels. Diabetes. 2002, 51:2658-64.

Otey CA, Carpen O. Alpha-actinin revisited: a fresh look at an old player. Cell Motil Cytoskeleton. 2004, 58:104–11.

Otey CA, Pavalko FM, Burridge K. An interaction between alpha-actinin and the beta 1 integrin subunit in vitro. J. Cell Biol. 1990, 111:721-9.

Otsuka Y, Goll DE. Purification of the Ca2+-dependent proteinase inhibitor from bovine cardiac muscle and its interaction with the millimolar Ca2+-dependent proteinase. J Biol Chem. 1987, 262:5839-51.

Owens LV, Xu L, Craven RJ, Dent GA, Weiner TM, Kornberg L, Liu ET, Cance WG. Overexpression of the focal adhesion kinase (p125FAK) in invasive human tumors. Cancer Res. 1995, 55:2752-5.

Painter KJ. Modelling cell migration strategies in the extracellular matrix. J Math Biol. 2009, 58:511-43.

Pakula R, Melchior A, Denys A, Vanpouille C, Mazurier J, Allain F. Syndecan-1/CD147 association is essential for cyclophilin B-induced activation of p44/42 mitogen-activated protein kinases and promotion of cell adhesion and chemotaxis. Glycobiology. 2007, 17:492-503.

Palecek SP, Schmidt CE, Lauffenburger DA, Horwitz AF. Integrin dynamics on the tail region of migrating fibroblasts. J Cell Sci. 1996, 109:941-52.

Palecek SP, Huttenlocher A, Horwitz AF Lauffenburger DA. Physical and biochemical regulation of integrin release during rear detachment of migrating cells. J Cell Sci. 1998, 111:929-40.

Parham DM, Webber B, Holt H, Williams WK, Maurer H. Immunohistochemical study of childhood rhabdomyosarcomas and related neoplasms. Results of an intergroup rhabdomyosarcoma study project. Cancer. 1991, 67:3072-80.

Parham DM, Ellison DA. Rhabdomyosarcomas in adults and children: an update. Arch Pathol Lab Med. 2006, 130:1454-65.

Pariat M, Salvat C, Bébien M, Brockly F, Altieri E, Carillo S, Jariel-Encontre I, Piechaczyk M. The sensitivity of c-Jun and c-Fos proteins to calpains depends on conformational determinants of the monomers and not on formation of dimers. Biochem J. 2000, 345:129-38.

Park JJ, Chang HW, Jeong EJ, Roh JL, Choi SH, Jeon SY, Ko GH, Kim SY. Peroxiredoxin IV protects cells from radiation-induced apoptosis in head-and-neck squamous cell carcinoma. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2009, 73:1196-202.

Parr T, Sensky PL, Bardsley RG, Buttery PJ. Calpastatin expression in porcine cardiac and skeletal muscle and partial gene structure. Arch Biochem Biophys. 2001, 395:1-13

Partridge MA, Marcantonio EE. Initiation of attachment and generation of mature focal adhesions by integrin-containing filopodia in cell spreading. Mol Biol Cell. 2006, 17:4237-48.

Perelroizen I, Didry D, Christensen H, Chua NH, Carlier MF. Role of nucleotide exchange and hydrolysis in the function of profilin in action assembly. J Biol Chem. 1996, 271:12302-9.

Perl AK, Wilgenbus P, Dahl U, Semb H, Christofori G. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. Nature. 1998, 392:190-3.

Perrin BJ, Amann KJ, Huttenlocher A. Proteolysis of cortactin by calpain regulates membrane protrusion during cell migration. Mol Biol Cell. 2006, 17:239-50.

Perry SV. Vertebrate tropomyosin: distribution, properties and function. J Muscle Res Cell Motil. 2001, 22:5-49.

Peters JM, Harris JR, Finley D. Ubiquitin and the Biology of the Cell. New York Plenum Press. 1998, 472 pages

Petit V, Boyer B, Lentz D, Turner CE, Thiery JP, Valles AM. Phosphorylation of tyrosine residues 31 and 118 on paxillin regulates cell migration through an association with Crk in NBT-II cells. J Cell Biol. 2000, 148:957-69.

Pickart CM. Mechanisms underlying ubiquitination. Annu Rev Biochem. 2001, 70:503-33.

de Paula F, Vainzof M, Passos-Bueno MR, de Cássia M Pavanello R, Matioli SR, V B Anderson L, Nigro V, Zatz M. Clinical variability in calpainopathy: what makes the difference? Eur J Hum Genet. 2002, 10:825-32.

Pineiro-Sanchez ML, Goldstein LA, Howard L, Yeh Y, Tran H, Argraves WS, Chen WT. Identification of the 170-kDa melanoma membrane-bound gelatinase (sepretase) as a serine integral membrane protease. J Biol Chem. 1997, 272:7595-7601.

Pintér M, Friedrich P. The calcium-dependent proteolytic system calpain-calpastatin in Drosophila melanogaster. Biochem J. 1988, 253:467-73.

Polakis P. The oncogenic activation of beta-catenin. Curr Opin Genet Dev. 1999, 9:15-21.

Pollard TD. Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments. J Cell Biol. 1986, 103:2747-54.

Polte TR, Hanks SK. Interaction between focal adhesion kinase and Crk-associated tyrosine kinase substrate p130Cas. Proc Natl Acad Sci USA. 1995, 92:10678-82.

Potter DA, Tirnauer JS, Janssen R, Croall DE, Hughes CN, Fiacco KA, Mier JW, Maki M, Herman IM. Calpain regulates actin remodelling during cell spreading. J Cell Biol. 1998, 141;647-62.

Poupon MF. Biologie des métastases des cancers. Bulletin du cancer. 2006, 93 :165-74.

Prasad N, Topping RS, Decker SJ. Src family tyrosine kinases regulate adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of 50-inositol phosphatase SHIP2 during cell attachment and spreading on collagen I. J Cell Sci. 2002, 115:3807-15.

Puius YA, Mahoney NM, Almo SC. The modular structure of actin-regulatory proteins. Curr Opin Cell Biol. 1998, 10:23-34

Rajalingam K, Rudel T. Ras-Raf signaling needs prohibitin. Cell Cycle. 2005, 4:1503-5.

Rajaram S, Baylink DJ, Mohan S. Insulin-like growth factorbinding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions. Endocr Rev. 1997, 18:801-31.

Rankin S, Rozengurt E. Platelet-derived growth factor modulation of focal adhesion kinase (p125FAK) and paxillin tyrosine phosphorylation in Swiss 3T3 cells. Bell-shaped dose response and cross-talk with bombesin. J Biol Chem. 1994, 269:704-10.

Raynaud P, Jayat-Vignoles C, Laforêt MP, Levéziel H, Amarger V. Four promoters direct expression of the calpastatin gene. Arch Biochem Biophys. 2005, 437:69-77.

Regen CM, Horwitz AF. Dynamics of beta 1 integrin-mediated adhesive contacts in motile fibroblasts. J Cell Biol. 1992, 119:1347-59.

Reichrath J, Welter C, Mitschele T, Classen U, Meineke V, Tilgen W, Seifert M. Different expression patterns of calpain isozymes 1 and 2 (CAPN1 and 2) in squamous cell carcinomas (SCC) and basal cell carcinomas (BCC) of human skin. J Pathol. 2003, 199:509-16.

Rechsteiner M. Natural substrates of the ubiquitin proteolytic pathway. Cell. 1991, 66:615-8.

Ren YX, Finckenstein FG, Abdueva DA, Shahbazian V, Chung B, Weinberg KI, Triche TJ, Shimada H, Anderson MJ. Mouse mesenchymal stem cells expressing PAX-FKHR form alveolar rhabdomyosarcomas by cooperating with secondary mutations. Cancer Res. 2008, 68:6587-97.

Reszka AA, Hayashi Y, Horwitz AF. Identification of amino acid sequences in the integrin beta 1 cytoplasmic domain implicated in cytoskeletal association. J Cell Biol. 1992, 117:1321-30.

