



HAL
open science

Rôle des calpaïnes dans le vieillissement et la réponse anti-tumorale

Guillaume Hanouna

► **To cite this version:**

Guillaume Hanouna. Rôle des calpaïnes dans le vieillissement et la réponse anti-tumorale. Physiologie [q-bio.TO]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2016. Français. NNT : 2016PA066385 . tel-01918183

HAL Id: tel-01918183

<https://theses.hal.science/tel-01918183>

Submitted on 10 Nov 2018

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

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

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Ecole doctorale : Physiologie, physiopathologie et thérapeutique (ED394)

Laboratoire : UMRS 1155 équipe 2

TITRE :

Rôle des calpaïnes dans le vieillissement et la réponse anti-tumorale

Soutenue par Monsieur Guillaume HANOUNA

le 8 novembre 2016

Membre du jury :

Pr Jean Jacques BOFFA : Président

Pr François VRTOVSNIK : Rapporteur

Pr Serge ADNOT : Rapporteur

Pr Isabelle PETROPOULOS : Examinatrice

Dr Pierre Louis THARAUX : Examineur

Pr Emmanuel LETAVERNIER : Directeur

Table des matières :

Table des matières	01
Remerciements	03
Abréviations	05
Mots clef	07
Introduction	08
1) Système calpaïne calpastatine : Généralités	08
A) Les calpaïnes	08
1) Structure	08
2) Activation des calpaïnes :	11
B) Calpastatine	15
C) Les substrats des calpaïnes : généralités	17
2) Le système calpaïnes/calpastatine : données en physio-physiopathologie	19
A) Généralités	19
B) Calpaïnes et inflammation	20
C) Les calpaïnes externalisées	24
D) Calpaïnes et vieillissement	27
1) Physiologie, Physiopathologie	27
a) Mécanismes généraux	27
b) SASP	31
c) Inflammaging	32
2) Calpaïnes vieillissement : quelques exemples de pathologies et données actuelles	34
a) Neurodégénérescence et maladie d'Alzheimer	34
b) Calpaïnes et système cardiovasculaire	35
c) Cataracte	36
d) Calpaïnes et vieillissement : les données actuelles	36
E) Calpaïnes et cancer	39
1) Généralités	39
a) Migration cellulaire	39

b) Apoptose_____	40
c) Autophagie_____	41
d) Angiogenèse_____	41
2) Mélanome et calpaïnes_____	43
a) Thérapeutique immunomodulatrice_____	43
b) Mélanome et calpaïnes_____	45
3) Réponse immune et cancer_____	46
a) Implication du système adaptatif_____	46
b) TLR2 et cancer_____	49
Hypothèse de travail 1 : _____	51
Hypothèse de travail 2 : _____	52
Travail 1 : _____	53
Travail 2 (préliminaire et en cours) : _____	54
Préliminaire_____	55
En Cours_____	56
Discussion et perspective_____	57
1) Discussion_____	57
A) Implications du système calpaïnes-calpastatine au cours du vieillissement_____	57
B) Calpaïnes intra et extracellulaires et oncogénèse_____	62
2) Perspectives_____	65
A) Calpaïnes et vieillissement_____	65
B) Calpaïnes extracellulaires et cancer_____	69
Bibliographie_____	71
Résumé/Abstract_____	88

Remerciements

Cher Pr Letavernier Emmanuel merci pour ces années d'encadrement qui aboutissent à cette thèse. Je te remercie d'avoir apporté à ma culture médicale et scientifique et d'avoir partagé ton expérience. Je regrette de devoir déclarer forfait pour les prochains « Paris Versailles » mais reste disponible pour une formation œnologique ! Encore merci pour tout.

Au Pr Vrtosnik je vous remercie pour votre disponibilité, votre gentillesse et d'avoir accepté de participer une nouvelle fois à mon jury. Je suis heureux de pouvoir poursuivre ma formation médicale au sein de votre service.

Au Pr Serge Adnot je vous remercie d'avoir accepté ce rôle de rapporteur et suis heureux de pouvoir profiter de votre jugement sur ce travail.

Au Dr Isabelle Petropoulos, merci pour votre avis éclairé lors de ma mi-thèse, je vous remercie encore pour votre participation à ce jury.

Au Dr Pierre Louis Tharoux merci de participer à ce jury. Au nom de l'équipe merci d'avoir pu éloigner un peu le Dr Luque...

Au Pr Boffa je vous remercie une nouvelle fois d'accepter la présidence de mon jury.

Au Pr Baud, mes plus sincères remerciements pour m'avoir accueilli dans votre équipe, pour m'avoir fait bénéficier de vos avis, de votre expérience et pour votre calme pragmatique.

Au Pr Ronco je vous remercie pour m'avoir accueilli dans votre laboratoire pour mon master 2 et ces trois années de thèse ainsi que dans votre service durant mon externat et mon internat.

Au Dr Christos Chadsantonious je vous remercie pour votre accueil chaleureux au sein de l'équipe 2 du laboratoire.

Au Dr Catherine Michel je vous remercie pour m'avoir permis d'effectuer ma thèse. Je tiens à remercier de même le Dr Verhoeven qui m'a permis de saisir cette opportunité. J'ai pu ainsi me former à la dialyse avec l'ensemble des équipes de l'AURA que je remercie pour ces nombreux et agréables mercredis.

Au Pr Haymann merci pour votre respectueux soutien... et pour le « marzipan ».

Au Pr Rondeau pour votre grande confiance...

Aux poules : Mères aux grands cœurs qui savent si bien recueillir ces pauvres étudiants, un merci ne sera pas suffisant :

Dans le coin gauche du ring : sa majesté de la culture cellulaire et des plantes vertes, la reine de la PCR, sans elle pas de télo...mères : Sophiiiiie Vandermerschhh !!

Dans le coin droit : la pression elle connaît! La décompression... au moins autant ! ... et ils sont peu nombreux ceux qui ont son expérience : Sandrine Placier !!!

Au Dr Mesnard encore une fois merci pour tout, depuis ton stimulant encadrement de chef de clinique jusqu'à ta généreuse contribution à ce travail.

Au Dr Raimbourg, pour sa contribution à ce travail, amical remerciement. En espérant que les deux années à venir seront tout aussi fructueuses.

A mes chers acolytes Yosu Luque et Aurelien Bataille, c'est avec un grand regret que j'écris ces remerciements qui signent la fin de nos trois ans communs. Quelques mots ne résumeront pas cette collaboration humainement fructueuse.

A Marine, merci pour ton soutien. Bon courage pour la fin de la thèse et pour ta nouvelle aventure. Prends bien soin de l'équipe.

A Perrine et Dominique merci pour votre réactivité, votre disponibilité et votre capacité à partager vos compétences respectives (même dans les remerciements vous êtes inséparables).

A Chantal et Souhila merci pour votre flexibilité et pour tout en passant par le rein ... le cerveau... le poil ... encore désolé pour tout ça.

Merci aux matinaux qui gardent le sourire : Caroline, Jessy, Gaetan et Claude de notre clean animalerie.

Aux occupants des U et bureaux adjacents Christos, Aude, Panos, Niki, Zela, Khalil et Tiffany merci pour avoir partagé vos pulls, votre culture musical, vos expériences et votre bonne humeur (ah et quelques anticorps aussi).

A Naïde, Emmanuel E. et Raphaël bon courage à vous. Ce fut un plaisir de vous (re)rencontrer au sein du laboratoire et ce sera un plaisir de (re)partager quelques apéros (plus professionnellement à bientôt dans les hôpitaux).

A Léa, Héloïse, Marine et Joanne vous avez réveillé le bureau... bonne continuation à toutes.

Chloé et Juliette ce fut un plaisir de vous rencontrer avant et après votre déménagement.

Béatrice, Mélanie, Emmanuelle merci pour tous les services petits et grands.

Aux amis qui ont suivi, subi cette thèse de trop loin ou trop près : Xavier, Léa et Aurèle ; Baptiste, Wenli et Clément ; Maxime, Mathilde et Valentin ; Aldjia, Thomas, Maren, Charlotte L., Charlotte G., Paul et Xavière et tous les autres.

Sans elle pas de western blot, pas de western blot pas de master, pas de master pas de mémoire de DES (ou plutôt pas celui-là), pas de DES pas de dialyse, pas de master pas de DES pas de dialyse bref pas de thèse pas de thèse pas de remerciements nous lui devons donc ces quelques pages... **Mme Perez Joelle, bien sûr je ne vous ai pas oublié.** Merci pour ma formation, pour ton soutien, pour TOUT.

A mes parents et ma sœur merci pour votre soutien, votre patience votre compréhension et votre aide. Ca y est je rends ma carte d'étudiant promis!

A Anne-Lyse, merci pour m'avoir aidé au quotidien pendant ces trois ans. L'aventure continue...

Abréviations :

ABCA1 : ATP-binding cassette transporter A1

Ac : Anticorps

AIF : apoptosis inducing factor

AIM2 : absent in melanoma 2

ASC : Apoptosis-associated speck-like protein containing CARD

ATG5 : Autophagy protein 5

BAX : Bcl2 associated X protein

CD : Cluster of differentiation

CTLA4 : cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4

DAMPs : Damage-associated molecular pattern molecules

ERK : Extracellular signal-regulated kinases

IGF-1 : Insulin-like growth factor 1

FAK : Focal adhesion kinase

FGF : Fibroblast growth factor

FOXO : Forkhead box O

INF : Interféron

IL : interleukine-

IRS 1 : Insulin receptor substrate 1

JAK : Janus kinase

KDa : Kilodalton

KO : Knock out

MAPK : Mitogen-activated protein kinases

MCP1 : monocyte chemoattractant protein 1

MHC : complexe majeur d'histocompatibilité

MMP : métalloprotéase matricielle

NLRC4 : NLR family CARD domain-containing protein 4

NLRP3 : NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3

NOS : Nitric oxide synthase

PAMPs : Pathogen-associated molecular patterns

PD-1/-L1 : Programmed cell death-1/-ligand 1

PKA/C : protéine kinase A/C

PPR : Patterns Recognition receptors

TLR : Toll like receptor

Th : T helper

Treg : T régulateur

ROS : reactive oxygen species

SOCS3 : Suppressor of cytokine signaling 3

STAT : signal transducers and activators of transcription

TLR : Toll like receptor

VEGF : Vascular endothelial growth factor

Mots clef :

Calpaïne

Calpastatine

Sénescence

Inflammaging

IL-1 alpha

TLR2

Mélanome

Introduction

1) *Système calpaïne calpastatine : Généralités*

A) Les calpaïnes

1) Structure

Les calpaïnes sont des cystéines protéases intracellulaires de type papaïne. Les principales calpaïnes, 1 et 2, également appelées μ et m , sont ubiquitaires. Elles peuvent être activées in vitro par le calcium à des doses micromolaires pour la calpaïne 1 et millimolaires pour la calpaïne 2.

Initialement appelées « Calcium Activated Neutral Protease », elles ont été découvertes en 1964 par Guroff et la calpaïne 1 purifiée pour la première fois en 1976. Chez les mammifères le « système calpaïne » est le plus étudié. Mais il existe au total une famille de 17 gènes, dont 2 gènes codant pour les sous-unités et 1 gène codant pour la calpastatine (tableau 1). Elles sont classées de différentes manières dans la littérature soit selon leur structure, qu'elles comportent un domaine « calmodulin-like » ou non ; soit selon leur localisation tissulaire, ubiquitaire ou spécifique de tissus.

Les calpaïnes 1 et 2 sont toutes les deux des hétérodimères composées d'une sous-unité principale d'environ 80 kDa et d'une seconde sous-unité commune (Calpaïne 4 codée par le gène *CAPNS1*) d'environ 30 kDa. Leurs structures sont proches ce qui explique qu'elles partagent un grand nombre de substrats. La sous-unité principale porte le site catalytique et la petite sous-unité est dite régulatrice.

Species	Name of Gene	Name of Polypeptide	Previously Used Name	Typical/Atypical	Protein/Comments
Mammalian	<i>Capn1</i>	Calpain 1	μCL	Typical	μ-Calpain (calpain 1 + 28 kDa)
Mammalian	<i>Capn2</i>	Calpain 2	mCL	Typical	m-Calpain (calpain 2 + 28 kDa)
Mammalian	<i>Capn3</i>	Calpain 3a	nCL-1, p94	Typical	Limb girdle muscular dystrophy type 2A
		Calpain 3b	Lp82		
Mammalian	<i>Capn4</i>	28-kDa subunit			Not a member of the 80-kDa calpain family
Mammalian	<i>Capn5</i>	Calpain 5	nCL-3, htra3	Atypical	Human homolog of <i>C. elegans</i> TRA3
Mammalian	<i>Capn6</i>	Calpain 6	Calpamodulin	Atypical	Cys/Lys, His/Tyr, substitutions in the catalytic triad
Mammalian	<i>Capn7</i>	Calpain 7	palBH	Atypical	Human homolog of <i>Aspergillus</i> Palb
Mammalian	<i>Capn8</i>	Calpain 8	nCL-2	Typical	
Mammalian	<i>Capn9</i>	Calpain 9	nCL-4	Typical	Associated with gastric cancer
Mammalian	<i>Capn10</i>	Calpain 10, 10a, 10b-10g		Atypical	Associated with type 2 diabetes mellitus
Mammalian	<i>Capn11</i>	Calpain 11		Typical	
Mammalian	<i>Capn12</i>	Calpain 12		Typical	
Mammalian	<i>Capn13</i>	Calpain 13		Atypical	
Mammalian	<i>Capn14</i>	Calpain 14		Typical	
Mammalian	<i>Capn15</i>	Calpain 15	SOLH	Atypical	Human homolog of <i>Drosophila</i> SOL

Tableau 1 : Gènes, classification et nomenclature de la famille des calpaines chez les mammifères (the calpains system Goll 2003)¹.

La sous-unité principale est composée de plusieurs domaines (Figure 1):

-Domaine I :

Amino-terminal, il est autolysé lors de l'activation par le calcium. Une fois ce domaine clivé, la « sensibilité » au calcium est accrue.

-Domaine II :

C'est le domaine qui porte le site catalytique papaine-like. Il est composé de 3 acides aminés en position 105, 262 et 286. Il s'agit respectivement d'une cystéine, une histidine et une asparagine. Ce domaine est divisé en II a et II b, chacun capable de lier un ion calcium. Il est fortement conservé entre les différentes espèces avec une homologie de 85 à 93%.

-Domaine III :

Ce domaine n'a pas d'homologie de structure avec d'autres protéines connues. Il est capable d'interagir avec les phospholipides membranaires². Il ne fixe pas le calcium, mais il peut lier la calpastatine³.

-Domaine IV :

Partie C-terminale de la sous-unité principale, c'est le domaine « calmoduline like ». Il partage une homologie d'environ 50% avec la calmoduline. Il possède 5 motifs EF-hand capables de lier le calcium (EF-1 à 5). Le premier joue un rôle dans la liaison à la sous-unité régulatrice.

La sous-unité régulatrice est divisée en deux domaines. Elle peut être exprimé via le gène *Cpns1* ou *Cpns2*, les protéines comprenant respectivement 268 ou 248 acides aminés soit environ 28 kDa⁴. *Cpns2* est de découverte plus récente, son rôle et ses interactions sont peu documentés. La sous-unité régulatrice est unie par liaison non-covalente à la sous-unité principale et est composée de :

-Domaine V :

Il correspond, comme le domaine I de la sous-unité principale, à un domaine impliqué dans l'autolyse des calpaïnes. De plus, de par sa composition riche en glycine, il est de nature hydrophobe et permet une interaction avec les membranes.

-Domaine VI :

Il correspond à l'équivalent du domaine IV, c'est-à-dire « calmoduline like ». Il participe par sa structure à la fixation du calcium et à l'hétérodimérisation des calpaïnes.

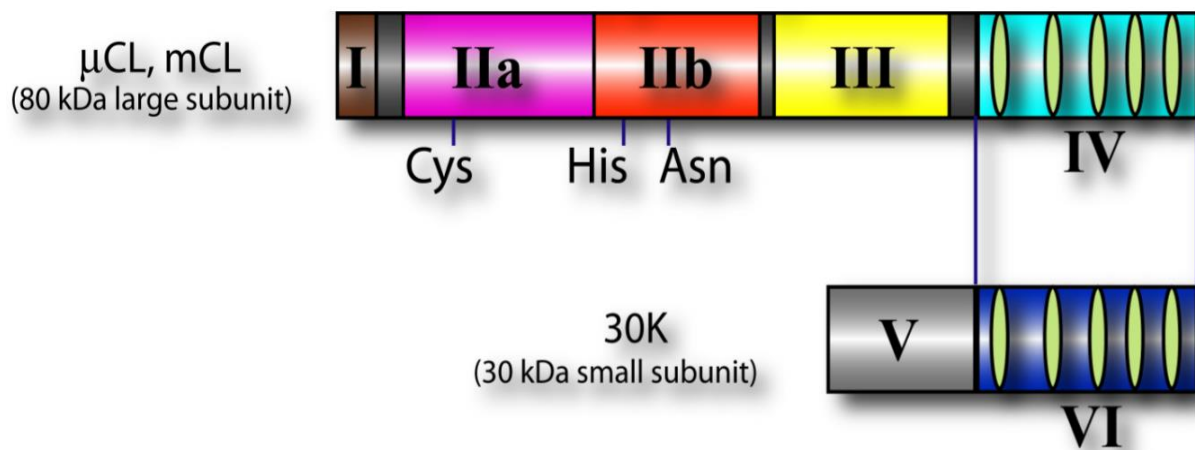


Figure 1 : Représentation schématique des sous-unités principale et régulatrice des calpaïnes 1 et 2⁵.

2) Activation des calpaïnes :

La synthèse des calpaïnes se fait sous forme inactive. Elle est *a priori* non régulée. Il semblerait néanmoins que leur expression puisse se majorer dans certaines situations (cellules inflammatoires activées)⁶.

Pour être actives, les calpaïnes nécessitent un changement de conformation. Il survient via la fixation de Ca^{2+} . Les noms de calpaïnes « μ et m » proviennent de cette capacité à être activé in vitro respectivement pour des doses micromolaires ou millimolaires de calcium.

Les études sur la conformation 3D des calpaïnes et notamment la 2 confirment des interactions entre les domaines III et V et les domaines IV et VI. La fixation du calcium permettrait de rapprocher les sous domaines de la clef catalytique II a et II b (Figure 2).

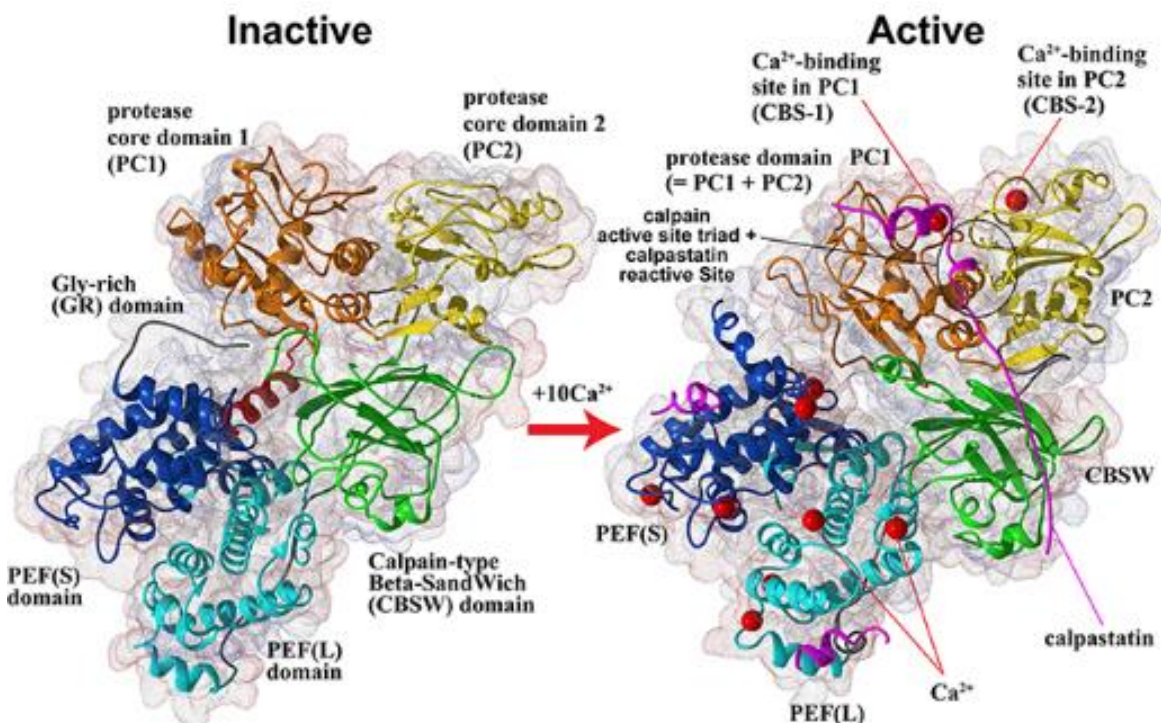


Figure 2 : Représentation 3D de la calpaïne 2 associée à la calpaïne 4 sous forme inactive (gauche) et active (droite) après fixation du calcium (boules rouge) sur le domaine II (ocre et jaune) IV (bleu foncé) et VI (bleu clair). Ce schéma illustre notamment le rapprochement du sous-domaine II a et II b lors de l'activation¹⁰⁻¹².

In vivo, plusieurs mécanismes semblent à l'origine de leur activation. Ils permettent une activation pour des variations calciques plus faibles qu'in vitro :

-Le premier phénomène consiste en l'induction de l'autolyse des parties N-terminales des calpaïnes pour de faibles variations calciques (poids moléculaire post autolyse : calpaïne 1 : 76 kDa, calpaïne 2 : 78 kDa, calpaïne 4 : 18 kDa). Les calpaïnes sont alors considérées comme des pro-enzymes dans leurs formes de base. L'autolyse permettant de sensibiliser les calpaïnes qui s'activent ensuite pour des concentrations en calcium plus faibles. Mais cette hypothèse ne peut être exclusive car l'autolyse n'est pas obligatoire pour l'activité enzymatique⁷⁻⁹.

