

Calpaïnes et microparticules : exemple du sepsis et de l'angiogénèse

Lara ZAFRANI

Ce travail de thèse a été réalisé sous la direction du Pr Laurent Baud au sein de l'unité INSERM U702 (Hôpital Tenon)

Calpaïnes et inflammation

La famille des calpaïnes est composée des produits de 14 gènes différents (1). Les formes principales ou "classiques" sont la calpaïne 1 (μ -calpaïne) et la calpaïne 2 (m-calpaïne) d'un poids moléculaire de 78-80 kDa et de distribution ubiquitaire. Plusieurs mécanismes interviennent dans la régulation de l'activité enzymatique des calpaïnes. Le plus important est l'interaction des calpaïnes avec la calpastatine, un pseudo-substrat qui n'exerce pas de rôle inhibiteur permanent sur l'activité des calpaïnes, mais intervient plus vraisemblablement pour en atténuer l'activation. Les calpaïnes intracellulaires participent au développement de la réaction inflammatoire en modulant le recrutement, l'activation ou la survie des cellules inflammatoires. En particulier les calpaïnes interviennent dans l'adhérence et la mobilité des cellules inflammatoires, l'activation des polynucléaires neutrophiles (2-3), la maturation et la sécrétion de l'interleukine-1 α . En dégradant le domaine C-terminal de I κ B, elles provoquent l'activation de NF- κ B, facteur de transcription crucial dans le développement de la réaction inflammatoire (4). Pour démontrer *in vivo* le rôle pro-inflammatoire des calpaïnes, l'équipe d'accueil a créé des souris transgéniques qui sur-expriment la calpastatine (TG). Avec cet outil, elle a démontré que les calpaïnes jouent un rôle dans l'inflammation glomérulaire à la phase hétérologue de la néphrite néphrotoxique, en favorisant la mobilisation et l'activation des cellules inflammatoires (5). Dans ce travail, nous nous sommes intéressés au rôle des calpaïnes au cours du sepsis et de l'angiogénèse.

Calpaïnes et sepsis

Le sepsis est une inflammation systémique en réponse à une infection. Il peut être responsable de défaillances d'organes multiples. Malgré la fréquence et la sévérité de cette pathologie (morbi-mortalité importante), le développement de nouvelles modalités thérapeutiques est encore limité, justifiant la recherche de nouvelles cibles. Afin d'étudier le rôle des calpaïnes au cours du sepsis nous avons analysé le modèle de ligature et perforation caecale chez des souris sauvages et transgéniques surexprimant constitutivement la calpastatine. Nous avons démontré que les calpaïnes étaient capables d'induire la libération de microparticules plaquettaires favorisant la coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) au cours du sepsis, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF- α), aggravant ainsi les défaillances rénales, hépatiques et pulmonaires et responsables d'une surmortalité (6).

Figure 1. La surexpression de calpastatine (souris TG) diminue la mortalité au cours du sepsis. Sur un suivi de 7 jours, nous avons observé un bénéfice significatif de la surexpression de calpastatine en terme de survie.

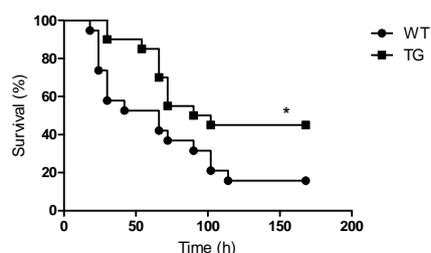


Figure 2. Le sepsis entraine une augmentation du nombre de microparticules qui est atténuée par la surexpression de calpastatine

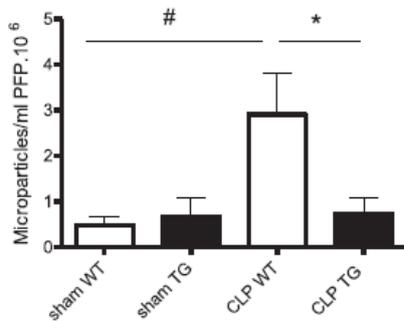
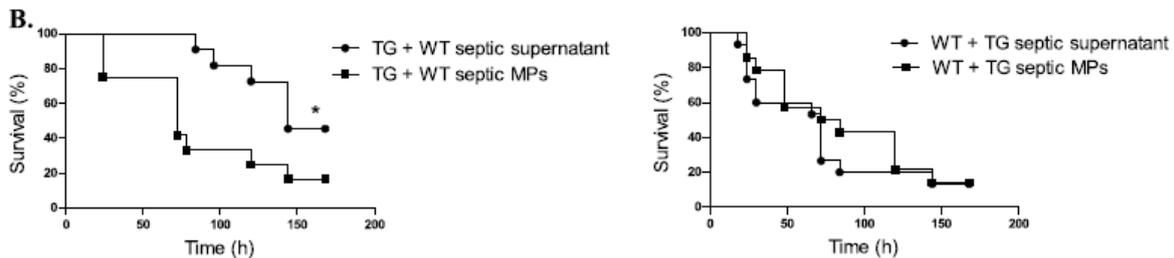


Figure 3. Le rôle des microparticules est crucial dans l'action protectrice de la surexpression de calpastatine.