Richard I, Broux O, Allamand V, Fougerousse F, Chiannilkulchai N, Bourg N, Brenguier L, Devaud C, Pasturaud P, Roudaut C. Hillaire D, Passos-Bueno MR, Zata M, Tischfield JA; Fardeau M, Jackson CE, Cohen D, Beckmann JS. Mutations in the

proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. Cell. 1995, 81:27-40.

Ridley AJ, Hall A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibres in response to growth factors. Cell. 1992, 70:389-99.

Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR. Cell migration: integrating signals from front to back. Science. 2003, 302:1704-9.

Ridley AJ. Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. Trends Cell Biol. 2006, 16:522-9.

Rios-Doria J, Day KC, Kuefer R, Rashid MG, Chinnaiyan AM, Rubin MA, Day ML. The role of calpain in the proteolytic cleavage of E-cadherin in prostate and mammary epithelial cells. J Biol Chem. 2003, 278:1372-79.

Rivett AJ, Skilton HE, Rowe AJ, Eperon IC, Sweeney ST. Components of the multicatalytic proteinase complex. Biomed Biochim Acta. 1991, 50:447-50.

Rock KL, Goldberg AL. Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. Annu Rev Immunol. 1999, 17:739-79.

Rodriguez Fernandez JL, Geiger B, Salomon D, Ben-Ze'ev A. Overexpression of vinculin suppresses cell motility in BALB/c 3T3 cells. Cell Motil. Cytoskeleton. 1992, 22;127-34.

Rodriguez Fernandez JL, Geiger B, Salomon D, Ben-Ze'ev A. Suppression of vinculin expression by antisense transfection confers changes in cell morphology, motility, and anchorage-dependent growth of 3T3 cells. J Cell Biol. 1993, 122:1285-94.

Rohatgi R, Ma L, Miki H, Lopez M, Kirchhausen T, Takenawa T, Kirschner MW. The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. Cell. 1999, 97:221-31.

Rojiani MV, Finlay BB, Gray V, Dedhar S. In vitro interaction of a polypeptide homologous to human Ro/SS-A antigen (calreticulin) with a highly conserved amino acid sequence in the cytoplasmic domain of integrin alpha subunits. Biochemistry. 1991, 30:9859-66.

Rooprai HK, Vanmeter T, Panou C, Schnüll S, Trillo-Pazos G, Davies D, Pilkington GJ. The role of integrin receptors in aspects of glioma invasion in vitro. Int J Dev Neurosci. 1999, 17:613-23.

Rosenberger G, Gal A, Kutsche K. AlphaPIX associates with calpain 4, the small subunit of calpain, and has a dual role in intégrine-mediated cell spreading. J Biol Chem. 2005, 280:6879-89.

Roskoski R Jr. Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. Biochem Biophys Res Commun. 2004, 324:1155-64.

Rotonda J, Nicholson DW, Fazil KM, Gallant M, Gareau Y, Labelle M, Peterson EP, Rasper DM, Ruel R, Vaillancourt JP, Thornberry NA, Becker JW. The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. Nat Struct Biol. 1996, 3:619-25.

Ruymann FB. Rhabdomyosarcoma in children and adolescents. A review. Hematol Oncol Clin North Am. 1987, 1:621-54.

Ruymann FB, Newton WA Jr, Ragab AH, Donaldson MH, Foulkes M. Bone marrow metastases at diagnosis in children and adolescents with rhabdomyosarcoma. A report from the intergroup rhabdomyosarcoma study. Cancer. 1984 Jan 15;53(2):368-73.

Rykx A, De Kimpe L, Mikhalap S, Vantus T, Seufferlein T, Vandenheede JR, Van Lint J. Protein kinase D: a family affair. FEBS Lett. 2003, 546:81-6

Sáez ME, Grilo A, Morón FJ, Manzano L, Martínez-Larrad MT, González-Pérez A, Serrano-Hernando J, Ruiz A, Ramírez-Lorca R, Serrano-Ríos M. Interaction between Calpain 5, Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and Peroxisome proliferator-activated receptor-delta genes: a polygenic approach to obesity. Cardiovasc Diabetol. 2008, 25:7-23.

Sahai E, Ishizaki T, Narumiya S, Treisman R. Transformation mediated by RhoA requires activity of ROCK kinases. Curr Biol. 1999, 9:136-45.

Sahai E, Marshall CJ. RHO-GTPases and cancer. Nat Rev Cancer. 2002, 2:133-42.

Sahai E, Marshall CJ. Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. Nat Cell Biol. 2003 Aug;5(8):711-9.

Saido TC, Yokota M, Nagao S, Yamaura I, Tani E, Tsuchiya T, Suzuki K, Kawashima S. Spatial resolution of fodrin proteolysis in postischemic brain. J Biol Chem. 1993, 268:25239-43.

Saito K, Elce JS, Hamos JE, Nixon RA. Widespread activation of calcium-activated neutral proteinase (calpain) in the brain in Alzheimer disease: a potential molecular basis for neuronal degeneration. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993, 90: 2628-32.

Sakai K, Akanuma H, Imahori K, Kawashima S. A unique specificity of a calcium activated neutral protease indicated in histone hydrolysis. J Biochem (Tokyo). 1987, 101:911-918.

Salmena L, Hakem R. Caspase-8 deficiency in T cells leads to a lethal lymphoinfiltrative immune disorder. J Exp Med. 2005, 202:727-32.

Samani AA, Yakar S, LeRoith D, Brodt P. The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights. Endocr Rev 2007, 28:20-47.

Samanta K, Kar P, Ghosh B, Chakraborti T, Chakraborti S. Localization of m-calpain and calpastatin and studies of their association in pulmonary smooth muscle endoplasmic reticulum. Biochim Biophys Acta. 2007, 1770:1297-307.

Sander EE, ten Klooster JP, van Delft S, van der Kammen RA, Collard JG. Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. J Cell Biol. 1999, 147:1009-22.

Sanders C, Burtnick LD, Smillie LB. Native chicken gizzard tropomyosin is predominantly a beta gamma-heterodimer. J Biol Chem. 1986, 261:12774-8.

Sasaki T, Kikuchi T, Yumoto N, Yoshimura N, Murachi T. Comparative specificity and kinetic studies on porcine calpain I and calpain II with naturally occurring peptides and synthetic fluorogenic substrates. J Biol Chem. 1984, 259:12489-94.

Sato T, del Carmen Ovejero M, Hou P, Heegaard AM, Kumegawa M, Foged NT, Delaissé JM. Identification of the membrane-type matrix metalloproteinase MT1-MMP in osteoclasts. J Cell Sci. 1997, 110:589-96.

Sato K, Kawashima S. Calpain function in the modulation of signal transduction molecules. Biol Chem. 2001, 382:743-51.

Savagner P, Yamada KM, Thiery JP. The zinc-finger protein slug causes desmosome dissociation, an initial and necessary step for growth factor-induced epithelial-mesenchymal transition. J Cell Biol. 1997, 137:1403-19.

Sawai H, Okada Y, Funahashi H, Matsuo Y, Takahashi H, Takeyama H, Manabe T. Activation of focal adhesion kinase enhances the adhesion and invasion of pancreatic

cancer cells via extracellular signal-regulated kinase-1/2 signaling pathway activation. Mol Cancer. 2005, 4:37.

Schád E, Farcas A, Jékely G, Tompa P, Friedrich P. A novel human small subunit of calpains. Biochem J. 2002, 362:383-8.

Schaffert CS, Sorrell MF, Tuma DJ. Expression and cytoskeletal association of integrin subunits is selectively increased in rat perivenous hepatocytes after chronic ethanol administration. Alcohol Clin Exp Res. 2001, 25:1749-57.

Schaller MD, Hildebrand JD, Shannon JD, Fox JW, Vines RR, Parsons JT. Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. Mol Cell Biol. 1994, 14:1680-8.

Schaller MD, Otey CA, Hildebrand JD, Parsons JT. Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking beta integrin cytoplasmic domains. J Cell Biol. 1995, 130:1181-7.