-Une deuxième hypothèse propose que les calpaïnes s'activent lors de la dissociation de la sous-unité principale et de la sous-unité régulatrice. Des données supportent cette hypothèse en retrouvant une sous-unité principale qui peut être active seule¹³⁻¹⁵.

Ces deux théories, l'autolyse activatrice d'une pro-enzyme et la dissociation activatrice, sont non exclusives et n'expliquent pas tous les phénomènes observés. Dès 1998, un modèle a été proposé par Suzuki et Sorimachi combinant ces deux grands principes. Dans ce modèle l'autolyse de la partie N-terminale est facultative et l'activation se ferait par dissociation au niveau de la membrane. La sous-unité régulatrice permettrait principalement une stabilisation, la demi-vie de l'enzyme active étant plus courte⁸ (Figure 3).

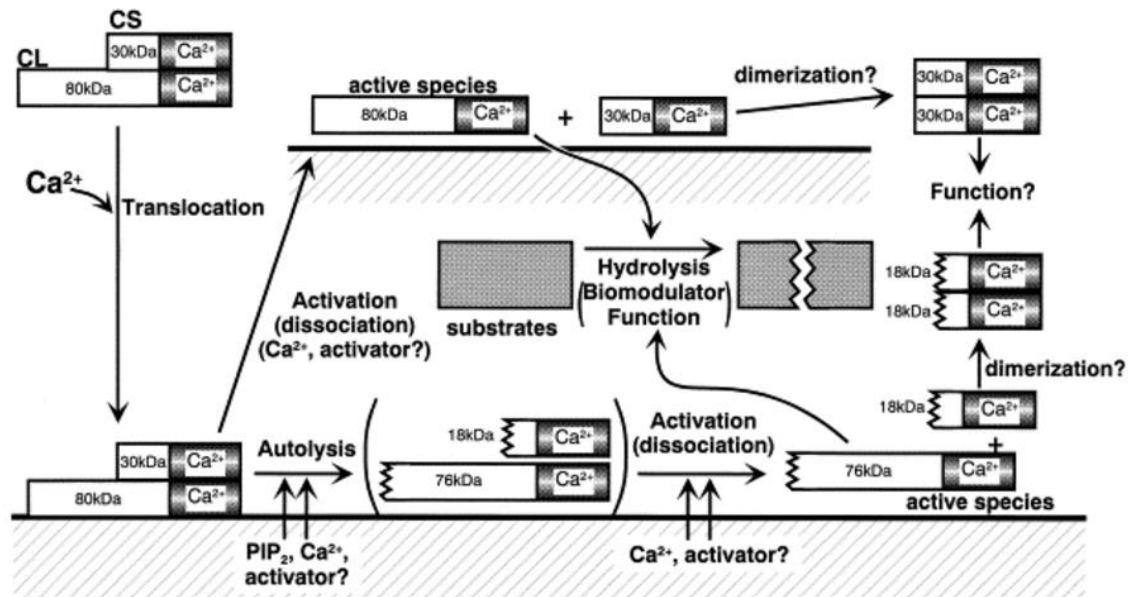


Figure 3 : Schématisation des phénomènes d'activation possibles des calpaïnes par dissociation+/- autolyse⁸.

De plus d'autres phénomènes sont susceptibles d'influencer le niveau d'activité enzymatique des calpaïnes :

- Leur localisation subcellulaire peut permettre de bénéficier de zones où les variations en calcium locale entraînent leur activation^{9,16}.
- Les calpaïnes sont susceptibles d'être mobilisées à la membrane via leur domaine III hydrophobe après un signal calcique¹⁷⁻²⁰. La liaison à certains lipides, dont la phosphatidylsérine et le phosphatidylinositol, améliore la sensibilité au calcium. Certaines zones de la membrane riche de ces phospholipides pourraient jouer un rôle de recrutement +/-activateur des calpaïnes²¹.

-La phosphorylation peut moduler leur activité : soit une majoration via ERK/MAP kinases (Extracellular signal-regulated kinases/Mitogen-activated protein kinases), soit une diminution via la protéine kinase A (PKA)^{22,23}.

L'étude de l'activation des calpaïnes reste pour le moment incomplète. La distribution subcellulaire des calpaïnes et les formes de calpaïnes prépondérantes varient selon le type cellulaire. Il existe très probablement de nombreuses formes activées dissociées ou non, autolysées ou non et possiblement fixées aux membranes dans des zones préférentielles adaptées à la cellule et à son métabolisme.

B) Calpastatine

La calpastatine est l'inhibiteur spécifique des calpaïnes in vivo. Le gène codant pour la calpastatine a été cloné dans les années 1990²⁴. Le gène de la calpastatine, *cast*, localisé sur le chromosome 13 chez la souris est composé de 35 exons et possède plusieurs promoteurs²⁵. Il existe donc plusieurs iso-formes de la calpastatine résultant d'un épissage alternatif, de protéolyse et/ou de la phosphorylation de la protéine (8 iso-formes décrites de 20 à 280 KDa). Des artefacts techniques, comme des anomalies de migration en électrophorèse, ont rendu l'identification et l'estimation du poids moléculaire de la calpastatine ardues²⁶. Les différentes isoformes ne sont pas tissu-dépendantes^{27,28}.

La calpastatine est composée de 4 domaines principaux (I, II, III, IV) précédés d'un domaine N terminal (L-Domain). Le L-Domain peut lui-même être précédé du domaine XL selon les iso-formes. Le domaine L permet une liaison à la membrane via des résidus basiques. Chaque domaine principal possède trois sous-domaines (A, B, C) (Figure 4). Les calpaïnes autres que 1 et 2 sont inhibées par la calpastatine si elles possèdent des domaines calmoduline-like (les calpaïnes non inhibées : 3-8-11).

L'action inhibitrice de la calpastatine est elle aussi calcium-dépendante (via le domaine B), mais à un seuil moindre que celui qui permet l'activation des calpaïnes. Elle joue alors le rôle de pseudo-substrat et rentre en compétition avec les autres substrats^{29,30}.

La calpastatine pourrait également avoir un effet inhibiteur non-compétitif : Les sous-domaines A et C sont capables de lier les domaine IV et VI des calpaïnes sans effet inhibiteur direct³¹. Cela permettrait au sous-domaine B d'interagir avec le domaine II et par là-même le site actif. La capacité inhibitrice de la calpastatine pourrait être modulée par sa phosphorylation³².

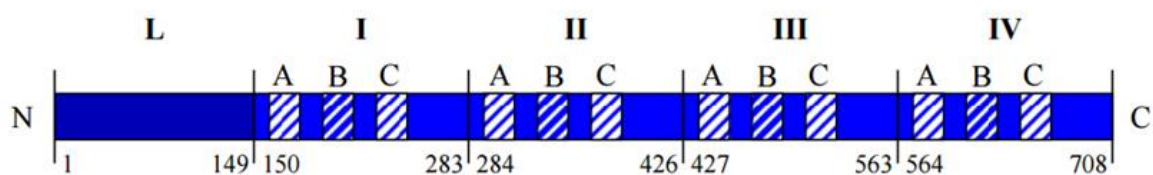


Figure 4 : Représentation schématique de la calpastatine avec 5 domaines (L,I,II,III et IV) et ses sous-domaines (A,B et C)³.

C) Les substrats des calpaïnes : généralités

Les calpaïnes ont de nombreux substrats et sont susceptibles par ce biais d'intervenir dans de nombreux processus cellulaires. Cette multitude peut rendre leur implication ou leur rôle finaliste difficile à identifier.

Une catégorie identifiable de substrats comporte une ou des séquences dite(s) « PEST » (Proline, Glutamine, Serine et Thréonine). Cette séquence favorise par la présence de charges négatives la fixation du calcium nécessaire à l'activation des calpaïnes. Elle n'est toutefois pas consensuelle et peut être absente^{33,34}. Voici une liste non exhaustive de substrats :

-protéines en lien avec le cytosquelette :

Leur capacité de clivage sur des sites sélectifs des protéines du cytosquelette laisse supposer que l'un des principaux rôles des calpaïnes est de réguler les phénomènes membranaires de migration, adhésion, de podocytose cellulaire...³⁵⁻³⁷. Les substrats suivants ont ainsi été répertoriés : β -caténine, desmine, cadhérine, tubuline filamine, vimentine, integrine β 3, talin...

-Des protéines impliquées dans des voies de transduction (enzymes, récepteurs et autres protéines membranaires) :

Elles sont impliquées par exemple dans l'activation de la voie ERK/MAP Kinase via le clivage inhibiteur de la protéine kinase C (PKC) et la PKC va elle-même favoriser une majoration de leur activité³⁷⁻³⁹. Dans la voie JAK/STAT (Janus kinase/signal transducers and activators of transcription), elles sont susceptibles de cliver l'inhibiteur SOCS 3 (Suppressor of cytokine signaling 3) et de favoriser l'expression de VEGF (Vascular endothelial growth factor) et

donc de l'angiogenèse⁴⁰. Mais elles clivent aussi de multiples autres substrats comme la sous-unité alpha de protéine G, la phospholipase C, des caspases (3, 7, 9 et 12).

-des facteurs de transcription :

Différents facteurs de transcription voient leur activité modifiée soit par un clivage direct (C-Jun, C-fos), soit par la levée d'une inhibition (I- κ B α /NF- κ B). Pour d'autres comme P53, il semble que les calpaïnes puissent agir via plusieurs mécanismes antagonistes (le clivage d'un inhibiteur (MDM2 ou PARC), la dégradation directe la protéine P53)^{33,41-45}.

2) Le système calpaïnes/calpastatine : données en physiopathologie

A) Généralités

Le clivage par les calpaïnes n'a pas pour objectif le recyclage des protéines cellulaires, mais permet de réguler de nombreux phénomènes par activation, maturation, levée d'inhibition *etc.* La grande variabilité de leurs substrats et leur localisation ubiquitaire leur permettent d'être impliquées dans de nombreux processus cellulaires en jouant sur les protéines de structure, la régulation enzymatique, l'inhibition ou l'activation de voies de transduction comme la régulation de la réponse à l'insuline, ...

Au cours du développement, la délétion chez la souris de la calpaïne 2 est non viable ainsi que celle de la sous-unité régulatrice qui est létale à J11 environ. La délétion de la calpaïne 1 est par contre sans conséquence ni sur le développement ni sur l'évolution ultérieure de la souris⁴⁶⁻⁴⁸. Ces résultats illustrent la capacité de compensation des calpaïnes 1 et 2 mais aussi l'existence de rôles exclusifs de l'une et l'autre. Mais ces rôles spécifiques restent encore rarement définis.

Elles sont impliquées dans la migration cellulaire avec une action principale sur les protéines d'adhésion et du cytosquelette, dans l'inflammation, l'apoptose en relation avec les caspases, *etc*^{43,49-54}.

Tous ces effets expliquent qu'elles puissent jouer un rôle dans de nombreuses pathologies. Ainsi on les retrouve dans le développement de l'artériosclérose, le diabète, les AVC, des pathologies neurodégénératives (maladie d'Alzheimer), la cataracte et certains cancers⁵⁵.

B) Calpaïnes et inflammation

Les calpaïnes ont un effet pro-inflammatoire bien documenté. Il peut être médié par différentes actions :

-Le principal effet pro-inflammatoire des calpaïnes passe par l'activation de NF- κ B.

Il a été montré que l'inhibition spécifique des calpaïnes restreint l'activation de NF- κ B. Cet effet des calpaïnes est secondaire au clivage d' I κ B α sur une séquence PEST spécifique (Figure 5) ^{33,41}. NF- κ B est essentiel dans la réponse inflammatoire car il permet la synthèse de nombreuses protéines pro-inflammatoires comme des pro-cytokines/cytokines (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 et TNF- α), NLRP3 qui participe à la formation de l'inflammasome nécessaire à la maturation/sécrétion de plusieurs cytokines, la NO synthase (NOS₂) qui permet la synthèse de NO responsable de la vasodilatation locale et l'afflux cellulaire, des protéines d'adhésion comme VCAM-1 et ICAM-1 responsables notamment de l'ancrage des polynucléaires^{56,57}. I κ B est un inhibiteur endogène de NF- κ B. Il lie NF- κ B et le séquestre au niveau cytoplasmique. Pour être actif NF- κ B doit se libérer d'I κ B pour être transloqué dans le noyau, où il jouera son rôle de facteur de transcription.

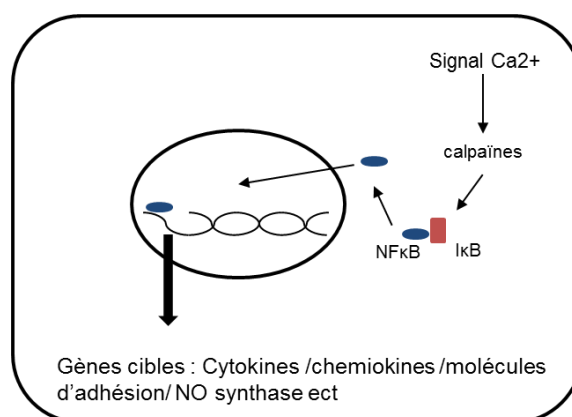


Figure 5 : Schéma de l'action des calpaïnes sur la régulation de NF- κ B.

-Les calpaïnes limitent l'action des glucocorticoïdes :

Les glucocorticoïdes sont de puissants anti-inflammatoires. Ils peuvent être produits lors d'une stimulation sympathique et réguler la réponse au stress en aidant l'organisme à s'adapter à une agression (contrôle de la réponse inflammatoire, glycogénolyse...). Les calpaïnes modulent la réponse aux glucocorticoïdes via le clivage de HSP-90, protéine chaperonne qui stabilise le récepteur nucléaire des glucocorticoïdes. Elles limitent ainsi l'effet anti-inflammatoire des glucocorticoïdes^{58,59}.

-Les calpaïnes ont été rapportées aussi comme participant à la maturation/sécrétion de pro-cytokines dont l'interleukine-1 α (IL-1 α)^{60,61} :

L'IL-1 α est essentielle car elle constitue l'un des premiers signaux d'alarme et participe ainsi à la réponse immune primaire, au recrutement précoce de polynucléaires neutrophiles et à l'activation lymphocytaire. Elle a la capacité de favoriser sa propre sécrétion via un effet autocrine et paracrine par son récepteur IL-1R1 et de favoriser la production d'interleukine-2, interleukine-6, interleukine-8 etc. Les macrophages, principale source de l'IL-1 α en cas de stimulation aiguë, ont un « équipement » cellulaire spécifique : l(es) inflammasome(s) (NLRP1/NLRP3/AIM2/NLRC4). L'inflammasome le plus répandu et le plus étudié est constitué d'un assemblage de trois protéines : NLRP3, ASC (qui relie les éléments) et la pro-caspase1. Son activation entraîne le clivage de la pro-caspase1 en caspase1. La caspase 1 va alors permettre la maturation et la sécrétion des cytokines comme IL-1 α , IL-1 β , IL-18 et IL-33. Il existe plusieurs activateurs de l'inflammasome : particuliers (cristaux d'urate de sodium, cristaux d'aluminium, microparticules de silice..), non particuliers (éléments bactériens comme la nigéricine ou la toxine cholérique), ATP...). Le mécanisme d'activation du groupe non particulière est médié par un flux potassique indépendamment de signaux calciques⁶². Les activateurs particuliers quant à eux ont une action mal documentée. Elle pourrait passer par une élévation des ROS ou par les cathepsines en lien avec les lysosomes/endosomes nécessaires à la prise en charge des particules phagocytées. Gross et ses collaborateurs ont montré sur des cellules dendritiques murines in vitro, que la sécrétion de l'IL-1 α est en partie indépendante de

l'inflammasome en cas de stimulation par les activateurs particuliers et qu'elle est en lien avec l'activité calpaïne. L'IL-1 β est, elle, uniquement dépendante de l'inflammasome (Figure 6)⁶¹. L'IL-1 α participe aussi aux phénomènes pro-inflammatoires liés à la senescence. L'IL-1 α peut être sécrétée par des cellules autres qu'immunitaires in vitro dans des conditions de senescence et de stress oxydatif. Dans ces conditions sa sécrétion est aussi liée à l'activation des calpaïnes⁶³.

-L'IL-33 est un membre de la famille des IL-1. Elle favorise une réponse lymphocytaire TH2. Elle est aussi reportée comme pouvant être activée par les calpaïnes⁶⁴.

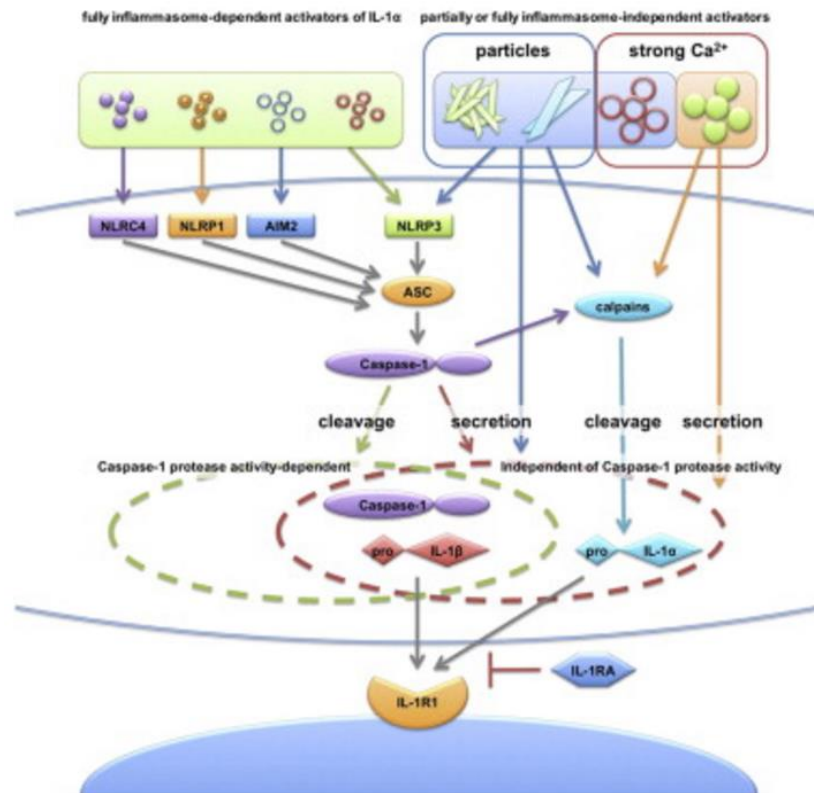


Figure 6 : Schéma résumant le mode de sécrétion/activation de l'IL-1 α et l'IL-1 β qui vont aller se fixer sur leur récepteur commun IL-1R1: l'IL-1 β est uniquement activée par les inflammasomes (NLRC4, NLRP1, AIM2 et NLRP3 qui s'associent à l'ASC et la pro-caspase 1), l'IL-1 α est activée par les inflammasomes d'une part et par les calpaïnes dans le cas d'une stimulation par les activateurs particuliers d'autre part.

Plusieurs modèles ont montré que les calpaïnes permettent un recrutement des cellules inflammatoires sur le site d'une « lésion »^{6,65}. Les calpaïnes participent notamment au recrutement des lymphocytes T et elles peuvent favoriser une réponse de type TH1 ou TH17^{6,66}.

C) Les calpaïnes externalisées

Les calpaïnes sont capables d'être externalisées de manière passive au cours de l'apoptose, mais aussi de manière active par un mécanisme contrôlé. En effet, il n'existe pas de sécrétion passive en absence de peptide signal dans leur séquence protéique. Différentes cellules dont les cellules endothéliales et les lymphocytes ont montré leur capacité à sécréter les calpaïnes. Mais cette capacité n'a été que peu étudiée pour le moment et peu de choses sont connues sur le mécanisme exact de cette sécrétion, sa régulation et son rôle. Ainsi les données actuelles peuvent se résumer brièvement :

-Ce phénomène a été mis à jour et particulièrement documenté au niveau articulaire⁶⁷. Les calpaïnes externalisées y ont un rôle en pathologie, notamment dans la polyarthrite rhumatoïde (pathologie articulaire inflammatoire destructrice) et l'ostéoarthrite (pathologie infectieuse)^{68,69}. Dans ces pathologies rhumatologique les calpaïnes une fois externalisées participe à la destruction du cartilage⁷⁰.

-In vitro elles sont capables d'activer TGF- β qui a un rôle anti-inflammatoire⁷¹.

-Les calpaïnes externalisées sont susceptibles de jouer un rôle dans la neoangiogenèse. Elles peuvent notamment en étant externalisées via des mécanismes impliquant des molécules comme le VEGF ou la norépinéphrine entraîner le clivage de la fibronectine qui d'une part, permet une moindre interaction de la matrice avec les cellules endothéliales et génère un produit de clivage qui a un rôle pro-angiogénique⁷².

-Récemment au sein du laboratoire l'équipe a pu montrer que les calpaïnes sont également sécrétées par les lymphocytes via un processus dont ABCA1 (canal anion AMPc dépendant ubiquitaire de la famille des ATP binding cassette ayant un rôle dans les flux de cholestérol) est au centre mais dont le mécanisme exact reste mal expliqué et impliquerait la formation

de microvésicules (Figure 12)⁷³. En effet, il a mis en évidence sur des lymphocytes activés que l'inhibition pharmacologique d'ABCA1 diminue l'activité des calpaïnes dans le milieu extracellulaire, ceci étant confirmé par Si RNA. En miroir, la stimulation d'ABCA1 s'accompagne d'une majoration de l'activité des calpaïnes extracellulaire. Pour étudier les modifications spécifiques des calpaïnes extracellulaires sur les lymphocytes, ils ont été exposés à de la calpaïne après stimulation. Cette expérience a mis en évidence que les calpaïnes n'influencent pas in vitro les lymphocytes T helper 1 (Th1) ni T helper 2 (Th2), mais inhibe la sécrétion d'interleukine-17A (IL-17A) sans dégradation directe de cette dernière. Cette modification s'accompagne d'une modification de phénotype lymphocytaire en effondrant le niveau de ROR γ t (facteur de transcription propre aux lymphocytes Th 17). L'étude différentielle des protéines membranaires des lymphocytes exposés ou non à la calpaïne 1 a permis de mettre en évidence que gp96, une protéine chaperonne, est exprimée seulement en absence de calpaïne sans être directement clivée. Toll like receptor 2 (TLR2) est un des ligands de gp96. Il est lui clivé par les calpaïnes sur sa partie extracellulaire induisant ainsi la différence d'expression de gp96. Les autres TLRs ne sont pas dégradés. La stimulation par un agoniste spécifique de TLR2 majore bien la sécrétion d'interleukine-17 et ceci de manière réversible en cas d'exposition à la calpaïne 1.