En termes de survie et de dysfonction d'organe, la réinjection de microparticules (MP) provenant des souris WT à des souris TG annulait le bénéfice de survie observé au cours du sepsis chez les souris TG. Par contre l'adjonction de MP provenant de souris TG septiques n'apportait aucun bénéfice aux souris WT en termes de survie.



Calpaïnes extracellulaires et angiogénèse

Le rôle des calpaïnes ne se limite cependant pas à leur action intracellulaire. Nous avons mis en évidence des calpaïnes externalisées à partir de cellules endothéliales, capables de générer des fragments pro-angiogéniques de fibronectine, favorisant ainsi la réparation vasculaire dans un modèle de glomérulonéphrite et un modèle de cicatrisation cutanée chez la souris. Nous avons identifié la calpaïne extracellulaire dans des microparticules issues de cellules endothéliales, explorant ainsi pour la première fois le mécanisme de sécrétion active des calpaïnes (7).

Figure 3. Les calpaïnes extracellulaires favorisent la réparation vasculaire in vivo.

- L'inhibition des calpaïnes extracellulaires par l'injection de calpastatine non perméante diminue l'angiogénèse dans un modèle d'injection sous cutanée de Matrigel.
- L'administration de calpastatine recombinante diminue la formation des vaisseaux sanguins et lymphatiques dans un modèle de cicatrisation cutanée (marquage CD31 en rouge, Lyve 1 en vert et DAPI en bleu).

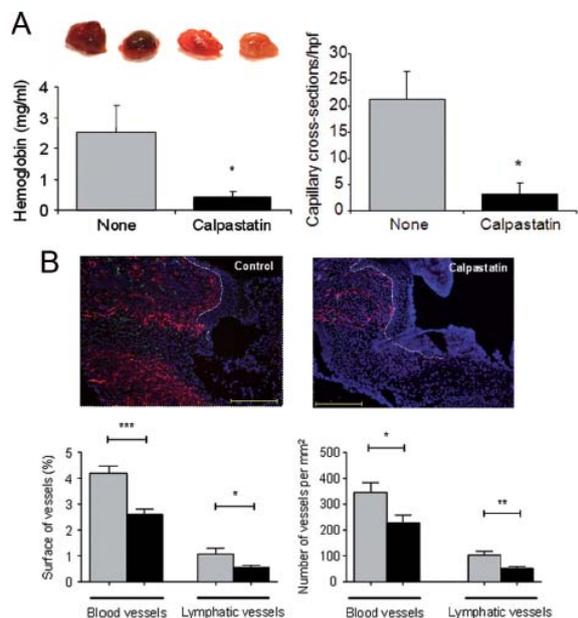
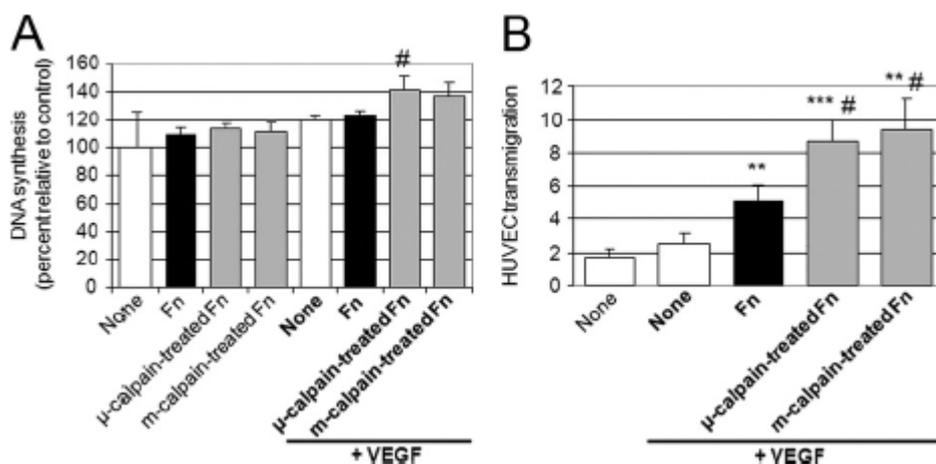


Figure 4. Les fragments de fibronectine clivés par les calpaines extracellulaires sont pro-angiogéniques