Schenk S, Hintermann E, Bilban M, Koshikawa N, Hojilla C, Khokha, R , Quaranta V. Binding to EGF receptor of a laminin-5 EGFlike fragment liberated during MMP-dependent mammary gland involution. J Cell Biol. 2003, 161:197-209.

Schirenbeck, A. Arasada R, Bretschneider T, Stradal TE, Schleicher M, Faix J. The bundling activity of vasodilator-stimulated phosphoprotein is required for filopodium formation. Proc Natl Acad Sci USA. 2006, 103:7694-9.

Schlaepfer DD, Mitra SK, Ilic D. Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase. Biochim Biophys Acta. 2004, 1692:77-102.

Schlaepfer DD, Hanks SK, Hunter T, van der Geer P. Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. Nature. 1994, 372:786-91.

Schleicher M, Shepherd BR, Suarez Y, Fernandez-Hernando C, Yu J, Pan Y, Acevedo LM, Shadel GS, Sessa WC. Prohibitin-1 maintains the angiogenic capacity of endothelial cells by regulating mitochondrial function and senescence. J Cell Biol. 2008, 180:101-12.

Schoenwaelder SM, Burridge K. Evidence for a calpeptin-sensitive protein-tyrosine phosphatase upstream of the small GTPase Rho. A novel role for the calpain inhibitor calpeptin in the inhibition of protein-tyrosine phosphatases. J Biol Chem. 1999, 274:14359-67.

Schwartz MA, Schaller MD, Ginsberg MH. Integrins: emerging paradigms of signal transduction. Annu Rev Cell Dev Biol. 1995, 11:549-99.

Scrable HJ, Witte DP, Lampkin BC, Cavenee WK. Chromosomal localization of the human rhabdomyosarcoma locus by mitotic recombination mapping. Nature. 1987, 329:645-7.

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

Seale P, Sabourin LA, Girgis-Gabardo A, Mansouri A, Gruss P, Rudnicki MA. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. Cell. 2000, 102:777-86.

Seglen PO, Solheim AE, Grinde B, Gordon PB, Schwarze PE, Gjessing R, Poli A. Amino acid control of protein synthesis and degradation in isolated rat hepatocytes. Ann N Y Acad Sci. 1980, 349:1-17.

Sejersen T, Lendahl U. Transient expression of the intermediate filament nestin during skeletal muscle development. J Cell Sci. 1993, 106:1291-300.

Senft J, Helfer B, Frisch SM. Caspase-8 interacts with the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase to regulate cell adhesion and motility. Cancer Res. 2007, 67:11505-9.

Siddiqui AA, Zhou Y, Podesta RB, Karcz SR, Tognon CE, Strejan GH, Dekaban GA, Clarke MW. Characterization of Ca(2+)-dependent neutral protease (calpain) from human blood flukes, Schistosoma mansoni. Biochim Biophys Acta. 1993, 1181:37-44.

Shapiro DN, Sublett JE, Li B, Downing JR, Naeve CW. Fusion of PAX3 to a member of the forkhead family of transcription factors in human alveolar rhabdomyosarcoma. Cancer Res. 1993, 53:5108-12.

Sharma CP, Ezzell RM, Arnaout MA. Direct interaction of filamin (ABP-280) with the beta 2-integrin subunit CD18. J Immunol. 1995, 154:3461-70

Sharma M, Henderson BR. IQ-domain GTPase-activating protein 1 regulates beta-catenin at membrane ruffles and its role in macropinocytosis of N-cadherin and adenomatous polyposis coli. J Biol Chem. 2007, 282:8545-56.

Shcherbina A, Bretscher A, Kenney DM, Remold-O'Donnell E. Moesin, the major ERM protein of lymphocytes and platelets, differs from ezrin in its insensitivity to calpain. FEBS Lett. 1999, 443:31-6.

Sheetz MP, Felsenfeld D, Galbraith CG, Choquet D. Cell migration as a five-step cycle. Biochem Soc Symp. 1999, 65:233-43.

Shibata K, Kikkawa F, Nawa A, Thant AA, Naruse K, Mizutani S, Hamaguchi M. Both focal adhesion kinase and c-Ras are required for the enhanced matrix metalloproteinase 9 secretion by fibronectin in ovarian cancer cells. Cancer Res. 1998, 58:900-3.

Shintani Y, Fukumoto Y, Chaika N, Svoboda R, Wheelock MJ, Johnson KR. Collagen I-mediated up-regulation of N-cadherin requires cooperative signals from integrins and discoidin domain receptor 1. J Cell Biol. 2008, 180:1277-89.

Shiraha H, Glading A, Chou J, Jia Z, Wells A. Activation of m-calpain (calpain II) by epidermal growth factor is limited by protein kinase A phosphorylation of m-calpain. Mol Cell Biol. 2002, 22:2716-27.

Simcha I, Geiger B, Yehuda-Levenberg S, Salomon D, Ben-Ze'ev A. Suppression of tumorigenicity by plakoglobin: an augmenting effect of N-cadherin. J Cell Biol. 1996, 133:199-209.

Slater O, Shipley J. Clinical relevance of molecular genetics to paediatric sarcomas. J Clin Pathol. 2007, 60:1187-94.

Small JV, Isneberg G, Celis JE. Polarity of actin at the leading edge of cultured cells. Nature. 1978, 272:638–39

Small JV. Organization of actin in the leading edge of cultured cells: influence of osmium tetroxide and dehydration on the ultrastructure of actin meshworks. J Cell Biol. 1981, 91:695–705

Sokol SB, Kuwabara PE. Proteolysis in Caenorhabditis elegans sex determination: cleavage of TRA-2A by TRA-3. Genes Dev. 2000, 14:901-6.

Solowska J, Guan JL, Marcantonio EE, Trevithick JE, Buck CA, Hynes RO. Expression of normal and mutant avian intégrine subunits in rodent cells. J Cell Biol. 1989, 109:853-61.

Song J, Worth NF, Rolfe BE, Campbell GR, Campbell JH. Heterogeneous distribution of isoactins in cultured vascular smooth muscle cells does not reflect segregation of contractile and cytoskeletal domains. J Histochem Cytochem. 2000, 48:1441-52.

Sorensen PH, Lynch JC, Qualman SJ, Tirabosco R, Lim JF, Maurer HM, Bridge JA, Crist WM, Triche TJ, Barr FG. PAX3-FKHR and PAX7-FKHR gene fusions are prognostic indicators in alveolar rhabdomyosarcoma: a report from the children's oncology group. J Clin Oncol. 2002, 20:2672-9

Sorimachi H, Imajoh-Ohmi S, Emori Y, Kawasaki H, Ohno S, Minami Y, Suzuki K. Molecular cloning of a novel mammalian calcium-dependent protease distinct from both m- and mu-types. Specific expression of the mRNA in skeletal muscle. J Biol Chem. 1989, 264:20106-11.

Sorimachi H, Toyama-Sorimachi N, Saido TC, Kawasaki H, Sugita H, Miyasaka M, Arahata K, Ishiura S, Suzuki K. Muscle-specific calpain, p94, is degraded by autolysis immediately after translation, resulting in disappearance from muscle. J Biol Chem. 1993a, 268:10593-605.

Sorimachi H, Ishiura S, Suzuki K. A novel tissue-specific calpain species expressed predominantly in the stomach comprises two alternative splicing products with and without Ca(2+)-binding domain. J Biol Chem. 1993b, 268:19476-82.

Sorimachi H, Kinbara K, Kimura S, Takahashi M, Ishiura S, Sasagawa N, Sorimachi N, Shimada H, Tagawa K, Maruyama K, Suzuki K. Muscle-specific calpain, p94, responsible for limb girdle muscular dystrophy type 2A, associates with connectin through IS2, a p94-specific sequence. J Biol Chem. 1995, 270:31158-62.

Sorimachi H, Ishiura S, Suzuki K. Structure and physiological function of calpains. Biochem J. 1997, 328:721-32.

Sorimachi H, Suzuki K. The structure of calpain. J Biochem. 2001, 129:653-64.