L'interleukine-2 est capable de limiter la sécrétion de l'interleukine-17⁷⁴. L'étude de lymphocytes stimulés par de faible dose d'IL-2 a pu montrer que ce phénomène est médié par la majoration de l'expression d'ABCA1, la sécrétion des calpaïnes et la diminution de TLR2 membranaire. Cette cascade étant bien responsable d'une moindre sécrétion d'interleukine-17.

Un modèle murin a été mis au point pour l'étude in vivo. Ce modèle a été créé grâce à l'intégration d'un transgène de calpastatine murine couplé à un peptide signal (permettant la sécrétion extracellulaire) sous le contrôle du promoteur de la CRP (souris CRP Calpast). Ce modèle murin permet donc d'inhiber spécifiquement au niveau extracellulaire l'activité des calpaïnes dans des conditions inflammatoires via la sécrétion de calpastatine par le foie. La première expérience a consisté en une péritonite stérile par un agoniste de TLR2 (Pam3Cys). Les souris CRP Calpast présentent dans cette condition une production d'interleukine-17 majeure par rapport aux contrôles. Une dernière expérience in vivo

d'arthrite inflammatoire retrouve un tableau clinique plus franc et une destruction histologique articulaire plus importante chez les souris CRP Calpast.

Au total, les calpaïnes extériorisées ont un rôle anti-inflammatoire, ou au moins immunomodulateur, miroir du rôle pro-inflammatoire qu'elles exercent en intracellulaire.

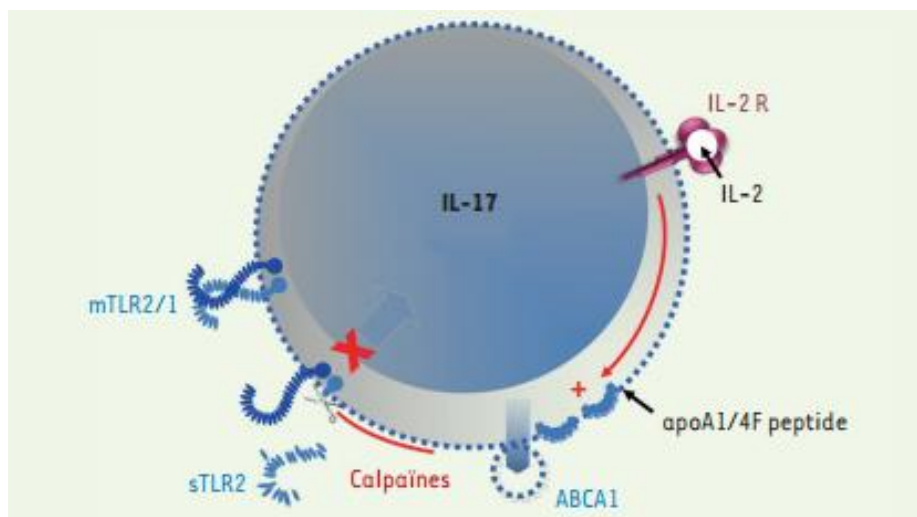


Figure 12 : Schéma représentant le mécanisme d'externalisation des calpaïnes par ABCA1 hors des lymphocytes et leur cible TLR2⁷⁵.

D) Calpaïnes et vieillissement

1)Physiologie, Physiopathologie

a)Mécanismes généraux

Le vieillissement n'est pas un phénomène unique. Il est spécifique pour chaque individu où il se révèle être le résultat de la capacité d'adaptation et de réparation à de multiples « détériorations ». Ces « détériorations » ont des origines multiples et peuvent être liées à des agents produits par l'organisme lui-même (ROS), ou à des phénomènes d'exposition extérieure (UV) ou biologique (agents infectieux, toxique...). L'organisme dispose de multiples procédés pour limiter / réparer ces dommages que ce soit au niveau moléculaire / de la cellule / de l'organe et ils semblent relativement bien conservés au fil de l'évolution. Les conduites d'évitement pour préserver l'intégrité de l'organisme sont les plus logiques et les plus rudimentaires.

Au niveau cellulaire il existe plusieurs mécanismes pouvant être mis en place pour réparer ou lutter contre ces effets (Figure 7) :

-La limitation de l'effet des ROS soit par une limitation de leur production avec l'exemple de la restriction calorique (dont les mécanismes sur le vieillissement sont multiples)⁷⁶. Soit avec l'activation de la voie sirtuine/FOXO⁷⁷⁻⁸⁰.

-La synthèse de chaperonnes dont les « heat shock proteins » (HSP) qui maintiennent la conformation de nombreuses protéines et aident à la synthèse de protéines avec une conformation normale lors de période de stress.

-La dégradation protéique via le protéasome ou l'autophagie sont des mécanismes de protection mis en œuvre pour empêcher l'accumulation de résidus pouvant être toxiques, permettre l'adaptation du métabolisme cellulaire à un stress énergétique, éliminer des éléments cellulaires dysfonctionnels...^{81,82}. Le protéasome assure plus de 80% de la dégradation des protéines au sein d'une cellule. Il nécessite un appareil de « marquage » permettant l'ubiquitinylation (E1, E2, E3) et un de dégradation (protéasome 26S = 20S sous-unité catalytique + 19S sous-unité régulatrice). L'autophagie (macro autophagie) se résume comme la capacité à faire fusionner des vésicules de plusieurs provenances possibles (réticulum endoplasmique, Golgi, endosomes...) avec des lysosomes où la dégradation a lieu. Elle permet la prise en charge d'organelles dysfonctionnelles. Lors du vieillissement la dysfonction de ces appareils favorise le stress oxydant, le recrutement inflammatoire... Le maintien d'un système de dégradation protéique efficient fait partie des éléments à l'origine d'un vieillissement non pathologique et de l'allongement de la survie ⁸³⁻⁸⁵.

-La protection du matériel génétique par :

Un appareillage de réparation est susceptible d'intervenir en cas de lésions de l'ADN : « poly-ADP-ribose polymérase » (PARP), « Ataxia telangiectasia mutated »(ATM), « ATM-and Rad3-related » (ATR), « DNA-dependent protein kinase » (DNA-PK) ...

Les télomères situés aux extrémités des chromosomes et la télomérase qui permet leur (re)synthèse font partie de l'appareillage de protection du matériel génétique et interviennent dans la sénescence répllicative.

-La mort cellulaire est la réponse extrême. Elle peut s'associer avec un renouvellement cellulaire à partir de progéniteurs. Mais au cours du vieillissement les facteurs profibrotiques se majorent (TGF- β) associé à une diminution des facteurs de croissance favorisant normalement le recrutement et la prolifération des progéniteurs. De plus les cellules progénitrices sont plus rares et des modifications liées au microenvironnement limitent leur potentiel ^{86,87}.

En cas de dysfonction majeure, la cellule si elle ne meurt pas peut être amenée à devenir sénescence. La sénescence se définit de manière simple comme la perte irréversible des capacités répliquatives de la cellule. En cela, c'est un mécanisme suppresseur de tumeur. Schématiquement la sénescence peut survenir dans le cadre d'une sénescence dite répliquative : suite au raccourcissement des télomères liés aux multiplications itératives, soit dans le cadre de dégâts cellulaires comme des lésions double brin de l'ADN. Il existe différents marqueurs pour ces cellules : P16, P21, γ H2AX et β galactosidase. P16 et P21/P53 sont les deux voies possibles et responsables de la mise en sénescence de la cellule par un blocage du cycle cellulaire (interaction avec les cyclines).

Une fois sénescences les cellules qui ne rentrent pas dans un processus d'apoptose peuvent perdre une partie de leur capacité initiale. Elles s'accumulent avec l'âge et sont éliminées en partie seulement par des cellules phagocytaires⁸⁸. L'implication des cellules sénescences dans le vieillissement comme actrices à part entière et non comme simples marqueurs ou conséquences du vieillissement a été récemment mis en évidence par Baker et ses associés. Ils ont montré, grâce à un modèle murin capable d'épurer ces cellules sénescences par une induction forcée de l'apoptose exclusivement dans ces cellules, que l'absence de cellules sénescences est bénéfique avec un allongement de la survie et un organisme qui présente de moindres lésions dans des organes incluant le rein⁸⁹.

L'étude des modulations de l'expression des gènes avec le vieillissement montre que les gènes surexprimés sont en rapport avec l'homéostasie énergétique, la régulation du cycle cellulaire, du stress oxydant, la réparation de l'ADN et au premier rang l'inflammation^{90,91}. Un phénomène survient avec la sénescence et est en partie à l'origine de cette inflammation, il s'agit du « SASP » pour « Senescence associated secretory phenotype ».

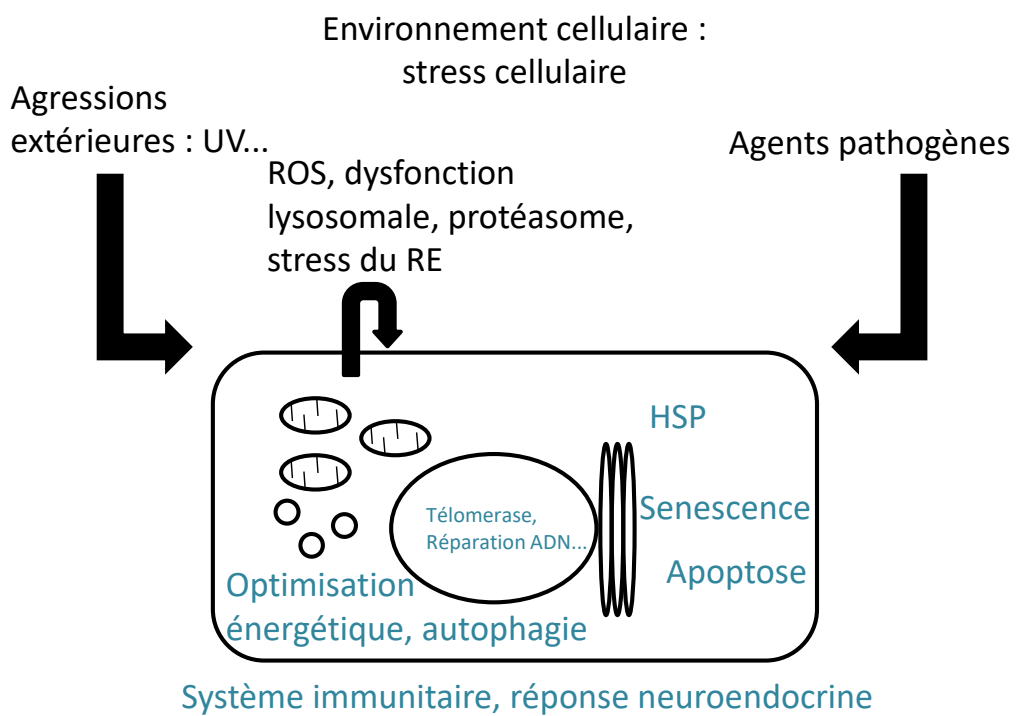


Figure 7 : Schéma des différentes agressions (noir) responsables du vieillissement cellulaire et des réponses potentielles de l'organisme (vert).

b) SASP :

Le « SASP » pour « Senescence associated secretory phenotype » est un phénomène qui consiste en une modification de la sécrétion des cellules sénescentes et notamment de cytokines.

Il va avoir plusieurs conséquences :

- un effet local par une action sur le microenvironnement (protéases, collagènes,...).
- un effet auto/paracrine lié à la sécrétion cytokinique.
- un effet de recrutement de cellules inflammatoires (chimokines).

Cette modification du profil sécrétoire des cellules a un rôle pro-inflammatoire qui semble au premier abord pouvoir avoir un effet bénéfique en favorisant l'épuration de ces cellules, donc un rôle suppresseur de tumeur. Mais *a contrario* ce même effet pro-inflammatoire semble pouvoir faire le lit de pathologies dégénératives par les modifications du milieu extracellulaire qu'il apporte : développement de la fibrose, limitation du renouvellement cellulaire par les progéniteurs, envahissement du tissu par des cellules cancéreuses (néoangiogenèse/migration) et même entraîner la sénescence des cellules adjacentes^{92,93}.

NF- κ B est impliqué dans la production cytokinique du SASP. Une des cytokines produites, qui joue un rôle primordial dans le SASP, est l'IL-1 α ⁶³. Elle peut induire sa propre sécrétion par un effet auto/paracrine et favoriser la production d'IL-6 et d'IL-8 notamment.

Le profil du SASP est majoritairement décrit comme potentiellement commun à toutes les cellules sénescentes. Mais il est probable qu'il soit différent selon l'origine de la cellule sénescente. Ainsi comme suggéré par Baker le résultat du SASP ou le SASP lui-même peut dans un organe être à l'origine de modifications spécifiques de l'organe (exemple : au niveau rénal de l'hyperactivation du système rénine angiotensine)⁸⁹.

Le SASP intervient dans un phénomène plus général nommé inflammaging.

c) Inflammaging

La réponse immunitaire peut se décomposer en de multiples phénomènes. La façon la plus simple de la décomposer est de la séparer en réponse innée et réponse adaptative.

La réponse immunitaire innée comprend comme effecteurs des cellules phagocytaires (polynucléaires neutrophiles, cellules dendritiques et macrophages), les cellules NK et le complément. Cette réponse intervient en premier lieu dans la quasi-totalité des phénomènes inflammatoires. Le système adaptatif comprend les cellules spécialisées que sont les lymphocytes T et B. Elle repose sur le principe de la présentation antigénique pour s'activer et aboutir à la production d'anticorps et par là à une réponse spécifique.

L'inflammaging est un terme instauré par Franceschi qui caractérise l'état d'inflammation de bas grade concomitant au vieillissement⁹⁴. Habituellement, le vieillissement immunitaire est décrit comme un déclin de la réponse immune « aiguë », notamment adaptative Th2 associé à une majoration de la réponse immunitaire innée. La réponse vaccinale des sujets âgés en témoigne parfaitement⁹⁵.

Ces phénomènes sont en partie expliqués par une réduction des lymphocytes T secondaire à l'involution du thymus et à la baisse avec l'âge des effecteurs T périphériques et des lymphocytes naïfs. Il s'y associe une diminution des précurseurs B au niveau de la moelle osseuse. En parallèle les expositions aux antigènes se cumulent avec le temps et les lymphocytes T mémoires sont susceptibles de perdre leur spécificité. Les immunoglobulines circulantes diminuent et donc globalement le panel antigénique cible. De plus l'expression du CMH II, qui présente les antigènes au système adaptatif, diminue lui aussi. Les polynucléaires et les monocytes/macrophages « âgés » sont eux plus sensibles et produisent plus d'interleukine-1 β , interleukine-6, interleukine-8, interleukine-15 et TNF- α ⁹⁶. L'exposition importante aux stimuli peut être un facteur pro-inflammatoire important mais aussi de transition vers cet état d'« épuisement » du système adaptatif. Les grands responsables désignés chez l'homme sont principalement viraux (EBV, CMV)⁹⁷. Il s'associe à ces modifications du système immunitaire, d'autres manifestations communes à la réaction inflammatoire comme la majoration de facteurs de la coagulation (fibrinogène, facteur von Willebrand)⁹⁸.

Le macrophage exprime le complexe de l'inflammasome de manière constitutive. Les macrophages et l'inflammasome sont impliqués dans plusieurs pathologies et voies de signalisation en lien avec le vieillissement comme l'insulino-résistance, l'obésité, la fibrose, l'athérosclérose, le vieillissement neurologique et la régulation de la sirtuine 1⁹⁹⁻¹⁰⁵. Ainsi, il a été montré une majoration des protéines de l'inflammasome en lien avec le vieillissement (NLRP3, NLRC4, pro-caspase 1)¹⁰⁰.

Au total, le macrophage est une cellule primordiale à la fois dans le vieillissement du système immunitaire et dans la réponse aux stress qu'entraîne le vieillissement. Premièrement il pallie au déficit immunitaire relatif du système adaptatif. Et deuxièmement, il participe au développement de l'inflammaging via la sécrétion cytokinique d'interleukines-1.

Au sein de cohortes de centenaires un profil similaire de majoration de différents facteurs inflammatoires est aussi retrouvé. Mais paradoxalement cet état favorise aussi certaines pathologies comme la maladie d'Alzheimer où il s'associe à la production de peptides amyloïdes¹⁰⁶. La majoration paradoxale de l'état pro-inflammatoire des centenaires semble s'expliquer par plusieurs éléments anti-inflammatoires associés qui contre balance cet état¹⁰⁷⁻¹¹⁰. Cette protection est en partie d'origine génétique et elle semble être associée à une capacité de réponse plus préservée du système adaptatif.

Il y a donc lors du vieillissement immunitaire une tendance à favoriser une réponse adaptative moindre et une réponse innée plus « agressive ». Dans la majorité des cas, cet état est subclinique mais peut faire le lit de pathologies diverses si il n'est pas contre balancé (cancers, pathologies neurodégénératives).

Le SASP évoqué précédemment rentre dans ces phénomènes pro-inflammatoires et pourrait être un des instigateurs du recrutement des cellules inflammatoires, au premier rang desquels le macrophage⁸⁸.

2) Calpaïnes vieillissement : quelques exemples de pathologies et données actuelles

a) Neurodégénérescence et maladie d'Alzheimer

L'expression des calpaïnes est constitutionnellement importante au niveau neurologique. Leur importance dans la dégénérescence cellulaire provoquée par un signal calcique notamment au niveau neuronal, est bien établie¹¹¹. De plus, les calpaïnes sont impliquées dans l'apoptose par différents mécanismes (Bax/Bcl-2 *etc*)¹¹²⁻¹¹⁴. Ces mécanismes peuvent être mis en défaut dans certaines conditions où l'activation des calpaïnes ira contre l'activation de la voie des caspases¹¹⁵. Les calpaïnes sont donc capables d'induire une perte neuronale et de promouvoir une dégénérescence toutes deux impliquées dans le vieillissement et les maladies qui y sont liées comme la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer^{116,117}. Au cours de cette dernière, l'effet spécifique des calpaïnes est plus documenté. Tout d'abord les patients qui en sont atteints ont une activation précoce des calpaïnes¹¹⁸⁻¹²⁰. Elles vont jouer en plus de leur rôle dans la neurodégénérescence, un rôle précoce dans le développement de la pathologie. Une des caractéristiques de la maladie d'Alzheimer est l'accumulation d'oligomère de protéine β amyloïde et la constitution de dépôts d'agrégats de protéines tau secondairement à son hyperphosphorylation. Il a été démontré que les calpaïnes en présence de peptides amyloïdes sont capables de cliver P35 en P25. P25 est responsable de l'activation de la kinase CDK5 qui va phosphoryler la protéine tau et le précurseur de la protéine β amyloïde ce qui va entraîner l'accumulation de tau^{111,121-123}. L'inhibition des calpaïnes dans les modèles animaux, par la surexpression de calpastatine ou par un processus pharmacologique, est capable d'inhiber l'hyperphosphorylation de tau et d'améliorer la pathologie¹²⁴⁻¹²⁶.

b) Calpaïnes et système cardiovasculaire.

On retrouve une majoration des calpaïnes ou de leur activité dans des pathologies comme l'hypertrophie myocardique, l'insuffisance cardiaque et sa progression¹²⁷⁻¹²⁹. Dans des modèles de diabète et d'hypertension artérielle, elles sont responsables du développement de l'hypertrophie ventriculaire, du recrutement des cellules inflammatoires et de la majoration du stress oxydant. Ces phénomènes sont médiés par des actions multiples sur NF-κB, NFAT, AKT...¹²⁸⁻¹³⁰. L'inhibition des calpaïnes à montrer une amélioration de ces lésions^{131,132}.

Au niveau vasculaire, elles sont impliquées dans le développement de l'artériosclérose. Elles jouent sur la régulation du cholestérol via le clivage d'ABCA1 (un transporteur membranaire), sur le recrutement des cellules inflammatoire et la réponse à l'angiotensine 2¹³³⁻¹³⁵.

Elles sont aussi impliquées lors de phénomènes aigus d'ischémie/reperfusion tissulaires, qu'ils soient myocardiques, cérébraux ou rénaux¹³⁶⁻¹⁴⁰. Leur inhibition permet de limiter les lésions, la fibrose cicatricielle et les phénomènes inflammatoires associés. Elles sont aussi responsable d'une néoangiogenèse « anarchique » en post ischémique et leur inhibition permet d'améliorer cette dernière en favorisant le développement d'une perfusion collatérale¹⁴¹. Néanmoins leur activation initiale et le recrutement de cellules inflammatoires qu'elles entraînent peuvent être nécessaires pour permettre une cicatrisation rapide et adaptée en cas de lésions ischémiques majeures. Ainsi, Wang et ces associés ont pu montrer dans un modèle murin d'ischémie cardiaque que les calpaïnes sont nécessaires au recrutement de lymphocytes CD4+ et de macrophages. Mais surtout ils ont mis en évidence que les calpaïnes favorisaient la polarisation M2 des macrophages. C'est probablement cette polarisation qui va médier le développement de la cicatrisation⁶⁵.

c) Cataracte

La calpaïne 2 est une des protéases exprimées dans le cristallin. Les calpaïnes clivent la protéine β -cristallin et la dénaturent³³. Le α -cristallin perd alors son activité de chaperonne sur le β -cristallin¹⁴³. Cette dégradation protéique entraîne la formation de protéine insoluble responsable de la perte de transparence du cristallin. Les calpaïnes ont été impliquées dans la physiopathologie de la cataracte au cours du diabète et de modèle oxydant chez l'animal^{144,145}.

d) Calpaïnes et vieillissement : les données actuelles

Les calpaïnes semblent être augmentées lors du vieillissement notamment au niveau cérébral¹⁴⁶. Cependant il n'existe pas de régulation transcriptionnelle connue et il n'existe pas de corrélation entre le niveau d'expression et l'activité des calpaïnes. Néanmoins, il existe des observations qui retrouvent une majoration des influx calciques au cours du vieillissement ce qui concorde avec une majoration de l'activité calpaïne avec l'âge¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. Il semble donc qu'au cours du vieillissement, il existe une majoration de la stimulation des calpaïnes sans nécessairement une augmentation de leur synthèse. Cette augmentation d'activité est associée à une baisse de la calpastatine¹⁵⁰. Cette baisse s'explique probablement par la majoration de l'utilisation de la calpastatine comme pseudo substrat.