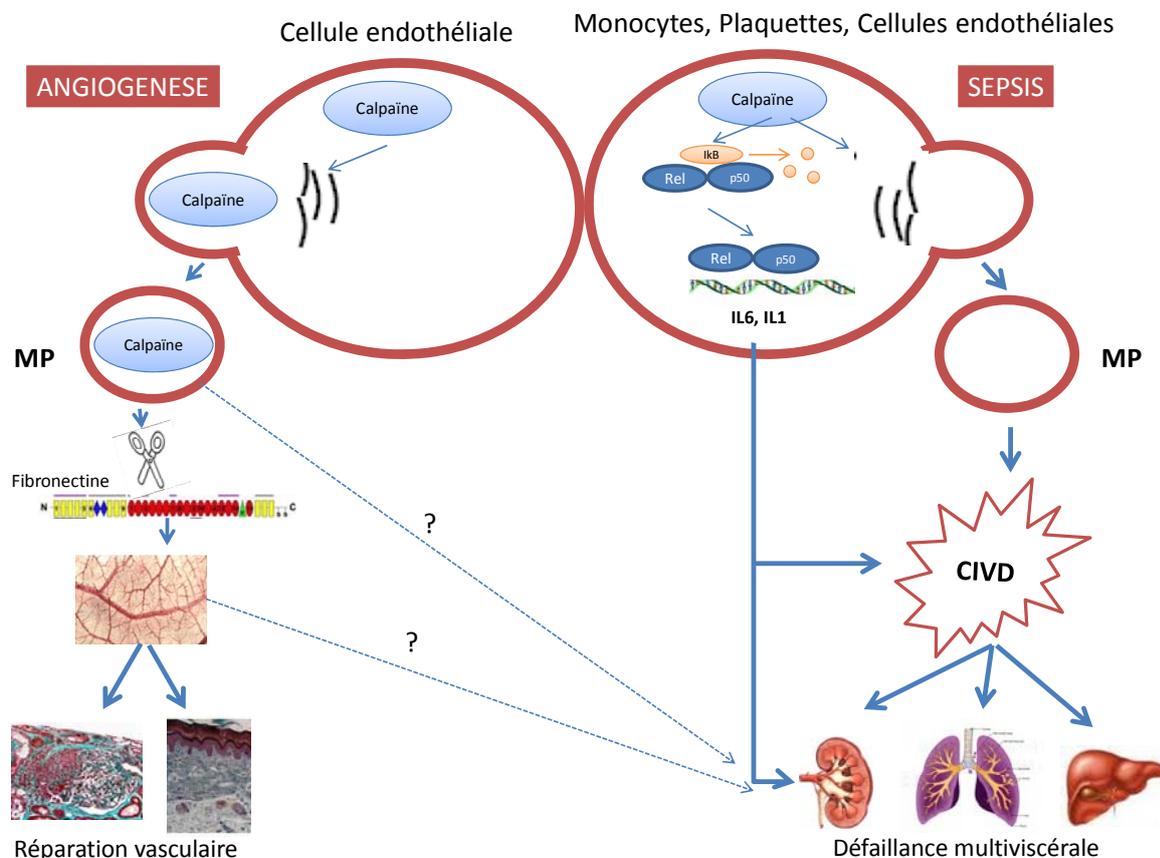
Sur des cellules endothéliales en culture, nous avons montré que les fragments de fibronectine générés par le clivage des calpaines extracellulaires augmentaient significativement la prolifération (A) et la migration des cellules endothéliales (B).



Conclusion

Ainsi, le lien entre les microparticules et les calpaines est double : d'une part, les calpaines régulent la libération des microparticules circulantes qui constituent un réservoir finement régulé d'effecteurs cellulaires et d'autre part les calpaines s'externalisent à l'intérieur même de ces microparticules. La régulation pharmacologique possible du nombre et du contenu des microparticules, via la modulation de l'activité calpaïne, ouvre la voie à de nouvelles thérapies

Figure 5. Schéma récapitulatif : calpaïnes et microparticules



- **A droite** : Sepsis : les calpaïnes intracellulaires sont capables d'une part de cliver le cytosquelette permettant le bourgeonnement des MP qui vont participer à la CIVD et aux défaillances d'organes. Les calpaïnes intracellulaires clivent en parallèle Iκβ, activant ainsi NFκB et la transcription de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 ou l'IL-1 sécrétées notamment par les monocytes et qui vont amplifier le phénotype pro-coagulant observé, la libération de MP par les plaquettes et la CIVD.

- **A gauche** : Angiogenèse : les calpaïnes intracellulaires favorisent leur propre externalisation dans les MP. Une fois externalisées, elles clivent la fibronectine générant des fragments pro-angiogéniques qui favorisent la réparation vasculaire dans un modèle de glomérulonéphrite expérimentale et de cicatrisation cutanée.

Bibliographie

1. H. Sorimachi, K. Suzuki, *J Biochem* **129**, 653 (May, 2001).
2. A. Glading, D. A. Lauffenburger, A. Wells, *Trends Cell Biol* **12**, 46 (Jan, 2002).
3. E. A. Cox, A. Huttenlocher, *Microsc Res Tech* **43**, 412 (Dec 1, 1998).
4. S. D. Shumway, M. Maki, S. Miyamoto, *J Biol Chem* **274**, 30874 (Oct 22, 1999).
5. J. Peltier *et al.*, *J Am Soc Nephrol* **17**, 3415 (Dec, 2006).
6. L. Zafrani *et al.*, *Am J Respir Crit Care Med* **185**, 744 (Apr 1, 2012).
7. B. Letavernier *et al.*, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **32**, 335 (Feb, 2012).