Spadoni C, Farkas A, Sinka R, Tompa P, Friedrich P. Molecular cloning and RNA expression of a novel Drosophila calpain, Calpain C. Biochem Biophys Res Commun. 2003, 303:343-9

Spencer MJ, Guyon JR, Sorimachi H, Potts A, Richard I, Herasse M, Chamberlain J, Dalkilic I, Kunkel LM, Beckmann JS. Stable expression of calpain 3 from a muscle transgene in vivo: immature muscle in transgenic mice suggests a role for calpain 3 in muscle maturation. Proc Natl Acad Sci. 2002, 99(13):8874-9.

Squier MK, Sehnert AJ, Sellins HS, Malkinson AM, Takano E, Cohen JJ. Calpain and calpastatin regulate neutrophil apoptosis. J Cell Physiol. 1999, 178:311-19.

Sreenan SK, Zhou YP, Otani K, Hansen PA, Currie KP Pan CY, Lee JP, Ostrega DM, Pugh W, Horikawa Y, Cox NJ, Hanis CL, Burant CF, Fox AP, Bell GI, Polonsky KS. Calpains play a role in insulin secretion and action. Diabetes. 2001, 50:2013-20.

Steff AM, Carillo S, Pariat M, Piechaczyk M. Decreased susceptibility to calpains of v-FosFBR but not of v-FosFBJ or v-JunASV17 retroviral proteins compared with their cellular counterparts. Biochem J. 1997, 323:685-92.

Steffensen B, Xu X, Martin PA, Zardeneta G. Human fibronectin and MMP-2 collagen binding domains compete for collagen binding sites and modify cellular activation of MMP-2. Matrix Biol. 2002, 21:399-414.

Stennicke HR, Salvesen GS. Caspases – controlling intracellular signals by protease zymogen activation. Biochim. Biophys Acta. 2000, 1477:299-306.

Stieglitz B, Bee C, Schwarz D, Yildiz O, Moshnikova A, Khokhlatchev A, Herrmann C. Novel type of Ras effector interaction established between tumour suppressor NORE1A and Ras switch II. EMBO J. 2008, 27:1995-2005.

Stossel TP, Condeelis J, Cooley L, Hartwig JH, Noegel A, Schleicher M, Shapiro SS. Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. Nat Rev Mol Cell Biol. 2001, 2:138-45.

Stuart A, Radhakrishnan J. Rhabdomyosarcoma. Indian J Pediatr. 2004, 71:331-7.

Stupack DG, Teitz T, Potter MD, Mikolon D, Houghton PJ, Kidd VJ, Lahti JM, Cheresh DA. Potentiation of neuroblastoma metastasis by loss of caspase-8. Nature. 2006, 439:95-9.

Suetsugu S, Miki H, Yamaguchi H, Obinata T, Takenawa T. Enhancement of branching efficiency by the actin filament-binding activity of N-WASP/WAVE2. J Cell Sci. 2001, 114:4533-42.

Suwa H, Ohshio G, Imamura T, Watanabe G, Arii S, Imamura M, Narumiya S, Hiai H, Fukumoto M. Overexpression of the rhoC gene correlates with progression of ductal adenocarcinoma of the pancreas. Br J Cancer. 1998, 77:147-52.

Suzuki K. Nomenclature of calcium dependante proteinase Biomed Biochim Acta. 1991, 50:483-4.

Suzuki K, Sorimachi H, Yoshizawa T, Kinbara K, Ishiura S. Calpain: novel family members, activation, and physiologic function. Biol Chem Hoppe Seyler. 1995, 376:523-9.

Suzuki K, Sorimachi H. A novel aspect of calpain activation. FEBS Lett. 1998, 433:1-4.

Svitkina TM, Bulanova EA, Chaga OY, Vignjevic DM, Kojima S, Vasiliev JM, Borisy GG. Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. J Cell Biol. 2003, 160:409-21.

Taipale J, Keski-Oja J. Growth factors in the extracellularmatrix. FASEB J. 1997, 11:51-9.

Takano J, Kawamura T, Murase M, Hitomi K, Maki M. Structure of mouse calpastatin isoforms: implications of species-common and species-specific alternative splicing. Biochem Biophys Res Commun. 1999, 260:339-45.

Tamura M, Gu J, Matsumoto K, Aota S, Parsons R, Yamada KM. Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumour suppressor PTEN. Science. 1998, 280:1614-17.

Tamura M, Gu J, Danen EH, Takino T, Miyamoto S, Yamada KM. PTEN interactions with focal adhesion kinase and suppression of the extracellular matrix-dependent phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway. J Biol Chem. 1999, 274:20693-703.

Tang Y, Liu X, Zoltoski RK, Novak LA, Herrera RA, Richard I, Kuszak JR, Kumar NM. Age-related cataracts in alpha3Cx46-knockout mice are dependent on a calpain 3 isoform. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2007, 48:2685-94.

Tapia-Páez I, Tammimies K, Massinen S, Roy AL, Kere J. The complex of TFII-I, PARP1, and SFPQ proteins regulates the DYX1C1 gene implicated in neuronal migration and dyslexia. FASEB J. 2008, 22:3001-9.

Taylor RG, Geesink GH, Thompson VF, Koohmaraie M, Goll DE. Is Z-disk degradation responsible for postmortem tenderization? J Anim Sci. 1995, 73:1351-67.

Temm-Grove CJ, Wert D, Thompson VF, Allen RE, Goll DE. Microinjection of calpastatin inhibits fusion in myoblasts. Exp Cell Res. 1999, 247:293-303.

Theopold U, Pintér M, Daffre S, Tryselius Y, Friedrich P, Nässel DR, Hultmark D. CalpA, a Drosophila calpain homolog specifically expressed in a small set of nerve, midgut, and blood cells. Mol Cell Biol. 1995, 15:824-34.

Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. Nat Rev Mol Cell Biol. 2006, 7:131-42.

Tiffin N, Williams RD, Shipley J, Pritchard-Jones K. PAX7 expression in embryonal rhabdomyosarcoma suggests an origin in muscle satellite cells. Br J Cancer. 2003, 89:327-32.

Tilghman RW, Parsons JT. Focal adhesion kinase as a regulator of cell tension in the progression of cancer. Semin Cancer Biol. 2008, 18:45-52.

Tommasi S, Dammann R, Jin SG, Zhang XF, Avruch J, Pfeifer GP. RASSF3 and NORE1: identification and cloning of two human homologues of the putative tumor suppressor gene RASSF1. Oncogene. 2002, 21:2713-20.

Tompa P, Emori Y, Sorimachi H, Suzuki K, Friedrich P. Domain III of calpain is a ca2+-regulated phospholipid-binding domain.Biochem Biophys Res Commun. 2001, 280:1333-9.

Tonami K, Kurihara Y, Aburatani H, Uchijima Y, Asano T, Kurihara H. Calpain 6 is involved in microtubule stabilization and cytoskeletal organization. Mol Cell Biol. 2007, 27:2548-61.

Tonin PN, Scrable H, Shimada H, Cavenee WK. Muscle-specific gene expression in rhabdomyosarcomas and stages of human fetal skeletal muscle development. Cancer Res. 1991, 51:5100-6.

Turley EA, Noble PW, Bourguignon LY. Signaling properties of hyaluronan receptors. J Biol Chem. 2002, 277:4589-92.

Turner CE, Glenney JR Jr, Burridge K. Paxillin: a new vinculin-binding protein present in focal adhesions. J Cell Biol. 1999a, 111:1059-68.

Turner CE, Brown MC, Perrotta JA, Riedy MC, Nikolopoulos SN, McDonald AR, Bagrodia S, Thomas S, Leventhal PS. Paxillin LD4 motif binds PAK and PIX through a novel 95-kD ankyrin repeat, ARF-GAP protein: a role in cytoskeletal remodelling. J Cell Biol. 1999b, 145 :851-63.

Ursitti JA, Fowler VM. Immunolocalization of tropomodulin, tropomyosine and actin in spread human erythrocyte skeletons. J Cell Sci. 1994, 107:1633-9.

Valentinis B, Baserga R. IGF-I receptor signalling in transformation and differentiation. Mol Pathol. 2001, 54:133-37.