Les calpaïnes sont impliquées dans des phénomènes liés au vieillissement, mais ceci n'explique ni ne lie pas directement la majoration de l'activité des calpaïnes avec l'apparition de ces signes en lien avec le vieillissement. Néanmoins il existe un faisceau d'arguments qui se renforce ces dernières années pour lier directement les calpaïnes à la physiopathologie du « vieillissement ».

Différents modèles murins ont mis en évidence des « voies » directement impliquées dans le développement du « vieillissement ». Ils présentent différents liens avec les calpaïnes (Figure 8) :

-Tout d'abord le modèle de délétion de l'AT1R (récepteur de l'angiotensine 2) a pu montrer outre une majoration de la survie, un moindre développement de lésions cardiaques, vasculaires et rénales en lien avec un moindre stress oxydant¹⁵¹. Notre équipe a déjà montré dans une publication antérieure que l'angiotensine 2 via son récepteur AT1R active les calpaïnes. De plus l'inhibition des calpaïnes chez des souris surexprimant la calpastatine et exposées à de fortes doses d'angiotensine 2, protège contre les lésions vasculaires, cardiaques et rénales, indépendamment de la pression artérielle. L'inflammation induite par l'angiotensine 2 était fortement réduite dans ce modèle ¹³⁵.

-Le modèle de souris hétérozygote pour la délétion du récepteur à l'IGF-1 (Insulin-like growth factor 1) (IGF-1R) présente lui aussi une franche augmentation de survie (délétion complète non viable)¹⁵². Ces souris sont aussi plus résistantes au stress oxydant. Le lien entre calpaïnes et IGF-1 est peu étudié. Néanmoins, il a été montré que les calpaïnes sont susceptibles d'être activées en aval d'une stimulation par l'IGF-1 via l'activation de ERK/MAPKinase comme l'a montré Le Loup et ces collaborateurs dans des phénomènes de migration fibroblastique^{153,154}. Au niveau rénal, notre équipe a pu confirmer sur des podocytes in vitro une activation des calpaïnes par l'IGF-1 (cf Discussion Annexe 1).

-Klotho une protéine transmembranaire exprimée dans le rein, les glandes parathyroïdes et le cerveau. Elle participe à la formation d'un hétérodimère membranaire avec des protéines FGFRs (Fibroblast growth factor receptor). Ce dimère constitue le récepteur au FGF-23¹⁵⁵. Klotho existe aussi sous forme soluble et peut être soit directement sécrétée soit sa forme membranaire peut être clivée. La forme soluble a une activité β -glucuronidase, mais outre son action enzymatique elle peut avoir un rôle de pseudo hormone et inhiber la réponse à l'insuline et à l'IGF-1¹⁵⁶⁻¹⁵⁸. Les souris KO pour le FGF-23 ou Klotho ont le même phénotype de vieillissement précoce (artériosclérose, calcification vasculaire, ostéoporose, atrophie cutanée, mort précoce)^{155,159}. *A contrario* les souris surexprimant Klotho sont protégées de ces lésions avec une survie augmentée et une résistance à l'insuline/IGF-1 responsable cliniquement d'un retard de croissance. Les souris

Klotho KO ont un phénotype corrigé par l'inhibition partielle de IRS-1 (insulin receptor substrate 1) en aval des récepteurs à l'insuline et de l'IGF-1¹⁵⁷. Le premier lien avec les calpaïnes apparaît lorsque Manya et Kuro mettent en évidence chez les souris KO pour Klotho une majoration de l'activité de la μ calpaïne notamment au niveau rénal. Cette observation s'est faite par la mise en évidence de la majoration du produit de clivage, spécifique des calpaïnes, de la spectrine, associé à une consommation marquée de la calpastatine¹⁴⁹. Plus récemment en 2014, Nabeshima et ses collaborateurs ont confirmé la relation entre les calpaïnes et Klotho en montrant que l'inhibition pharmacologique des calpaïnes peut restaurer en partie les lésions des souris déficientes en Klotho¹⁶⁰.

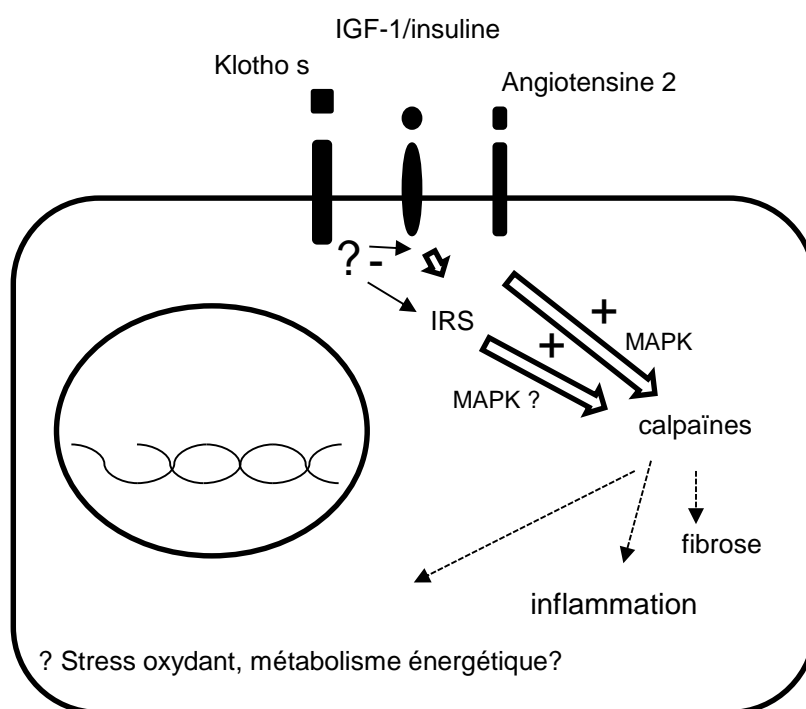


Figure 8 : Résumé schématique de l'implication supposée des calpaïnes dans les voies médiées par Klotho, IGF-1/IGF-1R et angiotensine2 AT1R toutes liées au vieillissement.

E) Calpaïnes et cancer

1) Généralités

Chez l'homme, l'expression des calpaïnes est parfois corrélée à l'agressivité de la tumeur comme décrit dans différents cancers (bronchique, sein, gastrique, rein..) et peuvent jouer le rôle de marqueur pronostic (risque de localisation ganglionnaire, métastatique) ¹⁶¹⁻¹⁶⁶. Des données retrouvent une implication indirecte de cette majoration, comme dans le cancer laryngé où les calpaïnes sont associées à une majoration de l'activation de ERK1 et à un mauvais pronostic¹⁶⁷.

Un modèle de tumeur pancréatique murin a pu relier les calpaïnes à la croissance tumorale, via l'effet bénéfique de leur inhibition par la calpeptine¹⁶⁸. Un des mécanismes impliqué dans l'effet délétère des calpaïnes serait la facilitation de l'invasion tumorale et le développement des métastases avec notamment la majoration de l'expression de MMP2 par la surexpression de CPNS1^{169,170}. Elles peuvent aussi être impliquées dans la réponse aux thérapeutiques (chimiothérapies, thérapeutiques ciblées)^{166,167}.

Par ailleurs, les calpaïnes ont, comme précédemment décrit, des implications dans de multiples phénomènes cellulaires. Ainsi leur rôle dans la migration cellulaire, la prolifération, la réponse immune, l'angiogenèse et l'apoptose sont autant de possibilités pour que les calpaïnes interviennent dans le développement tumoral.

a) Migration cellulaire

-Les calpaïnes sont susceptibles d'interagir avec le cytosquelette des cellules^{171,172}. Elles interviennent dans les processus dynamiques d'adhésion cellulaire et dans la constitution de lamellipodes. Les calpaïnes interagissent avec la plaque d'adhésion focale contenant par exemple la talin, la paxillin, la cortactin et l'erzin^{173,174}. Les calpaïnes 1 et 2 semblent avoir des rôles spécifiques dans cette interaction¹⁷⁵. Ces processus sont dépendants de multiples

facteurs (type cellulaire, phosphorylation des substrats, signaux d'activation calcique locaux ...) ¹⁶²⁻¹⁶⁷. Outre les modifications directes sur la cellule, les calpaïnes peuvent aussi favoriser des modifications matricielles par des mécanismes indirects permettant la sécrétion de protéase et ainsi favoriser la dissémination des cellules tumorales (ex : MMPs, urokinases) ^{162,163}.

b) Apoptose

-Du point de vue de l'apoptose, les calpaïnes peuvent avoir un rôle favorisant la survie cellulaire et donc le cancer, ou *a contrario* un rôle pro-apoptotique. Dans les mécanismes les impliquant dans la survie cellulaire, on retiendra l'activation de NF-κB déjà précédemment détaillée ^{177,178}. D'autres cibles des calpaïnes comme Myc peuvent jouer un rôle dans l'échappement à l'apoptose des cellules cancéreuses (le produit de clivage : Myc-nick, a un rôle anti-apoptotique) ¹⁷⁹. A l'inverse, elles peuvent favoriser l'apoptose via l'activation de caspases (3, 7, 12) ^{180,181}. L'interaction des calpaïnes avec les caspases est néanmoins complexe. Ainsi le clivage de la caspase 9 par les calpaïnes a une action inhibitrice ¹⁸². Les calpaïnes peuvent aussi être responsables de l'apoptose de manière indépendante des caspases via la nécroptose. Elles sont impliquées dans la nécroptose via le clivage de BID en tBID aboutissant au clivage et au relargage mitochondrial d'AIF (apoptosis inducing factor) ^{183,184}. De même, le clivage de BAX (Bcl2 associated X protein) est à l'origine d'un fragment pré-apoptotique responsable d'une libération de cytochrome C ^{185,186}.

Le rôle des calpaïnes sur P53 est quant à lui moins évident avec des résultats in vitro antagonistes :

-modèle d'irradiation UV d'un épithélium : les calpaïnes dégradent MDM2 (ubiquitin ligase murine double minute 2) qui contribue lui-même à la dégradation de P53, ainsi elles stabilisent l'expression de P53, et cette stabilisation permet d'induire l'apoptose ⁴⁴.

-modèle in vitro de cellules tumorales ovariennes : PARC (P53-associated parkin-like cytoplasmic protein) est une protéine séquestrant P53 au niveau cytosolique. Il a été mis en évidence que le clivage de PARC par les calpaïnes permet la translocation de P53 au niveau nucléaire responsable de l'induction de l'apoptose⁴³.

-modèle de cellules tumorales ovariennes : le clivage direct par les calpaïnes de P53 a une action inhibitrice sur P53 et l'apoptose¹⁸⁷.

-modèle d'irradiation UV d'un épithélium : Gas 2 (growth arrest specific 2) séquestre la calpaïne 2 et limite la protéolyse de P53 qui dans ces conditions favorise l'apoptose¹⁸⁸.

c) Autophagie

-Elles peuvent aussi jouer un rôle de survie cellulaire via leur interférence dans les processus d'autophagie. L'autophagie semble favorable à la survie de la cellule tumorale dans un contexte de carence en nutriment, hypoxie¹⁸⁹. A l'inverse elle semble être anti-tumorale dans un tissu sain¹⁹⁰. Les calpaïnes peuvent intervenir dans ce processus en clivant ATG5, dont le produit de clivage a un rôle pro-apoptotique, mais aussi Ambra1 (Activating Molecule in Beclin1-Regulated Autophagy) dont la dégradation contribue aussi à l'induction de l'apoptose¹⁹¹⁻¹⁹³.

d) Angiogenèse

-Enfin, dans un contexte hypoxique comme celui d'une tumeur solide, les calpaïnes peuvent intervenir dans la néoangiogenèse^{141,194}. C'est un phénomène majeur pour la survie et le développement d'une tumeur⁴⁰. Tout d'abord, les calpaïnes sont surexprimées en présence d'Hif-1 α . Hif-1 α est un facteur de transcription induit dans des conditions hypoxiques dont les cibles sont les gènes codant entre autre pour : VEGF, VEGFR, NOS2,

EPO etc. De plus, les calpaïnes sont activées par le VEGF et elles clivent la filamine A dont le produit de clivage induit la translocation nucléaire d'Hif-1 α ¹⁹⁵⁻¹⁹⁸.

L'ensemble des effets décrits jusqu'alors sont pro-tumoraux, excepté le rôle pro/anti apoptotique ambigu des calpaïnes (Figure 9). L'effet pro-inflammatoire pourrait lui jouer un rôle majeur anti-tumoral. En effet les calpaïnes, en favorisant comme déjà décrit la migration et le recrutement des cellules inflammatoires, peuvent avoir un effet anti-tumoral. Mais il est aussi bien rapporté qu'un état pro-inflammatoire chronique est susceptible de favoriser la tumorigenèse¹⁹⁹.

Il semble donc difficile d'anticiper un rôle évident des calpaïnes dans les cancers chez un organisme de manière général. Ceci d'autant plus que leurs rôles peut être différents entre la tumorigenèse et la progression tumorale (temps), mais aussi selon les différents compartiments de l'organisme et de la tumeur où elles sont impliquées : cellules inflammatoires, cellules tumorales, matrice tumorale (espace).

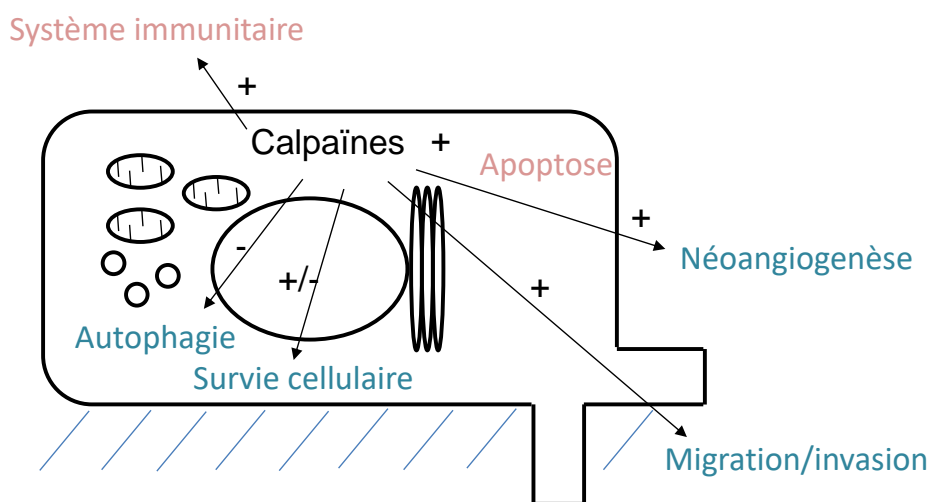
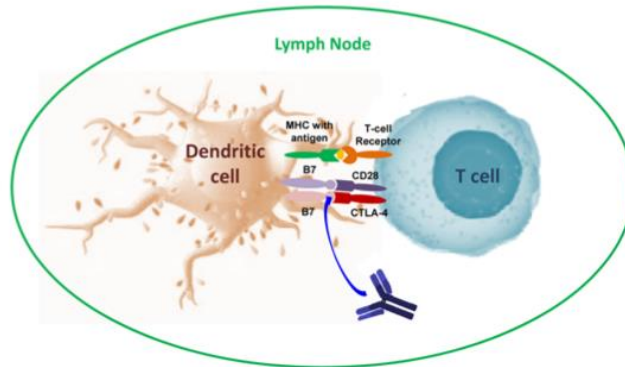


Figure 9 : Schéma résumant les cibles potentielles des calpaïnes pro-tumorales (vert) et anti-tumorales (rose).

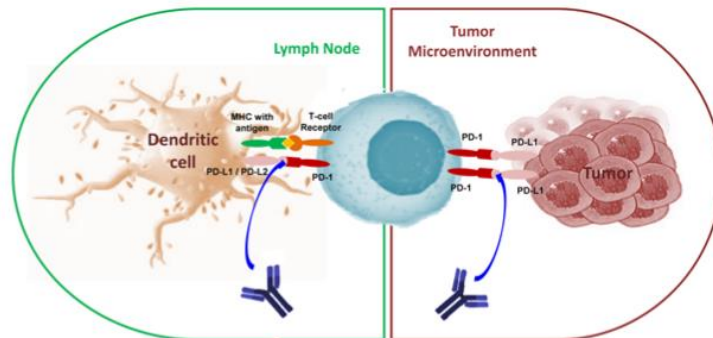
2) Mélanome et calpaïnes

a) Thérapeutique immunomodulatrice

Le mélanome est une tumeur cutanée se développant au dépend des mélanocytes cutanés. Jusqu'en 2011 en dehors des mélanomes peu développés permettant une prise en charge chirurgicale, les thérapeutiques en cas de métastases étaient limitées et inefficaces sur la survie des patients. Depuis de nouvelles thérapeutiques sont apparues. La première est une thérapeutique ciblée donnée aux patients en cas de mutation spécifique (anticorps anti-BRAF, non détaillé)²⁰⁰, les autres consistent en des thérapeutiques modulant l'immunité anti-tumorale. Dans cette deuxième catégorie, il existe deux cibles thérapeutiques reconnues : le récepteur CTLA-4 (cytotoxique lymphocyte associated antigen-4), et PD-1 (programmed cell death-1) (Figure 11). CTLA-4 est un récepteur lymphocytaire qui apparaît dans les 48 heures suivant l'activation. C'est un antagoniste de CD28 (co-activation lymphocytaire), responsable donc d'une inhibition de la réponse lymphocytaire. Il limite la réaction immunitaire par sa liaison avec les cellules présentatrices d'antigènes au niveau ganglionnaire. Le blocage de CTLA-4 par des anticorps spécifiques lève cette inhibition et permet une réponse lymphocytaire plus importante mais de manière non spécifique à la tumeur pouvant être responsable de nombreux effets secondaires. Il s'y associe une diminution des lymphocytes Treg intratumoraux^{201,202}. PD-1 est un récepteur lymphocytaire et PD-L1 et 2 sont ses ligands. Le rôle de PD-1 intervient principalement au niveau extra ganglionnaire/tumoral, où son expression est sous le contrôle de l'INF- γ . PD-L1 est produit in situ au niveau du mélanome. La stimulation de PD-1 est responsable d'un engagement vers l'inactivation des lymphocytes et une baisse de leur activité cytotoxique²⁰³. L'inhibition de cette voie, plus spécifique à l'immunité anti-tumorale, par des anticorps inhibiteurs est responsable d'une activation lymphocytaire avec des résultats encourageants dans la prise en charge des patients.



Anti-CTLA-4 inhibits step 3 (lymph node) of the cancer-immunity cycle as shown in Figure 1



Anti-PD-1 inhibits step 3 (lymph node) and step 6 (tumor microenvironment) of the cancer-immunity cycle as shown in Figure 1.

Figure 11: Représentation schématique du mode et lieu d'action des deux thérapeutiques immunomodulatrices développées dans la prise en charge du mélanome (Ac anti CTLA-4, Ac anti PD-1)²⁰⁴.

b) Mélanome et calpaïnes

Le rôle des calpaïnes dans le mélanome a déjà été étudié par notre équipe. Dans une première étude publiée en 2013, nous avons analysé un modèle de mélanome induit in situ chez la souris¹⁹⁴ (Travail 2 préliminaire). Cette étude montre que l'inhibition globale des calpaïnes chez l'hôte et dans les cellules du mélanome est responsable d'un moindre développement de la tumeur et est associé à un effet non significatif sur la vascularisation. Paradoxalement, une réduction du recrutement lymphocytaire (CD3, CD4 et NK) et une majoration des localisations secondaires (ganglionnaires) sont également observées lors de l'inhibition des calpaïnes.

Pour comprendre ces premiers résultats, nous avons effectué une première expérience in vitro sur des cellules tumorales surexprimant ou non la calpastatine. L'effet de l'inhibition confirme une moindre prolifération mais une migration plus importante en cas d'inhibition. Cela explique les premières constatations in vivo.

Nous avons poursuivi en étudiant l'effet de l'inhibition des calpaïnes dans les cellules de mélanomes uniquement. Cela nous a permis de confirmer in vivo l'effet sur la prolifération et la migration cellulaire, avec un moindre développement tumoral et la présence de métastases ganglionnaires accrues en cas d'inhibition et ceci sans différence sur l'infiltrat inflammatoire comme attendu. De plus l'analyse de l'activité cytotoxique des lymphocytes ne retrouve pas de différences en cas d'inhibition des calpaïnes lymphocytaires. La présence préférentielle de métastases ganglionnaires est donc bien expliquée par un effet de l'inhibition des calpaïnes sur la migration tumorale. Pour finir nous avons étudié l'effet de l'inhibition exclusive chez l'hôte (souris CalpTG). Cette étude ne retrouve pas d'effet sur le volume tumoral comme attendu aux vus des résultats précédents, mais un moindre infiltrat lymphocytaire.

En résumé les calpaïnes favorisent la prolifération cellulaire mais également le recrutement de cellules immunes et donc la réponse anti-tumorale.

3) Réponse immune et cancer

a) Implication du système adaptatif

L'inflammation chronique peut jouer un rôle pro-oncogène, rapporté dans plusieurs pathologies (digestive, pulmonaire..)¹⁹⁹.

Le système adaptatif lymphocytaire est au cœur de la réponse de l'organisme dans un contexte tumoral^{202,205}.