Vandekerckhove J, Bauw G, Vancompernolle K, Honore B, Celis J. Comparative two-dimensional gel analysis and microsequencing identifies gelsolin as one of the most prominent downregulated markers of transformed human fibroblast and epithelial cells. J Cell Biol. 1990, 111: 95-102.

Van der Weyden L, Adams DJ. The Ras-association domaine family (RASSF) members and their role in human tumorogenesis. Biochim Biophys Acta. 2007, 1776:58-85.

Van Wart HE, Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990, 87:5578-82.

Vera C, Sood A, Gao KM, Yee LJ, Lin JJ, Sung LA. Tropomodulin-binding site mapped to residues 7–14 at the N-terminal heptad repeats of tropomyosin isoform 5. Arch Biochem Biophys. 2000, 378:16-24.

Vinson VK, De La Cruz EM, Higgs HN, Pollard TD. Interactions of Acanthamoeba profilin with actin and nucleotides bound to actin. Biochemistry. 1998, 37:10871-80.

Voges D, Zwickl P, Baumeister W. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. Annu Rev Biochem. 1999, 68:1015-68.

Waghray A, Wang DS, McKinsey D, Hayes RL, Wang KK. Molecular cloning and characterization of rat and human calpain-5. Biochem Biophys Res Commun. 2004, 324:46-51.

Wang QJ. PKD at the crossroads of DAG and PKC signaling. Trends Pharmacol Sci. 2006, 27:317-23.

Walker NP, Talanian RV, Brady KD, Dang LC, Bump NJ, Ferenz CR, Franklin S, Ghayur T, Hackett MC, Hammill LD, Herzog L, Hugunin M, Houy W, Mankovich JA, McGuiness L, Orlewicz E, Paskind M, Pratt CA, Reis P, Summani A, Terranova M, Welch JP,Xiong L, Moller A, Tracey DE, Kamen R, Wong WW. Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)2 homodimer. Cell. 1994, 78:343-52.

Wary KK, Mainiero F, Isakoff SJ, Marcantonio EE Giancotti FG. The adaptor protein Shc couples a class of integrins to the control of cell cycle progression. Cell. 1996, 87;733-43.

Wary KK, Mariotti A, Zurzolo C, Giancotti FG. A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signalling and anchorage dependent cell growth. Cell 1998, 94:625-34.

Wayner EA, Orlando RA, Cheresh DA. Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 contribute to cell attachment to vitronectin but differentially distribute on the cell surface. J Cell Biol. 1991, 113:919-29.

Weaver AM, Karginov AV, Kinley AW, Weed SA, Li Y, Parsons JT, Cooper JA. Cortactin promotes and stabilizes Arp2/3-induced actin filament network formation. Curr Biol. 2001, 11:370-4.

Weeds A, Maciver S. F-actin capping proteins. Curr Opin Cell Biol. 1993 5:63-9.

Wells A, Huttenlocher A, Lauffenburger DA. Calpain proteases in cell adhesion and motility. Int Rev Cytol. 2005;245:1-16

Weng Z, Taylor JA, Turner CE, Brugge JS, Seidel-Dugan C. Detection of Src homology 3-binding proteins, including paxillin, in normal and v-Src-transformed Balb/c 3T3 cells. J Biol Chem. 1993, 268:14956-63.

Weijer CJ. Collective cell migration in development. J Cell Sci. 2009, 122:3215-23.

Weiss R, Dziura J, Burgert TS, Tamborlane WV, Taksali SE, Yeckel CW, Allen K, Lopes M, Savoye M, Morrison J, Sherwin RS, Caprio S. Obesity and the metabolic syndrome in children and adolescents. N Engl J Med. 2004, 350:2362-74.

Welch MD, Mullins RD. Cellular control of actin nucleation. Annu Rev Cell Dev Biol. 2002, 18:247-88.

Wendt A, Thompson VF, Goll DE. Interaction of calpastatin with calpain: a review. Biol Chem. 2004, 385:465-72.

Werner H, Roberts CT. The IGFI receptor gene: a molecular target for disrupted transcription factors. Genes Chromosomes Cancer. 2003, 36:113-20.

Wildenberg GA, Dohn MR, Carnahan RH, Davis MA, Lobdell NA, Settleman J, Reynolds AB. p120-catenin and p190RhoGAP regulate cell-cell adhesion by coordinating antagonism between Rac and Rho. Cell. 2006, 127:1027-39.

Wilkinson S, Paterson HF, Marshall CJ. Cdc42-MRCK and Rho-ROCK signalling cooperate in myosin phosphorylation and cell invasion. Nat Cell Biol. 2005, 7:255-61.

Wilson KP, Black JA, Thomson JA, Kim EE, Griffith JP, Navia MA, Murcko MA, Chambers SP, Aldape RA, Raybuck SA, Livingston DJ. Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. Nature. 1994, 370:270-5

Witkowski JM, Zmuda-Trzebiatowska E, Swiercz JM, Cichorek M, Ciepluch H, Lewandowski K, Bryl E, Hellmann A. Modulation of the activity of calcium-activated neutral proteases (calpains) in chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) cells. Blood. 2002, 100:1802-9.

Wolf K, Mazo I, Leung H, Engelke K, von Andrian UH, Deryugina EI, Strongin AY, Bröcker EB, Friedl P. Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. J Cell Biol. 2003, 160:267-77.

Wolf K, Wu YI, Liu Y, Geiger J, Tam E, Overall C, Stack MS, Friedl P. Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion. Nature Cell Biology. 2007, 9:893-904.

Wong NA, Pignatelli M. Beta-catenin--a linchpin in colorectal carcinogenesis? Am J Pathol. 2002, 160:389-401.

Woo MK, Fowler VM. Identification and characterization of tropomodulin and tropomyosin in the adult rat lens. J Cell Sci. 194, 107:1359-67.

Wood CK, Turner CE, Jackson P, Critchley DR. Characterisation of the paxillin-binding site and the C-terminal focal adhesion targeting sequence in vinculin. J Cell Sci. 1994, 107 :709-17.

Woodcock SA, Rooney C, Liontos M, Connolly Y, Zoumpourlis V, Whetton AD, Gorgoulis VG, Malliri A. SRC-induced disassembly of adherens junctions requires localized phosphorylation and degradation of the rac activator tiam1. Mol Cell. 2009, 33:639-53.

Wu KJ, Zeng J, Zhu GD, Zhang LL, Zhang D, Li L, Fan JH, Wang XY, He DL. Silibinin inhibits prostate cancer invasion, motility and migration by suppressing vimentin and MMP-2 expression. Acta Pharmacol Sin. 2009, 30:1162-8.

Wyckoff JB, Pinner SE, Gschmeissner S, Condeelis JS, Sahai E. ROCK- and myosin-dependent matrix deformation enables protease-independent tumor-cell invasion in vivo. Curr Biol. 2006, 16:1515-23.

Xie H, Pallero MA, Gupta K, Chang P, Ware MF, Witke W, Kwiatkowski DJ, Lauffenburger DA, Murphy-Ullrich JE, Wells A. EGF receptor regulation of cell motility: EGF induces disassembly of focal adhesions independently of the motility associated PLCgamma signalling pathway. J Cell Sci. 1998, 111:615-24.

Xu W, Harrison SC, Eck MJ. Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. Nature. 1997, 385:595-602.

Xu W, Baribault H, Adamson ED. Vinculin knockout results in heart and brain defects during embryonic development. Development 1998, 125:327-37.

Xu Y, Mellgren RL. Calpain inhibition decreases the growth rate of mammalian cell colonies. J Biol Chem. 2002, 277:21474-9.

Xu L, Deng X. Tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone induces phosphorylation of mu- and m-calpain in association with increased secretion, cell migration, and invasion. J Biol Chem. 2004, 279:53683-90.

Xu L, Deng X. Suppression of cancer cell migration and invasion by protein phosphatase 2A through dephosphorylation of mu- and m-calpains. J Biol Chem. 2006a, 281:35567-75.

Xu L, Deng X. Protein kinase Ciota promotes nicotine-induced migration and invasion of cancer cells via phosphorylation of micro- and m-calpains. J Biol Chem. 2006b, 281:4457-66.

Yamada KM, Geiger B. Molecular interactions in cell adhesion complexes. Curr Opin Cell Biol. 2000, 9:76-8.

Yamana N, Arakawa Y, Nishino T, Kurokawa K, Tanji M, Itoh RE, Monypenny J, Ishizaki T, Bito H, Nozaki K, Hashimoto N, Matsuda M, Narumiya S. The Rho-mDia1 pathway regulates cell polarity and focal adhesion turnover in migrating cells through mobilizing Apc and c-Src. Mol Cell Biol. 2006, 26:6844-58.

Yamaguchi H, Lorenz M, Kempiak S, Sarmiento C, Coniglio S, Symons M, Segall J, Eddy R, Miki H, Takenawa T, Condeelis J. Molecular mechanisms of invadopodium formation: the role of the N-WASP-Arp2/3 complex pathway and cofilin. J Cell Biol. 2005,168:441-52.

Yan B, Calderwood DA, Yaspan B, Ginsberg MH. Calpain cleavage promotes talin binding to the beta 3 integrin cytoplasmic domain. J Biol Chem 2001, 276:28164-70.

Yang HQ, Ma H, Takano E, Hatanaka M, Maki M. Analysis of calcium-dependent interaction between amino-terminal conserved region of calpastatin functional domain and calmodulin-like domain of mu-calpain large subunit. J Biol Chem. 1994, 269:18977-84.

Yilmaz M, Christofori G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. Cancer Metastasis Rev. 2009, 28:15-33.

Yin HL. Gelsolin: Calcium- and phosphoinositide-regulated actin modulatins protein. Bioessays. 1998, 7:176-9.

Yonezawa N, Nishida E, Iida K, Yahara I, Sakai H. Inhibition of the interactions of cofilin, destrin, and deoxyribonuclease I with actin by phosphoinositides. J Biol Chem. 1990, 265:8382-6.

Yorikawa C, Takaya E, Osako Y, Tanaka R, Terasawa Y, Hamakubo T, Mochizuki Y, Iwanari H, Kodama T, Maeda T, Hitomi K, Shibata H, Maki M. Human calpain 7/PalBH associates with a subset of ESCRT-III-related proteins in its N-terminal region and partly localizes to endocytic membrane compartments. J Biochem. 2008, 143:731-45.

Yu DH, Qu CK, Henegariu O, Lu X, Feng GS. . Proteintyrosine phosphatase Shp-2 regulates cell spreading, migration, and focal adhesion. J Biol Chem. 1998, 273:21125-31.

Yurchenco PD, Schittny JC. Molecular architecture of basement membranes. FASEB J. 1990, 4:1577-90.

Zambonin-Zallone A, Teti A, Grano M, Rubinacci A, Abbadini M, Gaboli M, Marchisio PC. Immunocytochemical distribution of extracellular matrix receptors in human osteoclasts: A b3 integrin is colocalized with vinculin and talin in the podosomes of osteoclastoma giant cells. Exp Cell Res. 1989, 182:645-52.

Zamir E, Geiger B. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. J Cell Sci. 2001, 114:3583-90.

Zavadil J, Bottinger EP. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transition. Oncogene. 2005, 24:5764-74.

Zebda N, Bernard O, Bailly M, Welti S, Lawrence SD, Condeelis JS. Phosphorylation of ADF/cofilin abolishes EGF-induced actin nucleation at the leading edge and subsequence lamellipod extension. J Cell Biol. 2000, 151:1119-27.

Zhang H, Marshall KW, Tang H, Hwang DM, Lee M, Liew CC. Profiling genes expressed in human fetal cartilage using 13,155 expressed sequence tags. Osteoarthritis Cartilage. 2003, 11:309-19.

Zheng X, Diraviyam K, Sept D. Nucleotide effects on the structure and dynamics of actin. Biophys J. 2007, 93:1277-83.

Zhu X, Assoian RK. Integrin-dependent activation of MAP kinase: a link to shape-dependent cell proliferation. Mol Biol Cell. 1995, 6:273-82.

Zhu CH, Mouly V, Cooper RN, Mamchaoui K, Bigot A, Shay JW, Di Santo JP, Butler-Browne GS, Wright WE. Cellular senescence in human myoblasts is overcome by human telomerase reverse transcriptase and cyclin-dependent kinase 4: consequences in aging muscle and therapeutic strategies for muscular dystrophies. Aging Cell. 2007, 6:515-23.

Tableau 6 : Activité calpaïne globale dans les différentes lignées cellulaires.

	Moyenne activité[1] (%)±e.s.m	**t-test[2]**
C2C12	112±6 (n=3)	**p<0,0001**
ARMS	265±6 (n=3)	**p<0,0001**
ERMS	210±12 (n=3)	**p<0,0001**

[1]Les moyennes sont exprimées en pourcentage d'activité par rapport aux cellules témoins LHCN-M2 (100% ; n=3).
[2]Valeurs du t-test entre les cellules témoins LHCN-M2 et la lignée concernée. Significativité : p<0,05.

Tableau 7 : Activité µ-calpaïne dans les différentes lignées cellulaires.

	Moyenne activité[1] (%)±e.s.m	**t-test[2]**
ARMS	225±4 (n=3)	**p<0,0001**
ERMS	265±4 (n=3)	**p<0,0001**

[1]Les moyennes sont exprimées en pourcentage d'activité par rapport aux cellules témoins LHCN-M2 (100% ; n=3).
[2]Valeurs du t-test entre les cellules témoins LHCN-M2 et la lignée concernée. Significativité : p<0,05.

Tableau 8 : Expression de la µ-calpaïne, de la m-calpaïne et de la calpastatine dans les ARMS et les ERMS en migration.

	ARMS[1] (%)±e.s.m.	**ERMS[1] (%)±e.s.m.**
µ-calpaïne	29,73+2,03 (n=3)	39,53+3,32 (n=3)
m-calpaïne	58,43+2,90 (n=3)	52,80+2,69 (n=3)
calpastatine	14,60+0,92 (n=3)	26,19+2,84 (n=3)
t-test[2] **µ-calpaïne** **m-calpaïne** **calpastatine**	 **p<0,0001** **p<0,001** **p<0,0001**	 **p<0,0001** **p<0,0001** **p<0,0001**

[1]Les expressions sont exprimées en pourcentage d'expression par rapport aux cellules témoins LHCN-M2 (100% ; n=4).
[2]Valeurs du t-test entre les cellules témoins LHCN-M2 et la lignée concernée. Significativité : p<0,05.

Tableau 9 : Niveau d'expression des ARNm de la µ-calpaïne et de la m-calpaïne dans les ARMS et les ERMS en migration.

	ARMS[1] (%)±e.s.m.	**ERMS[1] (%)±e.s.m.**
µ-calpaïne	72,24±12,14 (n=4)	72,83±18,49 (n=4)
m-calpaïne	58,68±3,71 (n=3)	46,32±4,27 (n=4)
t-test[2]		
µ-calpaïne	p=0,06 (NS)	p=0,19 (NS)
m-calpaïne	**p<0,0001**	**p<0,0001**

[1]Les expressions sont exprimées en pourcentage d'expression par rapport aux cellules témoins LHCN-M2 (100% ; n=4).
[2]Valeurs du t-test entre les cellules témoins LHCN-M2 et la lignée concernée. Significativité : p<0,05.
(NS) : non significatif.

Tableau 10 : Taux d'adhésion des différents types cellulaires, 0, 1, 2, 4, 6 et 8 heures après ensemencement.