La réponse anti-tumorale s'initie par la présentation d'antigènes tumoraux par les cellules présentatrices d'antigènes aux lymphocytes T CD4+ via les molécules du CMH de classe II associées à des co-signaux nécessaires à l'activation (CD28 - CD80/B7....). Les lymphocytes CD4+ s'orientent vers divers phénotypes selon les co-stimulations qu'ils reçoivent et participent ainsi la réponse immunitaire (Figure 10²⁰⁶) :

-Lymphocyte Th1 : régulés par le facteur de transcription T-bet, ils sont caractérisés par la sécrétion d'INF- γ , TNF- α , MCP-1/CCL2 (monocyte chemotactic protein-1), CCL3 *etc.* Ils ont un effet anti-tumoral prononcé, médié par l'amplification de la réponse des lymphocytes CD8+, l'activation des macrophages, le recrutement de lymphocytes NK et la limitation de l'angiogenèse^{207,208}.

-Lymphocyte Th2 : régulés par le facteur de transcription GATA-3, ils sont caractérisés par la sécrétion d'interleukine-4,-5 et -13. Ils participent à la réponse humorale et au recrutement de polynucléaires éosinophiles²⁰⁹. Ces derniers participent à la réponse anti-tumorale²¹⁰. Cependant, certaines études impliquent la réponse Th2 dans la tumorigenèse ou la progression tumorale^{211,212}.

-Lymphocyte Th17 : ils dépendent de l'expression de STAT3 et ROR γ t. Ils sont induits par différentes cytokines dont TGF- β et l'interleukine-6, alors que l'interleukine-23 semble nécessaire à leur maintien. Ils produisent notamment de l'interleukine-17A, -17F responsable de l'induction de multiples chimiokines (CCL2, CCL7,...) ainsi que de MMPs. Ils participent ainsi à l'installation d'une réponse inflammatoire parfois majeure et sont

associés à l'auto-immunité. Leur rôle dans les pathologies cancéreuses est peu clair et parfois paradoxal. Ainsi ils semblent associés à une progression tumorale dans différentes tumeurs via à un effet pro-angiogénique²¹³⁻²¹⁵. Mais d'autres données retrouvent un effet protecteur de l'interleukine-17 et de la présence des lymphocytes Th17 notamment dans des modèles de mélanomes²¹⁶⁻²²⁰.

-Lymphocyte CD4+ Cytotoxic T Lymphocyte (CTL) : l'acquisition d'un pouvoir de cytotoxicité semble liée au facteur de transcription Eomes et à certaines conditions. Il en résulte l'expression d'INF- γ et granzyme B. Ils sont associés à une activité anti-tumorale^{221,222}.

-Lymphocyte T follicular helper (Tfh) : ils portent ce nom de leur capacité à migrer dans les organes lymphoïdes secondaires et à interagir avec les lymphocytes B. Ils expriment CXCR5, programmed cell death protein-1 (PD-1), et sécrètent de l'interleukine-21. Le facteur de transcription Bcl-6 est essentiel pour leur différenciation. Ils sont associés à un pronostic favorable au sein des tumeurs^{223,224}.

-Lymphocyte Treg : Ce sont les seuls à avoir une action franche de suppression de l'immunité anti-tumorale. Ils sont caractérisés par l'expression du facteur de transcription Foxp3. Ils jouent un rôle de modulateur de l'immunité, permettant un équilibre dans la réponse inflammatoire et luttant ainsi contre l'auto immunité. Au niveau tumoral ils semblent que l'environnement tumoral puisse localement induire leur recrutement/polarisation. La majoration au sein de la tumeur des lymphocytes Treg est un facteur de mauvais pronostic²²⁵. L'expression d'interleukine-2, des chimiokines comme CCL21 et CCL22 au sein de la tumeur ainsi que de molécules comme ICOS-L permettent d'induire un phénotype de lymphocyte Treg²²⁶⁻²²⁹. Des thérapeutiques visant les lymphocytes Treg ont été tentées avec un succès limité notamment par le faible infiltrat lymphocytaire préalable et ce malgré l'amélioration de la réponse CD8+ engendrée²³⁰⁻²³².

Une fois activés les lymphocytes vont pouvoir migrer jusqu'à la tumeur. Les patients chez qui se développent un cancer présente par définition une altération dans ce schéma de réponse d'activation et migration lymphocytaire. L'objectif des traitements dit immunothérapie est de rétablir ce schéma.

Les lymphocytes CD4+ sont activés via une présentation médiée par le CMH I. Elle peut s'effectuer par une cellule tumorale ou une cellule présentatrice d'antigènes. Les cytokines comme l'interleukine-2 et -4 participent à l'expansion clonale des lymphocytes CD4+. Ils vont avoir un effet direct sur la « destruction » tumorale. L'infiltrat en lymphocyte CD4+ +/- rapporté aux lymphocytes Treg est un facteur pronostic dans différentes tumeurs (ovaire, pancréas ou colorectal)²³³⁻²³⁷.

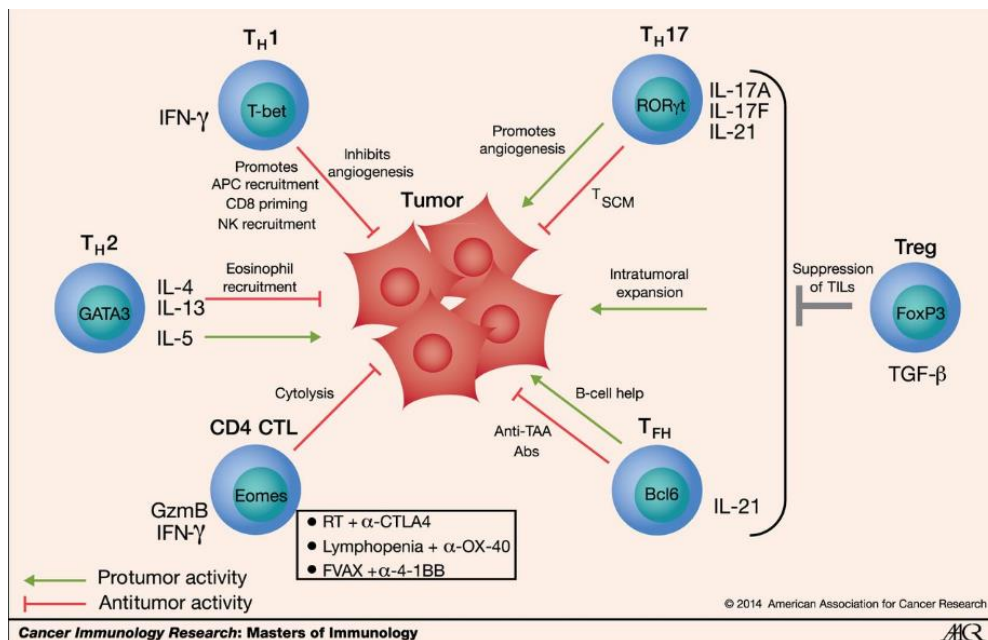


Figure 10 : Description du rôles respectif des différents phénotypes lymphocytaires CD4+ dans la réponse anti-tumorale²⁰⁶.

Le développement tumoral peut donc échapper à ce système par plusieurs mécanismes : des facteurs immunosuppresseurs/modulateurs, des mutations au sein de la tumeur (modification antigénique, échappement à l'apoptose,...)etc²³⁸. Un des mécanismes limitant l'infiltrat des lymphocytes CD8+ cytotoxiques au niveau tumoral est l'induction de lymphocytes Treg qui entraînent une baisse de l'activité cytotoxique. Ces effets font partie des raisons de moindre réponse aux thérapies immunomodulatrices dans le mélanome^{239,240}. De même que la modification du sécrétome au niveau tumoral avec la baisse de production de Cxcl9, Cxcl10²⁴¹.

b) TLR2 et cancer

Les TLRs sont des récepteurs exprimés sur les cellules de l'organisme dont les cellules immunitaires^{242,243}. Ils sont aussi présents sur certaines cellules tumorales²⁴⁴. Il en existe 10 isoformes et 3 pseudogènes. Ils permettent avec d'autres récepteurs de la famille des Pattern Recognition receptors (PPRs) de reconnaître différents signaux de « dangers » que sont les Damage-associated molecular pattern molecules (DAMPs) et Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). Ils ont chacun des ligands spécifiques. Pour former un récepteur ils se dimérisent (auto ou hétéro selon le type). Permettant la constitution de domaine TIR intracellulaire et le recrutement de molécules adaptatrices (MyD88, TIRAP, TRIF, SARM...). La plupart des TLRs, à l'exception de TLR3, activent NF- κ B et les MAPKinases via MyD88. Comme toutes les voies pro-inflammatoires, leur rôle effectif dans le développement tumoral et l'immunité tumorale est parfois ambigu.

TLR2 forme des hétérodimères avec TLR1 et TLR6. La stimulation spécifique de TLR2 est responsable d'un effet anti-tumoral. Il favorise l'activité cytotoxique et limite la conversion en Treg²⁴⁵. Zhang et ses associés en 2011 ont pu montrer que la stimulation par du BLP (lipoprotéine de synthèse, agoniste TLR2) dans des modèles murins tumoraux induits (mélanome, tumeur pulmonaire) permet d'allonger la survie et de réduire la taille tumorale. Cet effet était spécifiquement lié à une action sur les lymphocytes et non sur les cellules tumorales ou autres cellules de l'immunité. Ils ont pu montrer que dans le cadre du modèle pulmonaire la stimulation par BLP induit une réponse des lymphocytes CD8+ cytotoxiques mais aussi limite l'effet inhibiteur

des lymphocytes Treg. L'implication de TLR2 dans une réponse anti-tumorale favorable est également retrouver dans d'autres études ainsi que dans la réponse anti-tumorale précoce^{216,246-248}. En effet, les souris TLR2 KO développent plus de tumeurs coliques secondairement à un état inflammatoire, associé à une plus faible réponse Th1 et une majoration de la sécrétion d'interleukine-17A²⁴⁹.

Hypothèse de travail 1 :

Objectif : étude du rôle des calpaïnes dans le vieillissement physiologique

L'équipe du Pr Baud a pu montrer le rôle pro-inflammatoire des calpaïnes grâce à l'emploi d'un modèle murin surexprimant la calpastatine (CalpTG) et modulant ainsi l'activité des calpaïnes dans différents contextes (glomérulonéphrite, injection d'angiotensine 2, rejet d'allogreffe, sepsis)^{6,135,250,251}. Elles sont de plus impliquées dans des pathologies spécifiques en lien avec le vieillissement soit par un effet spécifique sur un substrat (exemple de la cataracte, Alzheimer) soit par un effet potentiellement pro-inflammatoire (cardiovasculaire).

Notre travail a donc consisté à éprouver l'hypothèse d'une implication directe des calpaïnes dans le vieillissement rénal et cardiovasculaire principalement.

Hypothèse de travail 2 :

Objectif : Etude de l'externalisation des calpaïnes dans la réponse anti-tumorale

L'excrétion des calpaïnes semble avoir un rôle anti-inflammatoire contrairement aux calpaïnes intracellulaires. Cet effet est médié au moins en partie par le clivage de TLR2 qui limite ainsi la réaction Th17 in vitro et dans un modèle de péritonite aseptique⁷³. L'implication des calpaïnes extracellulaires n'a, à notre connaissance, pas été étudiée dans le mélanome. Les récents résultats impliquant les calpaïnes dans le clivage de TLR2 ou la polarisation Th17 laissent envisager que l'activité des calpaïnes extracellulaires favorise le développement tumoral.

Notre travail actuel consiste donc à confirmer que l'inhibition extracellulaire des calpaïnes constitue une cible thérapeutique nouvelle en majorant l'immunité anti-tumorale.

Travail 1 :
(Article soumis pour publication)

Specific calpain inhibition protects kidney against inflammaging

Guillaume Hanouna,^{1,2,3} Laurent Mesnard, Sophie Vandermeersch, Joëlle Perez, Jean-Philippe Haymann,^{1,2,3} Aurélien Bataille,^{1,2} Laurent Baud,^{1,2} Emmanuel Letavernier,^{1,2,3}

¹ Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR S 702, F-75020, Paris, France

² INSERM, UMR S 1155, F-75020, Paris, France

³ Physiology Unit, AP-HP, Hôpital Tenon, F-75020, Paris, France

Correspondence:

Emmanuel LETAVERNIER, Service des Explorations Fonctionnelles Multidisciplinaires, Hôpital TENON, 4 rue de la Chine, 75020 Paris (France). Phone 33 1 56 01 67 73 ; Fax 33 1 56 01 70 03.
E-mail: emmanuel.letavernier@tnn.aphp.fr

The authors declare no conflict of interest

Abbreviated Title: calpastatin protects against kidney aging

Abstract word count: 241

Word Count: 2833

Number of Figures and Tables: 6 Figures, 5 supplementary Figures, 1 supplementary Table,

Keywords: calpains, calpastatin, kidney, aging, inflammaging,

Abstract

Intracellular calpains are ubiquitous pro-inflammatory proteases activated by calcium, whose activity is controlled by calpastatin, their specific inhibitor. Transgenic mice over-expressing calpastatin (CalpTG) are protected against vascular remodelling and angiotensin II-dependent inflammation. Since angiotensin II mediates aging-related vascular lesions, we hypothesized that specific calpain inhibition would protect against aging-related lesions in arteries and kidneys.

We analysed kidney, heart, aorta, brain and skin from 2-months and 2-years-old CalpTG and control mice housed together and performed high throughput RNA-Sequencing (RNA-seq) of kidney tissue in aged mice. In a second step, we analysed inflammatory response in the kidney of aged CalpTG and control mice, and in both *in vivo* (monosodium urate peritonitis) and *in vitro* (bone marrow-derived macrophages) models of inflammation.

At two years, control mice exhibited aging-related lesions, especially in kidney, arteries, brain and skin. By contrast, CalpTG mice had preserved kidney tissue and less vascular remodelling. Markers of senescence (beta-galactosidase, p21) were decreased and telomere length was preserved in the kidney of aged calpTG mice. High throughput RNA sequencing analyses evidenced that inflammatory pathways were reduced in aged CalpTG mice, especially cytokines related to NF- κ B and NLRP3 inflammasome activation. CalpTG mice had reduced macrophage infiltration with aging and CalpTG mice produced less IL-1 α and IL-1 β *in vivo* in response to inflammasome activators. *In vitro*, macrophages from CalpTG mice produced less IL-1 α in response to particulate activators of inflammasome.

Specific calpain inhibition protects against inflammaging, limiting kidney and vascular lesions related to aging.

Introduction

Calpains 1 and 2 (or μ and m) are ubiquitous calcium-activated proteases involved in pathological cardiovascular remodelling and development of inflammatory kidney diseases. Both proteases share many similar substrates and their activity is blunted by calpastatin, their natural, ubiquitous and specific inhibitor (1). Since the deletion of both calpains 1 and 2 is lethal, we previously developed transgenic mice overexpressing calpastatin (CalpTG mice) (2). These mice have normal baseline calpain activity and phenotype but the increase in calpastatin expression blunts specifically calpain activation in models of glomerulonephritis, sepsis, ischemia or pathological neo-angiogenesis (2-5). Unlike synthetic inhibitors, calpastatin inhibits selectively calpains and not other proteases. Calpains promote inflammation onset through several mechanisms. They degrade I κ B α on a specific PEST sequence, leading to NF- κ B activation and pro-inflammatory cytokines production (1,6). In addition to cytokine transcription, calpains promote interleukin-1 α (IL-1 α) maturation and activation (7). Calpains also limit glucocorticoid anti-inflammatory activity by degrading HSP-90 and are essential for inflammatory cell recruitment, migration and diapedesis (1,8,9). Accordingly, calpastatin overexpression limits NF- κ B activation and inflammatory cell migration (10,11).

We previously described that calpains promote the development of inflammatory and fibrotic lesions in kidney and arteries in response to angiotensin II, and that calpastatin overexpression protected mice against these lesions (10). Interestingly, angiotensin II, through AT-1 receptor signalling, promotes vascular aging (12). Moreover, calpains are potent mediators of neurological diseases, including Alzheimer disease (13,14). A specific feature of tissue aging is the development of an inflammatory phenotype, including overexpression of innate immunity and inflammasome-related cytokines, so-called “inflammaging” (15). Although its expression is weak and difficult to assess *in vivo*, one of the main cytokine linked to inflammaging is interleukin-1 α (IL-1 α) (16). It was therefore tempting to speculate that calpains would promote vascular and kidney aging. At last, proteomic analysis performed in Klotho-invalidated mice revealed that in the absence of Klotho, the main anti-aging mechanism identified to date, alpha-spectrin clivage was strongly increased. Further analyses identified that this clivage was specific to calpains, evidencing thereby that Klotho may decrease calpain activity (17).

We hypothesized that capains would promote aging and especially kidney and cardiovascular lesions related to aging. We show hereafter that specific calpain inhibition by calpastatin overexpression decreases tissue inflammation and kidney and vascular lesions related to aging.

Results

Evolution of kidney calpain expression and calpain activity with aging in control (WT) and CalpTG mice

To assess the evolution of calpain expression with aging in kidney cortex, we measured protein and mRNA expression of calpain 1 and 2 in CalpTG and WT mice (Figure 1 A-F). There was no significant modification of calpain expression with aging (Figure 1 A-F). Calpastatin was slightly but not significantly overexpressed in the kidney cortex of CalpTG mice compared to WT mice, at both 2 months and 2 years (Figure 1 G,H). As expected, only CalpTG mice expressed the calpastatin transgene at the mRNA level (Figure 1 L).

Calpain activity has been assessed in kidney cortex by measuring alpha spectrin cleavage and the production of the 145 kDa specific breakdown product, as previously described (2-5,10). Calpain activity was significantly lower in kidneys from CalpTG mice at 2 years when compared to WT mice (Figure 1 J-K, $p=0.041$).

Development of aging-related lesions in WT and CalpTG mice kidneys

Renal histology has been analysed in young and aged WT and CalpTG mice (Figure 2 A-D). Aging was characterized by a significant decrease in the number of glomeruli in WT mice only (Figure 2 C, $p=0.0022$). At 2 years, CalpTG mice developed less glomerulosclerosis than WT mice (Figure 2 D, $p=0.0085$). CalpTG mice were also protected against the development of interstitial fibrosis at 2 years (Figure 2 E-G, $p=0.0005$).

CalpTG mice had a reduced beta-galactosidase activity, a marker of senescence in response to oxidative stress, in tubular cells at 2 years (Figure 2 H-J, $p=0.031$). The expression of p21, another marker of senescence was also reduced in aged CalpTG mice (Figure 2 K, $p=0.01$). Kim-1 expression, a marker of tubular injury was significantly increased with aging in WT mice but not in CalpTG mice kidney cortex (Figure 2 L, $p=0.0043$).

The telomere length, a marker of replicative senescence was also preserved in aged calpTG mice in comparison to aged WT animals (Figure 2 M, $p=0.007$). This could not be ascribed to an increased telomerase activity (Figure 2 N). To assess whether calpastatin transgene could by itself protect

against replicative senescence, a culture of tubular cells from CalpTG and WT mice kidneys has been performed during 5 months (Supplementary Figure 1). There was no difference in telomere length shortening or p21 expression in vitro, evidencing that calpain inhibition protects against the aging process in vivo when the cell environment is altered (Supplementary Figure 1 A-B).

Development of cardiovascular remodelling with aging in WT and CalpTG mice

Aging was associated with the medial wall thickening of renal interlobar arteries, that was in a large part prevented in CalpTG mice (Figure 3 A,B,E, $p=0.0015$). Similarly, aorta medial wall surface was less increased with aging in CalpTG mice, in contrast with WT mice (Figure 3 C,D,F, $p=0.0011$). CalpTG mice were also protected against the heart remodelling that occurs with aging (Figure 3G, $p=0.015$). The modifications in heart weight were actually due to cardiomyocyte hypertrophy since morphometric analyses evidenced that the number of cardiomyocyte nuclei/surface decreased with aging, but to a lower extent in CalpTG mice (Figure 3H, $p=0.0002$).

To analyse whether calpastatin protection against cardiovascular remodelling or even kidney lesions would result from changes in hemodynamics, a specific set of invasive experiments has been performed in one-year old CalpTG and WT mice (Supplementary Figure 2). We did not observe any change in arterial blood pressure, renal blood flow or measured glomerular filtration rate at one year (Supplementary Figure 2 A,B,C).

Development of aging-related lesions in skin and brain in WT and CalpTG mice

The difference between CalpTG and WT mice in skin phenotype was evident at two years (Supplementary Figure 3 A-B). There were less lipofuscine deposits, a classical feature of skin aging, in CalpTG mice at 2 years than in WT animals (Supplementary Figure 3C-F). In addition, telomere shortening with aging was significant in WT mice but not in CalpTG mice (Supplementary Figure 3G, $p=0.0047$).

Astrocyte process length decreases in aged mice brain, especially in the hippocampus CA1 area. CalpTG mice had a relatively preserved mean astrocytic process length at 2 years when compared to aged WT mice, confirming the deleterious role of calpains in brain aging (Supplementary Figure 4 A-E, $p=0.016$).

Survival and cancer in WT and CalpTG mice

Although CalpTG mice exhibited less aging-related features, the lifespan was not extended in this group (Supplementary Figure 5A). Most of CalpTG mice died with an abdominal distension and autopsies revealed voluminous spleens compressing abdominal organs.

Among the 10 CalpTG mice sacrificed at two years to assess aging-related lesions, three had a tumoral spleen (Supplementary Figure 5B). Histopathological analyses of these tumoral spleens revealed lymphoma cell proliferation and destruction of the normal tissue architecture (Supplementary Figure 5 C,D).

High throughput RNA-sequencing from WT and CalpTG mice renal cortex, differential expression and pathway analysis.

In order to identify the main pathways involved in aging-related lesions, high throughput RNA analyses (RNA-Seq) have been performed in WT and CalpTG mice renal cortex. Differential expression analysis and pathways analysis revealed that most of differentially expressed pathways were related to immune cell response and that many cytokines involved in innate immunity and particularly in inflammasome activation were differentially regulated between the 2 groups (Figure 4 A, B). Gene list is provided in supplemental data (Supplementary Table 1).