	Taux d'adhésion : rapport entre le nombre de cellules ayant adhérées et le nombre de cellules ensemmencées			
	LHCN-M2 (%)±e.s.m.	**C2C12 (%)±e.s.m.**	**ARMS (%)±e.s.m.**	**ERMS (%)±e.s.m.**
0 heure	0,44±0,22	0,60±0,75	0,53±0,29	0,15±0,15
1 heure	32±0,54	45,91±7,96	20,70±1,84	16,67±5,07
2 heures	57,77±4,08	49,90±6,37	27,37±1,84	23,53±1,68
4 heures	64,67±5,95	62,40±5,13	31,25±1,68	28,77±3,36
6 heures	77,87±3,08	76,52±5,31	33,60±1,77	28,67±1,79
8 heures	100	100	36,90±3,03	34,57±3,81
t-test[1]				
0 heure		p=0,06 (NS)	p=0,08 (NS)	p=0,32 (NS)
1 heure		p=0,59 (NS)	**p<0,01**	**p<0,05**
2 heures		p=0,55 (NS)	**p<0,01**	**p<0,001**
4 heures		p=0,40 (NS)	**p<0,01**	**p<0,01**
6 heures		p=0,48 (NS)	**p<0,01**	**p<0,001**
8 heures		**---**	**p<0,0001**	**p<0,0001**

[1]Valeurs du t-test entre les cellules témoins LHCN-M2 et la lignée concernée. Significativité : p<0,05. n=3.
(NS) : non significatif.

Tableau 11 : Taux d'adhésion des différents types cellulaires, 0, 1, 2, 4, 6 et 8 heures après ensemencement, en présence de 40 µM de calpeptine.

40 µM calpeptine	Taux d'adhésion : rapport entre le nombre de cellules ayant adhérées et le nombre de cellules ensemencées (%)±e.s.m.			
	LHCN-M2	**C2C12**	**ARMS**	**ERMS**
0 heure	0,22±0,12	0,40±0,15	0,15±0,07	0,54±0,05
1 heure	12,93± 3,62	27,70±1,95	14,68±2,21	19,33±3,18
2 heures	21,40±2,67	32,61±2,32	22,22±0,51	24,57±2,72
4 heures	26,60±2,95	32,12±1,09	24,34±0,59	26,27±6,04
6 heures	29,47±2,77	36,60±1,45	29,70±0,49	27,20±2,81
8 heures	60,07±2,77	54,2±5,35	31,78±3,03	35,57±3,09
t-test[1]				
0 heure	p=0,22 (NS)	p=0,15 (NS)	p=0,14 (NS)	p=0,06 (NS)
1 heure	**p<0 ,01**	**p<0,05**	**p<0,05**	p=0,33 (NS)
2 heures	**p<0,001**	**p<0,05**	**p<0,05**	p=0,38 (NS)
4 heures	**p<0,01**	**p<0,01**	**p<0,01**	p=0,36 (NS)
6 heures	**p<0,0001**	**p<0,05**	p=0,13 (NS)	p=0,34 (NS)
8 heures	**p<0,0001**	**p<0,001**	**p<0,05**	p=0,42 (NS)

[1]Valeurs du t-test entre les entre les cellules non-traitées et les cellules traitées avec 60 µM de calpeptine. Significativité : p<0,05. n=3.
(NS) : non significatif.

Tableau 12 : Taux d'adhésion des différents types cellulaires, 0, 1, 2, 4, 6 et 8 heures après ensemencement, en présence de 60 µM de calpeptine.

60 µM calpeptine	Taux d'adhésion : rapport entre le nombre de cellules ayant adhérées et le nombre de cellules ensemencées (%)±e.s.m.			
	LHCN-M2	**C2C12**	**ARMS**	**ERMS**
0 heure	0,58±0,07	0,21±0,26	0,14±0,14	0,18±0,18
1 heure	10,53± 0,74	20,82±2,24	14,97±1,47	20,80±4,60
2 heures	17,30±0,41	25,31±1,74	18,07±1,45	21,48±1,91
4 heures	23,47±0,94	30,01±1,92	19,63±0,66	23,48±3,17
6 heures	24,41±0,88	34,74±2,66	24,47±1,04	27,43±4,64
8 heures	45,32±4,06	45,18±4,70	30,43±0,49	34,83±2,58
t-test[1]				
0 heure	p=0,29 (NS)	p=0,27 (NS)	p=0,15 (NS)	p=0,44 (NS)
1 heure	**p<0,0001**	**p<0,05**	**p<0,05**	p=0,29 (NS)
2 heures	**p<0,001**	**4.10^{-3}**	**p<0,01**	p=0,23 (NS)
4 heures	**p<0,001**	**1.10^{-3}**	**p<0,001**	p=0,15 (NS)
6 heures	**p<0,0001**	**0,03**	**p<0,05**	p=0,40 (NS)
8 heures	**p>0,0001**	**2.10^{-4}**	**p<0,01**	p=0,47 (NS)

[1]Valeurs du t-test entre les entre les cellules non-traitées et les cellules traitées avec 60 µM de calpeptine. Significativité : p<0,05. n=3.
(NS) : non significatif.

Tableau 13 : Expression de la vinculine dans les LHCN-M2 et les ARMS, en présence ou non de calpeptine.

Calpeptine	Expression de la vinculine[1] (%)±e.s.m.	
	LHCN-M2	**ARMS**
0 µM	100 (n=3)	100 (n=4)
50 µM	207,02±14,57 (n=3)	86,12±3,15 (n=4)
t-test[2]	**p<0,0001**	**p<0,01**

[1]Les résultats sont exprimés en pourcentage d'expression par rapport au niveau d'expression dans les cellules non-traitées.
[2]Valeurs du t-test entre les entre les cellules non-traitées et les cellules traitées avec 50 µM de calpeptine. Significativité : p<0,05.

Tableau 14 : Expression de la vinculine dans les LHCN-M2 et les ARMS, après transfection d'oligonucléotides antisens dirigés contre la µ-calpaïne ou la m-calpaïne.

Oligonucléotides antisens	Expression de la vinculine[1] (%)±e.s.m.	
	LHCN-M2	ARMS
ASR	100	100
ASµC	114±4,82	103,87±2,88
ASmC	110,91±7,25	83,72±6,05
t-test[2]		
ASµC	**p<0,01**	p=0,30 (NS)
ASmC	**p<0,01**	**p<0,01**

[1]Les résultats sont exprimés en pourcentage d'expression par rapport au niveau d'expression dans les cellules transfectées avec l'oligonucléotide ASR.
[2]Valeurs du t-test entre les cellules transfectées avec les oligonucléotides antisens et les cellules transfectées avec l'oligonucléotide ASR. Significativité : p<0,05. n=3.

Tableau 15 : Quantification de l'actine F dans les différentes lignées cellulaires, après traitement ou non avec de la calpeptine.

calpeptine	LHCN-M2[1] (%)+e.s.m.	C2C12[1] (%)+e.s.m.	ARMS[1] (%)+e.s.m.	ERMS[1] (%)+e.s.m.
0 µM	100	100	100	100
50 µM	119,35±3,02	123,88±3,59	112,13±2,45	116,73±4,40
t-test[2]	**p<0,01**	**p<0,01**	**p<0,01**	**p<0,01**

[1]Les résultats sont exprimés en pourcentage de quantité d'actine F par rapport aux cellules non traitées.
[2]Valeurs du t-test entre les cellules non-traitées et les cellules traitées avec de la calpeptine. Significativité : p<0,05. n=3.

Tableau 16 : Expression de l'α-actine et de la β-actine dans les LHCN-M2, C2C12 et ARMS, après traitement ou non avec de la calpeptine.

	LHCN-M2[1]	**C2C12[1]**	**ARMS[1]**
Calpeptine	**Expression de l'α-actine (%)±e.s.m.**		
0 µM	100 (n=9)	100 (n=6)	100 (n=6)
50 µM	151,14±13,74 (n=9)	147,76±19,39 (n=6)	62,12±5,13 (n=6)
t-test[2]	**p<0,01**	**p<0,05**	**p<0,001**
Calpeptine	**Expression de l'β-actine (%)±e.s.m.**		
0 µM	100 (n=4)	100 (n=4)	100 (n=6)
50 µM	132,76±6,67 (n=4)	121,57±8,74 (n=4)	85,43±3,21 (n=6)
t-test[1]	**p<0,001**	**p<0,05**	**p<0,01**

[1]Les résultats sont exprimés en pourcentage d'expression d'α-actine et de β-actine par rapport aux cellules non-traitées.
[2]Valeurs du t-test entre les cellules non-traitées et les cellules traitées avec de la calpeptine.
Significativité : p<0,05.

Tableau 17 : Expression de l'α-actine et de la β-actine dans les LHCN-M2 et les ARMS, après transfection d'oligonucléotides dirigés contre la µ-calpaïne ou la m-calpaïne.

	LHCN-M2	**ARMS**
Oligonucléotides antisens	**Expression de l'α-actine[1] (%)±e.s.m.**	
ASR	100 (n=5)	100 (n=3)
ASµC	116,62±1,77 (n=5)	30,64±18,29 (n=3)
ASmC	79,51±4,11 (n=5)	39,26±17,77 (n=3)
t-test[2] **ASµC** **ASmC**	 **p<0,01** **p<0,001**	 **p<0,01** **p<0,01**
Oligonucléotides antisens	**Expression de l'β-actine[1] (%)±e.s.m.**	
ASR	100 (n=4)	100 (n=3)
ASµC	98,57±2,57 (n=4)	77,94±6,53 (n=3)
ASmC	117,36±5,39 (n=4)	90,02±3,77 (n=3)
t-test[2] **ASµC** **ASmC**	 0,44 (NS) **p<0,01**	 **p<0,01** **p<0,05**

[1]Les résultats sont exprimés en pourcentage d'expression d'α-actine et de β-actine par rapport aux cellules transfectées avec l'oligonucléotide ASR.
[2]Valeurs du t-test entre les cellules transfectées avec les oligonucléotides antisens contre la µ-calpaïne ou la m-calpaïne et les cellules transfectées avec l'oligonucléotide ASR.
Significativité : p<0,05.
(NS) : non significatif.

Tableau 18 : Vitesse de migration des différents types cellulaires sur verre et gélatine.

	Vitesse sur verre (µm/minute)±e.s.m.	**Vitesse sur gélatine (µm/minute)±e.s.m.**	**Delta des vitesses[1] (%)**	**t-test[2]**
LHCN-M2	0,187±0,003 (n=6)	0,142±0,003 (n=6)	24	**p<0,01**
C2C12	0,187±0,015 (n=5)	0,139±0,004 (n=5)	26	**p<0,01**
ARMS	0,414±0,004 (n=6)	0,358±0,004 (n=6)	14	**p<0,001**
ERMS	0,290±0,006 (n=4)	0,210±0,004 (n=4)	27	**p<0,001**
t-test[3] **C2C12** **ARMS** **ERMS**	 p=0,07 (NS) **p<0,0001** **p<0,0001**	 p=0,37 (NS) **p<0,0001** **p<0,0001**		

[1]Le delta des vitesses représente la différence de vitesse entre celle enregistrée sur verre et celle enregistrée sur gélatine.
[2] Valeurs du t-test entre les moyennes des vitesses des cellules migrant sur verre et des vitesses des cellules migrant sur gélatine. Significativité : p<0,05.
[3] Valeurs du t-test entre les moyennes des vitesses des différents types cellulaires et les vitesses de migration des cellules témois LHCN-M2. Significativité : p<0,05.
(NS) : non significatif.

Tableau 19 : Vitesse de migration des différents types cellulaires sur verre et gélatine, en présence et en absence de calpeptine.

	Vitesse sur verre (µm/minute) ±e.s.m.	Vitesse sur verre (µm/minute) ±e.s.m. calpeptine (50µM)	Delta des vitesses sur verre[1] (%) ±e.s.m.	Vitesse sur gélatine (µm/minute) ±e.s.m.	Vitesse sur gélatine (µm/minute) ±e.s.m. calpeptine (50 µM)	Delta des vitesses sur gélatine[1] (%) ±e.s.m.
LHCN-M2	0,187±0,003 (n=6)	0,167±0,003 (n=3)	11	0,142±0,003 (n=6)	0,144±0,002 (n=3)	-
C2C12	0,187±0,015 (n=5)	0,111±0,002 (n=3)	41	0,139±0,004 (n=5)	0,116±0,002 (n=3)	16
ARMS	0,414±0,004 (n=6)	0,164±0,004 (n=3)	60	0,358±0,004 (n=6)	0,126±0,002 (n=3)	65
ERMS	0,290±0,006 (n=4)	0,208±0,003 (n=3)	28	0,210±0,004 (n=4)	0,175±0,003 (n=3)	17
t-test[2] **LHCN-M2** **C2C12** **ARMS** **ERMS**		 **p<0,05** **p<0,01** **p<0,0001** **p<0,001**			 p=0,26 (NS) **p<0,01** **p<0,0001** **p<0,01**	

[1]Le delta des vitesses représente la différence de vitesse entre les cellules traitées et les cellules non-traitées.
[2] Valeurs du t-test entre les moyennes des vitesses des différents types cellulaires non-traités et les vitesses de migration des cellules traitées avec de la calpeptine (50 µM). Significativité : p<0,05.
(NS) : non significatif.

Tableau 20 : Taux d'invasion des différentes lignées cellulaires.

	Taux d'invasion (%)±e.s.m.	**Taux d'invasion (%)±e.s.m.**	**t-test[1]**
Calpeptine :	**0 µM**	**60 µM**	
LHCN-M2	7,37±0,86 (n=3)	2,12±0,46 (n=4)	**p<0,001**
C2C12	13,57±0,17 (n=3)	3,48+0,84 (n=4)	**p<0,0001**
ARMS	82,73±6,16 (n=3)	6,50±1,11 (n=4)	**p<0,0001**
ERMS	90,77±1,91 (n=3)	6,13±1,57 (n=3)	**p<0,0001**
t-test[2] **C2C12** **ARMS** **ERMS**	 **p<0,01** **p<0,0001** **p<0,0001**	 p=0,20 (NS) **p<0,01** **p<0,05**	

[1]Valeurs du t-test entre les cellules traitées ou non avec de la calpeptine (60 µM). Significativité : p<0,05.
[2]Valeurs du t-test entre les cellules témoins LHCN-M2 et les différents types cellulaires. Significativité : p<0,05.
(NS) : non significatif.

Tableau 21 : Indice d'invasion des différentes lignées cellulaires.

	Indice d'invasion (%)±e.s.m.	**Indice d'invasion (%)±e.s.m.**	**t-test[1]**
Calpeptine :	**0 µM**	**60 µM**	**---**
LHCN-M2	1	0,30±0,11	**p<0,001**
C2C12	1,84±0,2	0,47±0,13	**p<0,0001**
ARMS	11,23±0,45	0,88±0,16	**p<0,0001**
ERMS	12,32±0,2	0,83±0,12	**p<0,0001**
t-test[2]			
C2C12	**p<0,0001**	0,08 (NS)	
ARMS	**p<0,0001**	**p<0,001**	
ERMS	**p<0,0001**	**p<0,05**	

[1]Valeurs du t-test entre les cellules traitées ou non avec de la calpeptine (60 µM). Significativité : p<0,05. n=3
[2]Valeurs du t-test entre les cellules témoins LHCN-M2 et les différents types cellulaires. Significativité : p<0,05.
(NS) : non significatif.

Tableau 23 : Quantification des variations des spots retenus par analyse protéomique entre les cellules non-traitées et les cellules traitées avec de la calpeptine ou de l'inhibiteur III

	ARMS non-traités	ARMS traités avec de la calpeptine ou l'inhibiteur III	t-test[1]
spot 1	100	62,91+9,86	p<0,05
spot 2	100	54,62+3 ,93	p<0,05
spot 3	100	62,16+6,42	p<0,01
spot 4	100	72,15+4 ,15	p<0,01
spot 5	100	64,92+5,10	p<0,05

[1]Valeurs du t-test entre les cellules non-traitées et les cellules traitées avec de la calpeptine ou de l'inhibiteur III. Significativité : p<0,05.
Ces valeurs ont été établies après 2 expériences indépendantes pour chaque condition et 3 gels différents ont été utilisés pour chaque expérience.