Development of kidney inflammation with aging in WT and CalpTG mice kidneys

According to RNA-Seq results, further analyses were conducted to compare immune cell infiltrate and cytokine expression in WT and CalpTG mice. Immunohistochemistry evidenced that macrophage infiltration of the renal tissue increased with aging in WT mice but not in TG mice (Figure 5A-C, $p=0.028$). Since immune cell infiltrate was heterogeneous, tissue flow cytometry experiments have been performed in another set of aged and young CalpTG and WT mice to count immune cells and to identify whether macrophages polarization would be influenced by calpains. The proportion of CD45⁺ immune cells/prominin⁺ proximal tubular cells increased significantly with aging in WT mice but not in CalpTG mice (Figure 5 D-F, $p<0.05$). The number of macrophages and lymphocytes infiltrating kidney tissue was significantly increased with aging in WT mice only (Figures 5 G,H, $p<0.05$). The proportion of CD11c positive (M1) macrophages was

similar in both groups, suggesting that calpain inhibition did not modify macrophages polarization (Figure 5 I,J). The proportion of M2 macrophages (CD206+) was too low to be quantified appropriately (not shown). At last, we confirmed that the expression of cytokines related to inflammasome activation and alarmins such as IL-1 α or IL-1 β increased with aging in kidneys of WT but not CalpTG mice (Figure 5 K,L, $p < 0.05$).

Synthesis of IL- α and IL-1 β by WT and CalpTG macrophages in vitro and in vivo

To assess whether calpain inhibition would affect the synthesis of IL-1 α and IL-1 β , the two main cytokines related to NLRP3 inflammasome activation and inflammaging, bone-marrow derived macrophages were isolated. We observed that the synthesis of IL-1 α and IL-1 β at the mRNA level was globally reduced (anova) in all conditions in CalpTG mice (Figure 6 A,B, $p = 0.01$ and $p = 0.05$ respectively). Specific calpain inhibition decreased IL-1 β synthesis (anova) in the extracellular milieu in all conditions (Figure 6 D, $p = 0.003$). Of notice, IL- α synthesis was also decreased by calpain inhibition but especially after macrophage exposure to sodium urate and silica crystals, particulate activators of inflammasome (Figure 6 C, $p = 0.008$). In addition, we assessed IL- α and IL-1 β synthesis at an early phase in a monosodium urate (MSU) peritonitis model. CalpTG mice had lower expression of both IL-1 α and IL-1 β cytokines, consistent with the in vitro experiments and in vivo observations in aged mice (Figure 6 E,F, $p = 0.008$).

Discussion

The specific inhibition of calpains by calpastatin overexpression protected CalpTG mice against aging-related lesions, especially vascular and kidney lesions. Calpain inhibition reduced kidney inflammaging as evidenced by RNAseq analyses, tissular flow cytometry, immunohistochemistry and complementary in vitro and in vivo models. To our knowledge, this study is the first to identify calpains as a potent inflammaging mediator.

A protective role of calpain inhibition against aging-related processes has been demonstrated previously in neurological disorders. Actually, synthetic calpain inhibitors improved memory and synaptic transmission in a mouse model of Alzheimer disease, and specific calpain inhibition by calpastatin prevented neurodegeneration and restored normal lifespan in tau P301L mice, possibly by limiting the toxic forms of tau (18,19).

We have previously demonstrated that specific calpain inhibition reduced inflammation, cardiovascular and kidney lesions induced by angiotensin II infusion (10). CalpTG mice had a reduced response to angiotensin II signalling and impaired NF- κ B activation in kidney and heart tissue (10). Scalia et al. evidenced that calpains are involved in the endothelial adhesion molecule expression in response to angiotensin II/AT1R signalling through the degradation of I- κ B and, hence, the upregulation of NF- κ B (20). Furthermore, a pivotal role for calpains in mediating angiotensin II-induced atherosclerosis has been demonstrated (21). Overexpression of calpastatin in bone marrow-derived cells attenuated significantly angiotensin-II induced inflammation and suppressed macrophage migration and adhesion properties. These studies evidence that the renin angiotensin system (RAS) promotes kidney and vascular lesions through a calpain dependent mobilisation of inflammatory cells, independently from alteration of blood pressure (22).

During the past years, several lines of evidence argued for an important role of RAS and especially angiotensin II in the development of aging lesions, especially in kidney and arteries (12). Genetic disruption of the AT1a receptor prevented aging-related progression of cardiac hypertrophy and fibrosis, and extended mouse lifespan (23). To a lesser extent, RAS pharmacological inhibition was also able to protect against aging related lesions in murine models (24,25). Interestingly, we observed that calpain inhibition decreased features of aging particularly in the kidney and the cardiovascular system. Specific calpain inhibition was associated to less cardiovascular hypertrophy

and remodelling, independently from blood pressure. Kidneys from CalpTG mice exhibited less fibrosis and less glomerular lesions. Senescence markers including p21 and beta-galactosidase activity were dramatically lower in calpTG mice cells, indicating that oxidative stress was reduced. Genome-wide gene expression analyses in 2-years old mice highlighted that inflammation-related pathways differed dramatically between the 2 groups, particularly transcripts of genes involved in innate immunity, NLRP3 inflammasome formation and NF- κ B activation. We confirmed that immune cell and especially macrophage infiltration was reduced in calpTG mice kidneys. There was no difference in M1/M2 polarization, suggesting that inflammatory cell recruitment was influenced by the calpain system but not macrophage polarization.

We have previously described that CalpTG mice were protected against inflammation in models of glomerulonephritis, sepsis or allograft rejection but this is the first demonstration that blunting calpain activity protects against inflammaging (2,3,11). Interestingly, calpain-induced inflammatory processes and classical inflammaging features share similarities. Inflammaging is characterized by a low grade of chronic and systemic inflammation in aging, in the absence of systemic infection or inflammatory disease (15). One of the main mechanisms involved in inflammaging onset is the NLRP3 inflammasome activation by mitochondrial reactive oxygen species. NLRP3 is a multiproteic complex activating caspase 1, IL-1 α , IL-1 β and IL-18 processing and synthesis (26). The synthesis of IL-1 α and IL-1 β mRNA in response to various NLRP3 inflammasome activators were reduced in CalpTG macrophages. Interestingly, the production of IL-1 α protein was impacted by calpain inhibition in response to the particulate inflammasome activators (MSU and silica) but much lower in response to ATP or nigericin. This observation is in accordance with the observation by Gross et al. that particulate activators, but not nigericin and ATP, are able to induce IL-1 α secretion in a way partly independent of the inflammasome, but involving calcium influx and calpain activation (27).

Cellular senescence is characterized by the secretion of proinflammatory cytokines (senescence associated secretory phenotype or SASP) including for instance IL-1 α , IL-1 β , IL-6 or TNF-alpha. NF- κ B regulates the majority of genes that comprise the SASP (28) and NF- κ B has been demonstrated to drive aging in brain and to be required to enforce many features of aging in a tissue specific manner (29,30). We and other groups have previously evidenced that NF- κ B nuclear translocation and activity was reduced in cells and tissues from CalpTG mice (10,22). Here, genome-wide gene expression profiling revealed that cytokines whose synthesis is regulated by NF-

κ B and that are involved in innate immune response were effectively down-regulated in old calpTG mice in comparison to old controls.

Although IL-1 α is a potent cytokine whose role in kidney lesions and inflammaging is emerging, its expression is much lower than IL-1 β expression in vivo and difficult to assess (31). The in vivo model of MSU-induced peritonitis allowed to evidence that both IL-1 α and IL-1 β production was reduced at an early phase in calpTG mice, suggesting that calpains actually promote IL-1 α and IL-1 β synthesis in response to cellular stress in vivo.

The main limitation of our study is that despite clearly reduced features of aging in CalpTG mice, lifespan did not significantly differ between the 2 groups. This was due to an increased frequency of lymphoproliferative disorders in CalpTG mice. We have previously highlighted that calpain inhibition would exert both pro and antitumoral effects in CalpTG mice (32). In addition, we have evidenced that splenocytes from calpTG mice have an increased proliferative response to interleukin-2 signalling (11). The risk of cancer induced by long term calpain inhibition deserves further specific studies.

As a conclusion, we have evidenced that calpains are a key mediator of inflammaging, especially in the kidney tissue, and that their long-term specific inhibition decreases the impact of aging, markers of senescence including replicative senescence (telomere length) and inflammaging markers. Among the mechanisms involved, SASP-related cytokines production is clearly impacted by calpain inhibition. These results highlight the deleterious role of inflammaging in kidney and vascular lesions occurring with aging.

Concise methods

Calpastatin transgenic mice (CalpTG) were created and characterized in our laboratory (2). 40 CalpTG and WT mice on the same stable background were housed and bred together and sacrificed at 2 months or 2 years (n=10/group). In addition, a survival study including 50 mice has been performed. Cardiovascular remodeling, kidney tissue, brain and skin lesions have been assessed at 2 months and 2 years. Renal hemodynamics has been performed in 1 year old WT and CalpTG mice.

High-throughput mRNA analyses have been performed from 6 WT and 6 CalpTG mice kidney cortex at 2 years to assess molecular mechanisms involved in kidney aging.

Kidney tissue flow cytometry has been performed as recently described to analyze immune cell infiltrate in another set of four 2-months old and six 2-years old WT and CalpTG mice (33).

Macrophages have been isolated from the bone marrow of WT and CalpTG mice and exposed to various stimuli in vitro to assess IL-1 α and IL-1 β synthesis. A peritonitis model has been performed by performing intraperitoneal MSU injection to assess IL-1 α and IL-1 β synthesis in 5 WT and 5 CalpTG mice in vivo.

Acknowledgements

This work has been supported by the french society of Nephrology (Société de Néphrologie-SFNDT)-Amgen 2011 grant and by the Fondation du Rein-prix jeune chercheur.

Statement of competing financial interest

The authors declare no conflict of interest or competing financial interest

References

1. Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J: The calpain system. *Physiol Rev* 83: 731-801, 2003
2. Peltier J, Bellocq A, Perez J, Doublier S, Dubois YC, Haymann JP, Camussi G, Baud L: Calpain activation and secretion promote glomerular injury in experimental glomerulonephritis: evidence from calpastatin-transgenic mice. *J Am Soc Nephrol* 17: 3415-3423, 2006
3. Zafrani L, Gerotziafas G, Byrnes C, Hu X, Perez J, Lévi C, Placier S, Letavernier E, Leelahavanichkul A, Haymann JP, Elalamy I, Miller JL, Star RA, Yuen PS, Baud L: Calpastatin controls polymicrobial sepsis by limiting procoagulant microparticle release. *Am J Respir Crit Care Med* 185: 744-755, 2012
4. Wan F, Letavernier E, Le Saux CJ, Houssaini A, Abid S, Czibik G, Sawaki D, Marcos E, Dubois-Rande JL, Baud L, Adnot S, Derumeaux G, Gellen B: Calpastatin overexpression impairs postinfarct scar healing in mice by compromising reparative immune cell recruitment and activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 11: H1883-1893, 2015
5. Letavernier B, Zafrani L, Nassar D, Perez J, Levi C, Bellocq A, Mesnard L, Sachon E, Haymann JP, Aractingi S, Faussat AM, Baud L, Letavernier E: Calpains contribute to vascular repair in rapidly progressive form of glomerulonephritis: potential role of their externalization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32: 335-342, 2012
6. Lin YC, Brown K, Siebenlist U: Activation of NF-kappa B requires proteolysis of the inhibitor I kappa B-alpha: signal-induced phosphorylation of I kappa B-alpha alone does not release active NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 552-556, 1995
7. Kobayashi Y, Yamamoto K, Saido T, Kawasaki H, Oppenheim JJ, Matsushima K: Identification of calcium-activated neutral protease as a processing enzyme of human interleukin 1 alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 14: 5548-5552, 1990
8. Nuzzi PA, Senetar MA, Huttenlocher A: Asymmetric localization of calpain 2 during neutrophil chemotaxis. *Mol Biol Cell* 18: 795-805, 2007
9. Bellocq A, Doublier S, Suberville S, Perez J, Escoubet B, Fouqueray B, Puyol DR, Baud L: Somatostatin increases glucocorticoid binding and signaling in macrophages by blocking the calpain-specific cleavage of Hsp 90. *J Biol Chem* 274: 36891-36896, 1999

10. Letavernier E, Perez J, Bellocq A, Mesnard L, de Castro Keller A, Haymann JP, Baud L: Targeting the calpain/calpastatin system as a new strategy to prevent cardiovascular remodeling in angiotensin II-induced hypertension. *Circ Res* 102: 720-728, 2008
11. Letavernier E, Dansou B, Lochner M, Perez J, Bellocq A, Lindenmeyer MT, Cohen CD, Haymann JP, Eberl G, Baud L: Critical role of the calpain/calpastatin balance in acute allograft rejection. *Eur J Immunol* 41: 473-484, 2011
12. Kamo T, Akazawa H, Komuro I: Pleiotropic Effects of Angiotensin II Receptor Signaling in Cardiovascular Homeostasis and Aging. *Int Heart J* 56: 249-254, 2015
13. Zatz M, Starling A: Calpains and disease. *N Engl J Med* 352: 2413-2423, 2005
14. Nixon RA: The calpains in aging and aging-related diseases. *Ageing Res Rev* 2: 407-418, 2003
15. Franceschi C, Campisi J. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases: *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 69 Suppl 1: S4-9, 2014
16. Orjalo AV, Bhaumik D, Gengler BK, Scott GK, Campisi J: Cell surface-bound IL-1alpha is an upstream regulator of the senescence-associated IL-6/IL-8 cytokine network. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 17031-17036, 2009
17. Manya H, Inomata M, Fujimori T, Dohmae N, Sato Y, Takio K, Nabeshima Y, Endo T: Klotho protein deficiency leads to overactivation of mu-calpain. *J Biol Chem* 277: 35503-35508, 2002
18. Trinchese F, Fa' M, Liu S, Zhang H, Hidalgo A, Schmidt SD, Yamaguchi H, Yoshii N, Mathews PM, Nixon RA, Arancio O: Inhibition of calpains improves memory and synaptic transmission in a mouse model of Alzheimer disease. *J Clin Invest* 118: 2796-2807, 2008
19. Rao MV, McBrayer MK, Campbell J, Kumar A, Hashim A, Sershen H, Stavrides PH, Ohno M, Hutton M, Nixon RA: Specific calpain inhibition by calpastatin prevents tauopathy and neurodegeneration and restores normal lifespan in tau P301L mice. *J Neurosci* 34: 9222-9234, 2014
20. Scalia R, Gong Y, Berzins B, Freund B, Feather D, Landesberg G, Mishra G: A novel role for calpain in the endothelial dysfunction induced by activation of angiotensin II type 1 receptor signaling. *Circ Res* 108: 1102-1111, 2011

21. Subramanian V, Uchida HA, Ijaz T, Moorlegghen JJ, Howatt DA, Balakrishnan A: Calpain inhibition attenuates angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysms and atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *J Cardiovasc Pharmacol* 59: 66-76, 2012
22. Howatt DA, Balakrishnan A, Moorlegghen JJ, Muniappan L, Rateri DL, Uchida HA, Takano J, Saido TC, Chishti AH, Baud L, Subramanian V: Leukocyte Calpain Deficiency Reduces Angiotensin II-Induced Inflammation and Atherosclerosis But Not Abdominal Aortic Aneurysms in Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 36: 835-845, 2016
23. Benigni A, Corna D, Zoja C, Sonzogno A, Latini R, Salio M, Conti S, Rottoli D, Longaretti L, Cassis P, Morigi M, Coffman TM, Remuzzi G: Disruption of the Ang II type 1 receptor promotes longevity in mice. *J Clin Invest* 119: 524-530, 2009
24. Ferder L, Inserra F, Romano L, Ercole L, Pszeny V: Decreased glomerulosclerosis in aging by angiotensin-converting enzyme inhibitors. *J Am Soc Nephrol* 5: 1147-1152, 1994
25. Basso N, Cini R, Pietrelli A, Ferder L, Terragno NA, Inserra F: Protective effect of long term angiotensin II inhibition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: H1351-1358, 2007
26. Gross O, Thomas CJ, Guarda G, Tschopp J: The inflammasome: an integrated view. *Immunol Rev* 243: 136-151, 2011
27. Gross O, Yazdi AS, Thomas CJ, Masin M, Heinz LX, Guarda G, Quadroni M, Drexler SK, Tschopp J: Inflammasome activators induce interleukin-1 α secretion via distinct pathways with differential requirement for the protease function of caspase-1. *Immunity* 36: 388-400, 2012
28. Freund A, Patil CK, Campisi J: p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. *EMBO J* 30: 1536-1548, 2011
29. Zhang G, Li J, Purkayastha S, Tang Y, Zhang H, Yin Y, Li B, Liu G, Cai D: Hypothalamic programming of systemic ageing involving IKK- β , NF- κ B and GnRH. *Nature* 497: 211-216, 2013
30. Adler AS, Sinha S, Kawahara TL, Zhang JY, Segal E, Chang HY: Motif module map reveals enforcement of aging by continual NF-kappaB activity. *Genes Dev* 21: 3244-3257, 2007
31. Anders HJ: Of Inflammasomes and Alarmins: IL-1 β and IL-1 α in Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol* 27: 2564-2575, 2016

32. Raimbourg Q, Perez J, Vandermeersch S, Prignon A, Hanouna G, Haymann JP, Baud L, Letavernier E: The calpain/calpastatin system has opposing roles in growth and metastatic dissemination of melanoma. *PLoS One* 8: e60469, 2013
33. Legouis D, Bataille A, Hertig A, Vandermeersch S, Simon N, Rondeau E, Galichon P: Ex vivo analysis of renal proximal tubular cells. *BMC Cell Biol* 16:12, 2015

Figure Legends

Figure 1. Calpastatin overexpression decreases calpain activity in aged mice

Western blots and quantitative PCR have been performed by using kidney cortex extracts from 2-months old (2mo) and 2 years old (2yr) wild type (WT) and CalpTG (TG) mice. There was no significant difference of calpain 1 expression in WT and CalpTG mice at 2 months or 2 years at the protein level (A-B, n=6/group) or at the RNA level (C, n=6/group). Similarly, calpain 2 expression did not differ between the 2 groups at the protein level (D-E, n=6/group) or at the mRNA level (n=6/group). We observed a non-significant trend toward increased calpastatin expression in CalpTG mice at 2 months or at 2 years (G-H, n=6/group, p=0.13 and 0,17 respectively). Mouse calpastatin mRNA expression did not differ among the different groups (I, n=6/group) and, as expected, only CalpTG mice expressed the transgenic calpastatin (L, n=6/group). Calpain activity is measured by the ratio of the 145 kDa specific breakdown product of spectrin A by calpains, indexed to the intact spectrin. Calpains activity was similar at 2 months but significantly decreased in 2-years old CalpTG mice in comparison to aged WT mice (K, *p<0.05, n=6/group).

Figure 2. Calpastatin overexpression protects against kidney aging

At 2 years, CalpTG (TG) mice kidney was less impacted by aging than WT mice bred in the same conditions (A,B). The number of glomeruli/field decreased in WT animals at 2 years (C, *p<0.05, n=10/group). By contrast, the number of glomeruli did not decrease significantly in CalpTG animals. At 2 years, kidneys were affected by glomerulosclerosis and enlarged glomeruli in WT animals, but these lesions were significantly less important in CalpTG mice (D, **p<0.01, n=10/group, magnification x200). Fibrosis quantification was assessed by sirius red morphometry under polarized light, revealing that at 2 years, interstitial fibrosis surface was reduced in CalpTG mice when compared to aged WT (E-G, ***p<0.001, n=10/group, magnification x200). Beta-galactosidase activity, a marker of senescence was dramatically reduced at 2 years in CalpTG mice (H-J, *p<0.05, n=5/group, magnification x200). p21, another classical marker of senescence was also less expressed in CalpTG animals at 2 years (K, *p<0.05, n=6/group). Kim-1, a marker of tubular injury increased significantly with aging only in WT mice (L, **p<0.01, n=6/group). Telomere shortening was significantly more important in WT mice at 2 years in comparison to

CalpTG animals (M, $**p < 0.01$, $n = 10/\text{group}$). The protection of telomeres in CalpTG mice could not be ascribed to increased telomerase activity (N, $n = 8/\text{group}$).

Figure 3. Calpastatin overexpression protects against cardiovascular aging

Mean media surface of interlobar arteries was significantly less increased in CalpTG (TG) mice at 2 years in comparison to WT mice (A,B,E, $**p < 0.01$, $n = 10/\text{group}$, magnification $\times 400$). Similarly, aorta remodelling was less important in CalpTG mice (C,D,F, $**p < 0.01$, $n = 10/\text{group}$, magnification $\times 200$). Heart weight increased with aging but less in CalpTG mice than in WT animals (G, $*p < 0.05$, $n = 10/\text{group}$). This increase in heart weight was due to cellular hypertrophy since the number of nuclei per field at $400\times$ magnification was significantly lower in WT in comparison to CalpTG mice (H, $***p < 0.001$, $n = 5/\text{group}$)

Figure 4. Genes differentially expressed in aged WT and CalpTG mice are related to inflammatory pathways

Heatmap representation of genes differentially expressed between old WT and CalpTG (TG) mice. Eighty-one renal-expressed transcripts have been found significantly differentially expressed between groups. Corresponding genes were represented using the Pheatmap R package, unsupervised clustering, Manhattan method (A, $n = 6/\text{group}$). Kegg and biocarta pathways found significantly enriched when comparing old WT and CalpTG mice (B). Pathways are immune related suggesting that large parts of difference observed are associated with inflammaging-related genes.

Figure 5. Calpastatin overexpression protects against kidney inflammaging

Kidney infiltration by F4/80+ macrophages was assessed first by immunohistochemistry, evidencing a significant increase with aging in WT mice only (A-C, $*p < 0.05$, $n = 8/\text{group}$, magnification $\times 400$). To improve immune cell quantification, tissue flow cytometry has been performed in another set of experiments to assess the CD45+(immune cells)/prominin+(proximal tubular cells) ratio, evidencing that immune cell infiltrate increased significantly in WT mice only (D-F, $*p < 0.05$, $n = 4-6/\text{group}$). The proportion of macrophages, including M1 CD11+ macrophages, and lymphocytes was significantly increased in old WT mice kidneys only (G,H,I $*p < 0.05$, $n = 4-6/\text{group}$). Nevertheless, the proportion of M1 macrophages was similar in both WT and CalpTG

kidneys (J, n=4-6/group). IL-1 α expression was very faint in kidney tissue but significantly higher at 2 years in WT mice kidneys when compared to young mice kidneys (K, *p<0.05, n=6/group). IL-1 β was quantitatively more expressed but its expression differed significantly only between aged WT and young CalpTG (TG) (L, *p<0.05, n=6/group).

Figure 6. Calpastatin overexpression inhibits IL-1 α and IL-1 β synthesis in vitro and in vivo.

In vitro, macrophages isolated from WT and CalpTG (TG) mice bones have been exposed to sodium urate crystals (MSU), Silica crystals (Si.), Adenosine TriPhosphate (ATP) or Nigericin (Niger.), with or without priming by Lipopolysaccharides (LPS). IL-1 α and IL-1 β expression at the mRNA level was globally reduced (ANOVA) by calpastatin overexpression (A,B, n=4/condition). Similarly, IL-1 α and IL-1 β cytokine production by macrophages was also globally reduced by calpastatin overexpression, especially IL-1 α synthesis after exposure to particulate inflammasome activators MSU and Si. (C,D *p<0.05, **p<0.01 (post test), n=4/condition).

In vivo, MSU crystals have been injected to WT and CalpTG (TG) mice intraperitoneally. IL-1 α and IL-1 β cytokines have been measured early (3hours) in the peritoneal fluid, their synthesis was dramatically reduced in CalpTG mice (E,F, **p<0.01, n=5/group).

Figure 1

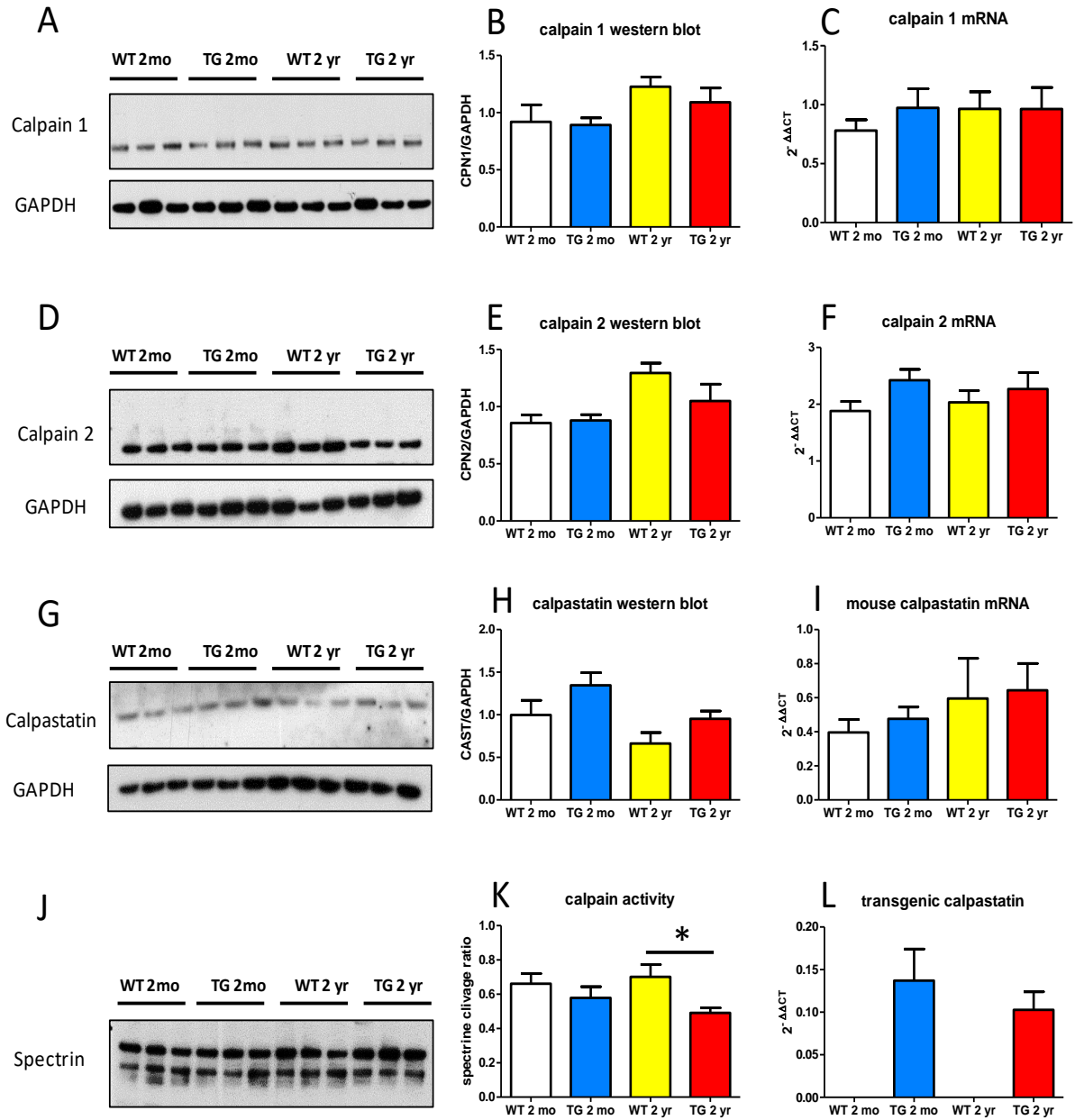


Figure 2

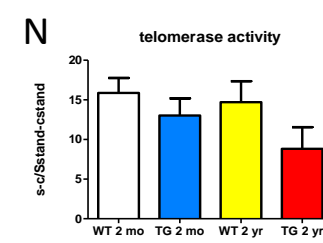
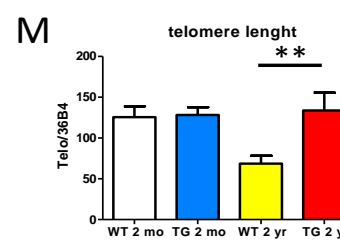
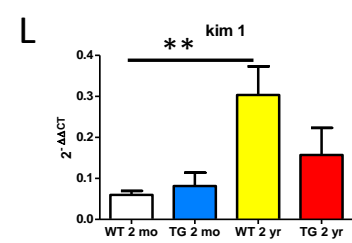
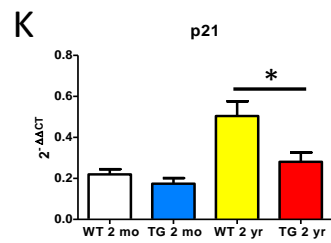
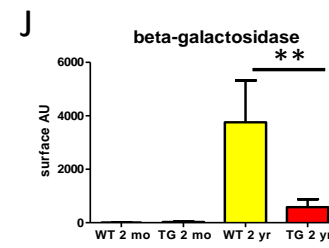
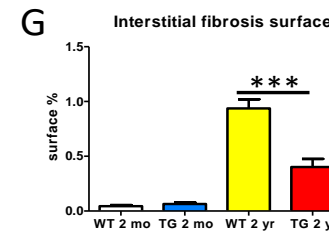
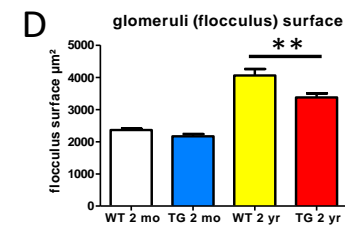
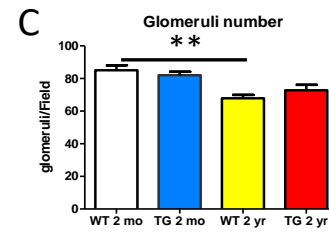
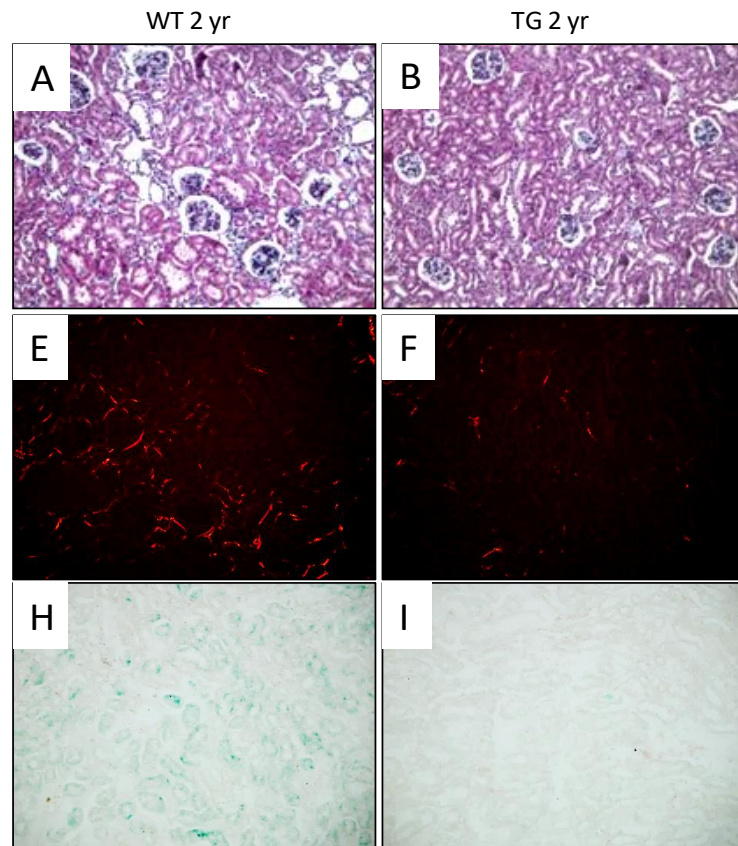


Figure 3

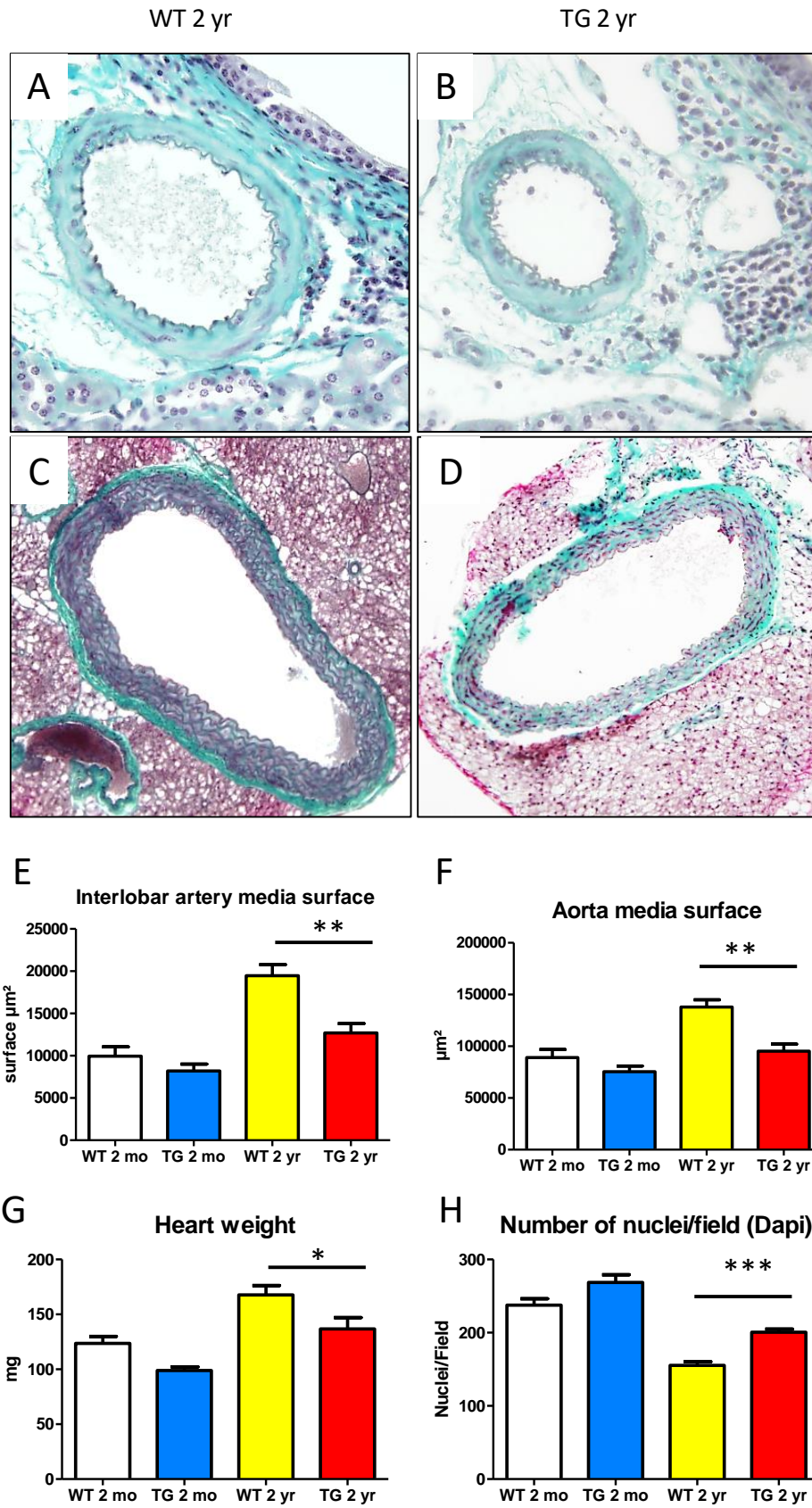
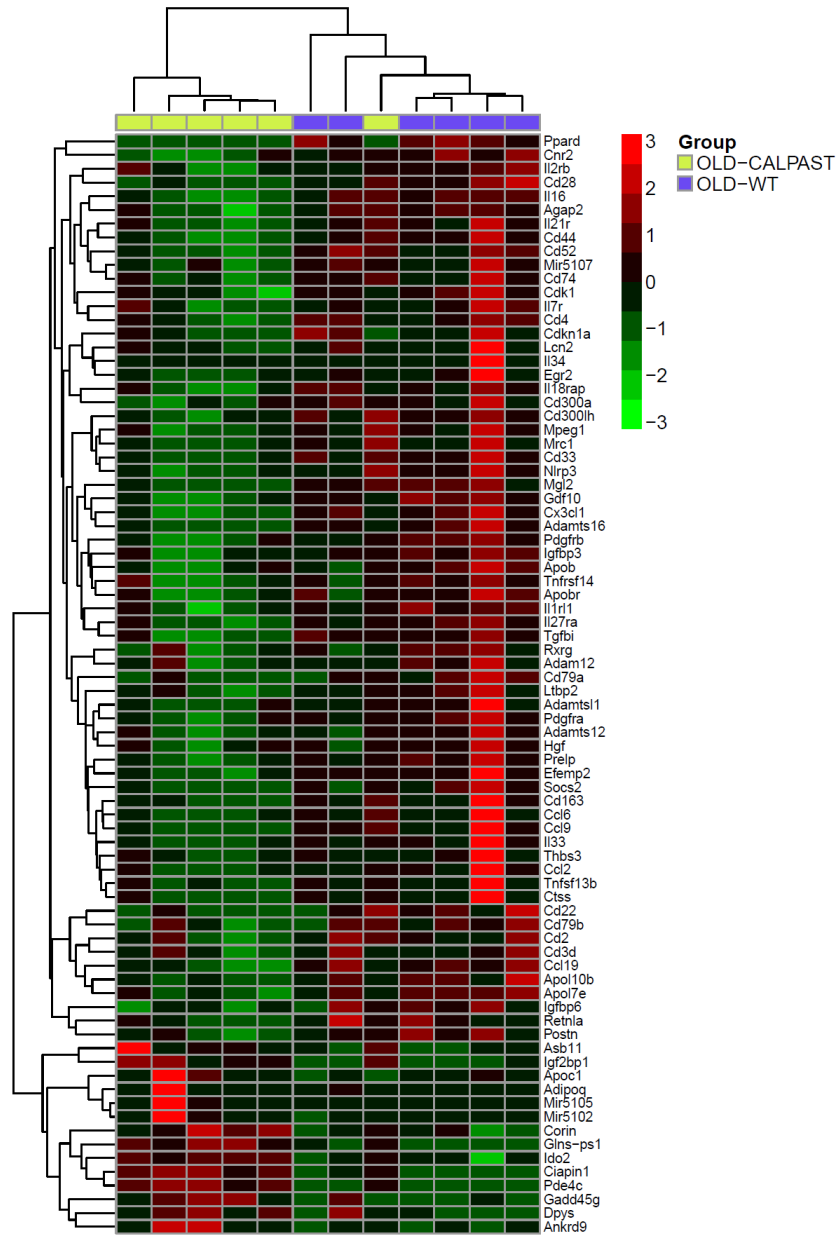


Figure 4

A



B

Category	Term	Genes	Count %	P-Value	Benjamini
KEGG_PATHWAY	Cytokine-cytokine receptor interaction	14	18.2	4.7E-9	2.6E-7
KEGG_PATHWAY	Hematopoietic cell lineage	7	9.1	2.1E-5	5.9E-4
KEGG_PATHWAY	Primary immunodeficiency	4	5.2	1.9E-3	3.5E-2
BIOCARTA	T Helper Cell Surface Molecules	4	5.2	9.9E-4	6.2E-2
BIOCARTA	HIV Induced T Cell Apoptosis RT	3	3.9	1.0E-2	2.8E-1
BIOCARTA	T Cytotoxic Cell Surface Molecules	3	3.9	1.8E-2	3.3E-1
BIOCARTA	IL 17 Signaling Pathway	3	3.9	2.1E-2	2.9E-1
BIOCARTA	B Cell Receptor Complex	2	2.6	3.6E-2	2.9E-1

Figure 5

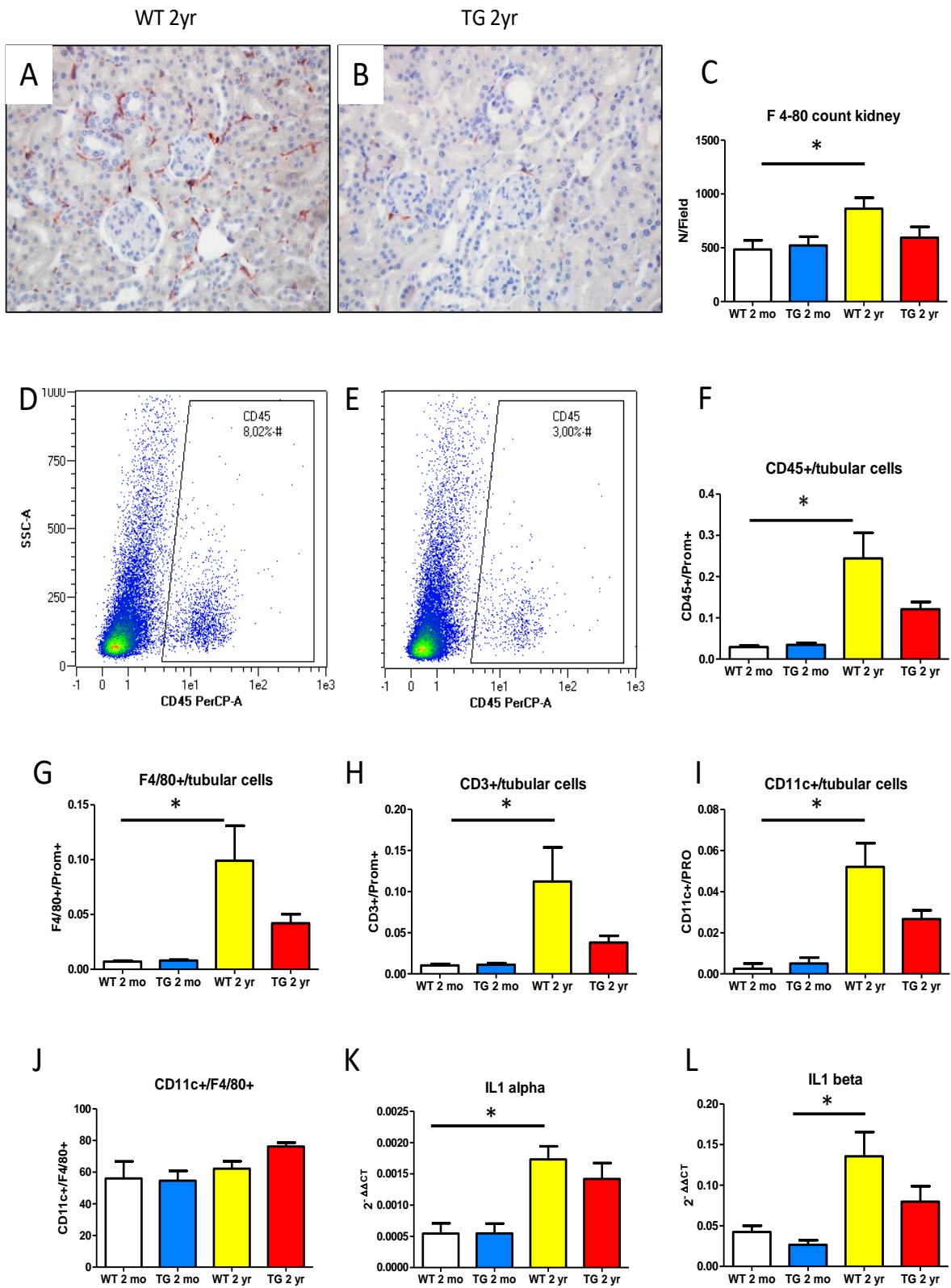
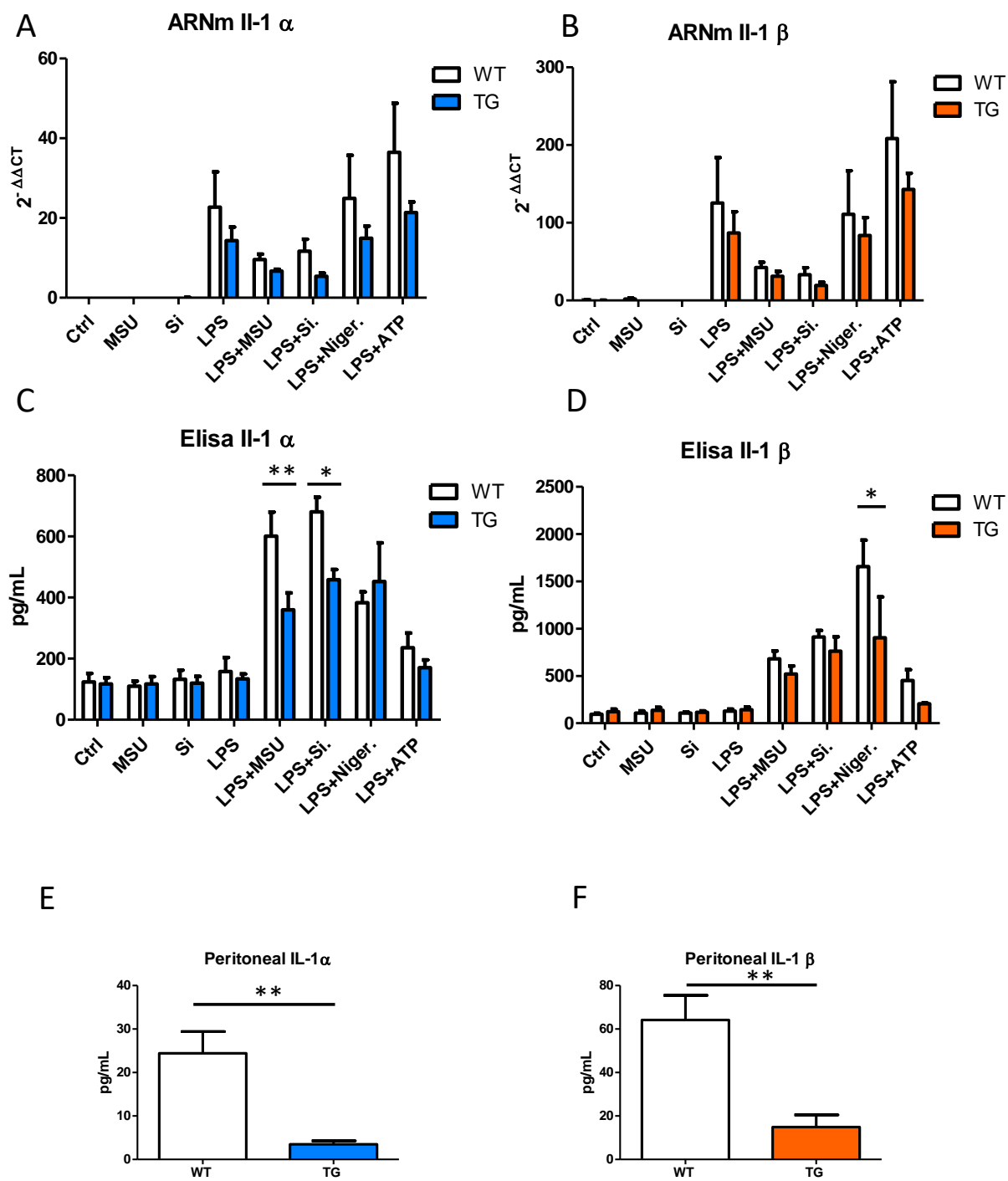


Figure 6



Supplemental data

Expanded Material and Methods

Mice. Studies were conducted in females Calpastatin-overexpressing mice (CalpTG) and control mice (WT) on a C57/bl6 background, bred and housed in similar conditions in a pathogen free zone. These mice were created and characterized in our laboratory. All procedures involving mice were conducted in accordance with national guidelines, institutional policies, local ethical committee and Research Ministry (reference number: Ce5/2012/00686.01). Mice were housed in constant temperature room with a 12h dark/light cycle and fed *ad libitum* on standard mouse chow. In a first study, 35 CalpTG and 35 WT mice have been bred and housed together. At two years, 10 mice from each group have been randomized and sacrificed to perform tissue analysis. The 50 other mice were used to perform a survival study. Some of these mice, in the calpTG group, developed distorted abdomen due to splenic lymphoma and were about to die: these animals have been sacrificed in accordance with ethical guidelines but were not excluded from the survival analyses. All other mice participating in the survival study died spontaneously. Ten CalpTG and 10 WT mice bred in similar conditions have been sacrificed at 2 months (“young” groups). In a second step, 10 CalpTG and 10 WT female mice have been bred and housed in similar conditions for one year to perform hemodynamic studies at 12 months. At last, a specific set of 6 CalpTG and 6 WT female mice has been bred together and sacrificed at 2 years to perform kidney flow cytometry tissue analysis, and four 2-months old CalpTG and WT mice have been used as “young” controls.

Monosodium urate (MSU) induced peritonitis model. MSU crystals were prepared with 500 ml of boiling water and 2g of uric acid (U2625, Sigma Aldrich). pH solution was maintained at 8 by adding NaOH (1M). Solution was cooled and kept 24 hours during crystals formation. Crystals were filtered in 100 μ m sieve before washing in ethanol and warm sterilization. Peritonitis was induced in 8-weeks old WT and CalpTG females by intraperitoneal (I.P.) injection of 3 mg MSU diluted in 0.5 ml PBS. After 3 hours, peritoneal cavity was flushed with 3 ml PBS heparin for 3 mn. Peritoneal fluid was centrifugated at 4°C and supernatant has been analyzed by ELISA for Interleukine 1 α (Il-1 α) and β (Il-1 β) (MLA00, MLB00C, R&D systems).

Renal tubular cell culture. kidney fragments from WT or CalpTG mouse have been incubated in 1mg/ml collagenase 1 solution (Gibco, Life technologies) for 3 mn at 37°C. Tissue was passed in 100 μ m and 40 μ m sieves to collect renal tubular cells. Cells were grown in a specific medium to promote tubular cells growth and differentiation containing HAM's F12 and DMEM medium, insulin 5 μ g/ml (I1882, Sigma), dexamethasone 5.10⁻⁸M (D8893, Sigma), selenium 60 nM (S913, Sigma), transferrin 5 μ g/mL (T1428, Sigma), triiodothyronine 10⁻⁹M (T5516, Sigma), EGF from

mouse 10 ng/mL (E4127, Sigma), HEPES 20mM (15630-056, GIBCO), Glutamine 2mM (25030024, Gibco), 2% Fetal calf serum (Invitrogen), and 0.5 % D-Glucose (Sigma).

Bone marrow derived macrophages (BMDM). Bone marrow cells from tibia, femur and humerus of donor mice (WT or CalpTG) were obtained after bones were flushed with 1 ml of PBS. Cells were passed through 70 μm sieve, treated with ACK and finally incubated for 7 to 10 days at 37°C in a medium containing HAM's F12 250ml, DMEM 250ml, decompemented fetal calf serum 10%, glutamine 200 mmol.l^{-1} and mouse recombinant M-CSF 10 ng.ml^{-1} (ML 416, R&D systems) to obtain adherent BMDM. BMDM were plated in 96 wells ($5.10^5.\text{ml}^{-1}$) and primed with 10 ng.ml^{-1} Lipopolysaccharides (LPS) from Escherichia coli 055:B5 (Sigma-Aldrich) during 3 hours and treated with inflammasome activators for 1 to 6 hours: MSU 300 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (Invivogen), silica particles 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (Invivogen), ATP 5 mmol.l^{-1} (Sigma-Aldrich) and Nigericin 5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ (Invivogen). Il-1 α and Il-1 β excretions were measured in cell supernatant by ELISA (MLA00, MLB00C, R&D systems). Cells mRNA has been collected using the RNeasy kit (Qiagen) according to manufacturer's instructions.

Histochemistry and morphometric analyses. Kidneys, heart, aorta, skin and spleen from mice of each group were immersed in AFA and formalin (formaldehyde 4%) solution or snap-frozen. After 24h in formalin solution, brains have been immersed in 20% sucrose solution for 24 hours and then frozen at -80°C. Formalin-fixed tissues were embedded in paraffin after conventional processing (alcohol dehydration), and 4- μm thick sections were stained with Masson trichromic solution, hematoxylin-eosin or sirius red in picric acid solution. Heart nuclei were stained with DAPI (Invitrogen, Thermofischer scientific, 1/2000) and cell count/surface was performed to assess myocardic hypertrophy by using an Image J software-based Macro. Perpendicular cross-sections at standardized distance from the renal hilus (0.3 mm) have been performed to measure kidney interlobar arteries media surface. Similarly, four sections of the thoracic descending aorta have been performed to assess the mean media surface for each animal. The number of glomeruli/field, the surface of all glomeruli, and urinary chamber have been measured in 10 renal cortex Masson-stained sections at 200x magnification. For each animal, the mean value has been considered. Kidney fibrosis has been assessed by measuring sirius red-stained surface under polarized light in 10 renal cortex sections at 200x magnification. For each animal, the mean value has been considered. All measures have been performed by using AnalySIS® software.

Beta-galactosidase activity. β -Galactosidase-related staining was performed on 10 μm unfixed kidney sections with Senescence β -Galactosidase Staining Kit according to manufacturer's

instructions (Cell signaling technology, #9860). Stained surface has been measured in 8 renal cortex sections at 200x magnification. For each animal, the mean value has been considered. All measures have been performed by using AnalySIS® software.

Immunohistochemistry and immunofluorescence. Four-micrometer-thick sections of paraffin-embedded kidneys were dewaxed, heated in citric acid solution and next incubated with antibodies. After blockade of endogenous peroxidase, sections were immunostained with a rat anti-F4/80 monoclonal antibody (MCA497GA, ABD Serotec, 1/2000). The mean cell count was performed on 10 sections at 400x magnification. Four-micrometer-thick cryostat sections were fixed with acetone for 7 min. After blockade of endogenous peroxidase, sections were stained with a mouse anti-CD3 monoclonal antibody (A0452, Dako, 1/200). The mean cell count was performed on 10 sections at 400x magnification. Immunostaining was revealed by specific Histofin (Nichirei Biosciences) and AEC (k34769, Dako) and counterstaining was performed with hematoxylin QS (Vector). An aqueous mounting media was used (Scytek laboratory).

Brains were cut into 10 μ m coronal sections after spotting of hypothalamus. Sections were rehydrated and then heated in pH6 citric acid bath. After blocking and permeabilization with PBS BSA 2% and Triton 0.1%, astrocytes were marked with a rabbit anti-GFAP polyclonal antibody (ab7260, Abcam, 1/2000), and secondary antibody Alexa Fluor 488 goat anti rabbit (A11008, Invitrogen, 1/1000). Nucleus was marked with DAPI (Invitrogen, Thermofischer scientific, 1/2000). Astrocytic process measures were performed on 6 stacks of images of hippocampus CA1 region for each mouse. Each stack was obtained by addition of photos at 600x magnification by using an Olympus ix83 microscope and CellSens Dimension software. Astrocytes morphometry was carried out with Image J software, using the plugin NeuronJ. The mean length of astrocytes processes was calculated for each mouse.

Tubular cells in culture were fixed with frozen methanol and permeabilized with PBS plus BSA 2% and triton 0.5% solution. Cells were marked with a rabbit anti-p21 monoclonal antibody (ab109199, Abcam, 1/200). Secondary antibody was Alexa Fluor 488 goat anti rabbit (A11008, Invitrogen, 1/1000). Nucleus was marked with DAPI (Invitrogen thermofischer scientific, 1/2000).

Autofluorescence. Lipofuscin deposits were analyzed in frozen skin tissue 4-micrometer thick sections by using autofluorescence lipofuscin properties at 500-640 nm wavelenghts.

Western blotting. Proteins from WT and CalpTG tissues were extracted in RIPA lysis buffer and protease inhibitor cocktail (1 μ g/ml, Sigma). After homogenization, the lysate was centrifuged at 1000 x g for 1h and the supernatant was frozen at -80°C. Protein concentration was measured using

the Bradford method. 20µg of protein was separated by electrophoresis on a Bis-Tris gel 4-12% (Novex, Thermofisher). After proteins were transferred onto PVDF membrane, aspecific sites were blocked in PBS Tween and 5% milk solution before incubation with primary antibody overnight at 4°C. Membrane was washed, then incubated for one hour with secondary antibody conjugated with peroxidase. ECL (RPN 3222, GE Healthcare life sciences) was applied 5mn on membrane for chemiluminescent reaction. Reaction was revealed on radiographic films (Films were scanned onGS-800 Calibrated Densitometer) or read in Syngen Pxi imager (Ozyme). Optical densities were measured using the software Image J or with GeneSys software (Ozyme). Primary antibodies used were mouse monoclonal antibody anti-spectrin alpha chain (nonerythroid) (MAB1622, Chemicon Millipore, 1/1000), rabbit polyclonal antibody anti-calpain 1 domain IV, (ab39170, Abcam, 1/4000), rabbit polyclonal antibody anti-calpain 2 amino terminal end domain I (ab 39167, Abcam, 1/2000), rabbit polyclonal antibody anti-GAPDH (G9545, Sigma Aldrich, 1/50000), anti-calpastatin goat polyclonal (SC-7560, Santa Cruz biotechnology, 1/100). Secondary antibodies used were anti mouse IgG antibody (NA931V, GE Healthcare, 1/10 000); anti rabbit IgG F (ab 1) 2 fragment antibody (NA9340V GE Healthcare, 1/4000), goat polyclonal antibody to rabbit Ig Secondary G-H & L (ab 6721, Abcam, 1/5000).

Renal hemodynamics. One-year old mice were anesthetized by pentobarbital sodium (50–60 mg/kg body weight intraperitoneally; Nembutal; Abbott, Chicago, IL) and moved to a servo-controlled table kept at 37 °C. The left femoral artery was catheterized for measurement of arterial pressure, and a femoral venous catheter was used for infusion of volume replacement. Bovine serum albumin (4.75 g/dl of saline solution) was infused initially at 50 µl/min to replace surgical losses, and then at 10 µl/min for maintenance. Arterial pressure was measured via a pressure transducer in left femoral artery (Statham P23 DB, Gould, Valley View, OH), and renal blood flow was measured by a flowmeter (0.5v probe; Transonic systems TS420, Ithaca, NY). To assess GFR, continuous injection of FITC-inulin infusion was performed at 1 mg.ml⁻¹ and urine and blood collections were performed every 15 mn after equilibration. Inulin was measured by fluorometric method. GFR was calculated by measuring renal clearance of inulin over 3 period of time (formula $U \times V / P$, U: urine concentration of inulin, P: plasma concentration of inulin and V: urine output).

Tissue flow cytometry. Two kidneys from WT and CalpTG, aged and young, mice were dissociated by using a gentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec). Tissue was then passed through a 30µm sieve. Cells were plated during 30 mn at 4°C with mouse Fc Block (Miltenyi Biotec). Antibodies were incubated during one hour at +4°C before analyses with flow cytometry MACSquant analyser (Miltenyi Biotec). Antibodies used were: mouse anti-CD45 PERCP (130-102-469, Miltenyi

Biotec), mouse anti-F4/80 PE (130-102-422, Miltenyi Biotec), mouse anti-CD11c APC (17-0114, eBioscience), mouse anti-CD45 vioblue (130-102-430, Miltenyi Biotec), mouse anti-CD3 Violetfluor 450 (75-0032, Tonbo biosciences), mouse anti-Prominin1 APC (130-092-335, Miltenyi Biotec). Results are expressed as ratio of immune cells/tubular cells (prominin1 positive cells).

Quantitative RT-PCR. mRNA from kidney cortex was extracted using the RNeasy kit (Qiagen) according to manufacturer's instructions. RNA concentration was measured by using NanoDrop1000 spectrophotometer (ThermoScientific). RNA were reverse transcribed using Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermoscientific) and PCR was performed using SYBR green and specific primers on a light cycler 480 (Roche). Expression levels were normalized to the house keeping gene GusB (beta-glucuronidase) or 18S using lightcycler advanced relative quantification program (Roche). Primers used were from eurogentec: Rabbit Cast s: AGCCAGCAAGTCGCTCAG and as: CCATCTCTTTGCTGATTGGAA , mouse Cast s: TCGCAAGTTGGTGGTACAAG and as: CTCCCAAAGTTGCTGCTT, mouse Calpn1 s: AGTGGAAGGACCTGGAGT and as: TCTCGTTCATAGGGGTCCAC, mouse Calpn2 s: TGGCTTCGGCATCTATGAG and as: AAGTTTTTGCCGAGGTGGAT, mouse IL1 alpha s: TTGGTTAAATGACCTGCAACA and as: GAGCGCTCACGAACAGTTG, mouse IL1 beta s: TGTAATGAAAGACGGCACACC and as: TCTTCTTTGGGTATTGCTTGG, mouse p21 var1/2 s: TGCCTTGGAGTGATAGAAA and as: AACATCTCAGGGCCGAAA, mouse GusB s: CTCTGGTGGCCTTACCTGAT and as: CAGTTGTTGTCACCTTCACCTC, mouse 18S s: AAGCATTCTGAAATTGGCTCA and as: GTCTCAATCCAGAATGATCAGGT.

Measure of telomere length by quantitative PCR and telomerase activity. Genomic DNA was extracted from 25 mg renal cortex, skin, heart or tubular cells on column DNeasy blood and tissue kit (Qiagen). DNA quality was verified on Nanodrop 1000 (ThermoScientific). Amplification of genomic telomeres present in DNA was realized in a Light Cycler 480 (Roche) using SYBR green and 2.5 pmol of each specific probe: s CGGTTTGGTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTT, as GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCT, or of a domestic gene, here 36B4 s ACTGGTCTAGGACCCGAGAAG, as TCCACCTTGTCTCCAGTCT. Denaturation of 5 mn at 95°C was followed by 30 cycles of development for heart and kidney extracts or 35 cycles for skin extracts. Every cycle consisted of 3 stages (denaturation 15 seconds in 95°C, hybridization 20 seconds in 52°C for telomeres or 56°C for 36B4, strain 15 seconds in 72°C). Fluorescence was measured at the end of every cycle. After an exponential phase, obtaining of a tray at the end of PCR allowed to calculate a cycle threshold (Ct) for every target DNA, reflection of their initial

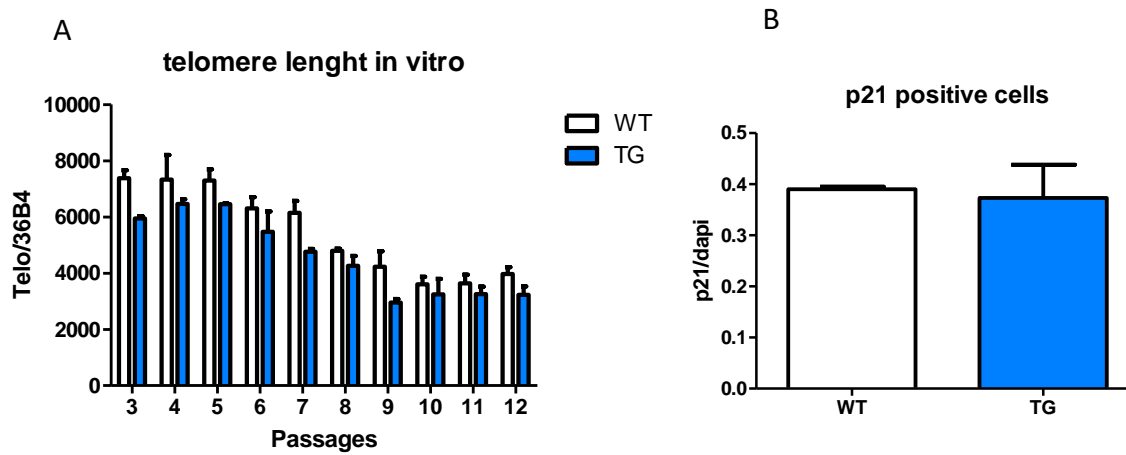
quantity. Finally, the specificity of PCR product was verified thanks to the curve of fusion realized at the end of PCR. Telomerase activity in kidney was performed with the Telotaggg PCR ELISA kit according to manufacturer's instructions (12209136001, Roche).

High throughput RNA-Sequencing from mouse renal cortex, differential expression and pathway analysis. RNA samples from kidney cortex coming from either old C57BL6J (n = 6) or Calpastatin transgenic (CalpTG) mice (n = 6) of high quality (RNA Integrity Number >6) were processed to create mRNA libraries using TrueSeq reagents (Illumina, san diego, California). Clusters were created for Illumina RNA-Sequencing using a CBot system and sequencing was carried out on 2 lanes of HiSeq2000 to produce paired-end reads (75 bases length, 29 to 35 millions of reads per sample) and organized per lane to avoid sequencing batch effects. After demultiplexing, bar-coding removal, quality control, paired-end reads were processed from Fastq Sanger format to compact-reads format and then align with STAR (default parameters) to the mouse reference genome (mGC37/mm9). Data alignment and analysis were performed using the GobyWeb interface using Ensembl version 55. Differential expression was computed using the EdgeR package from bioconductor. Data were also examined visually in the Integrative Genomic Viewer (<http://www.broadinstitute.org/igv/>) respective of Ensembl Annotation (Ensembl version 55) (Anders et al., 2013; Dorff et al., 2013; Robinson et al., 2010). Normalized gene expression level was measured by counts per millions (CPM). Genes that were significantly differentially expressed (DE) between groups (WT vs. CalpT $q < 0.05$, Edge R P-value adjusted for multiple testing with the Benjamini Hochberg approach) were next selected by their Fold change $|\text{LogFC}| > 1.2$ to build heatmap (R package Pheatmap) and pathway using David 6.8 available at <https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>.

Statistical analyses. Data are expressed as mean \pm SEM. The results were analyzed by non parametric Mann-Whitney and Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparison test, with the exception of flow cytometry analyses and interleukin-1 dosages which have been analysed by ANOVA and Bonferroni post tests. Results with $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Supplementary Figures and Figure Legends

Supplementary Figure 1

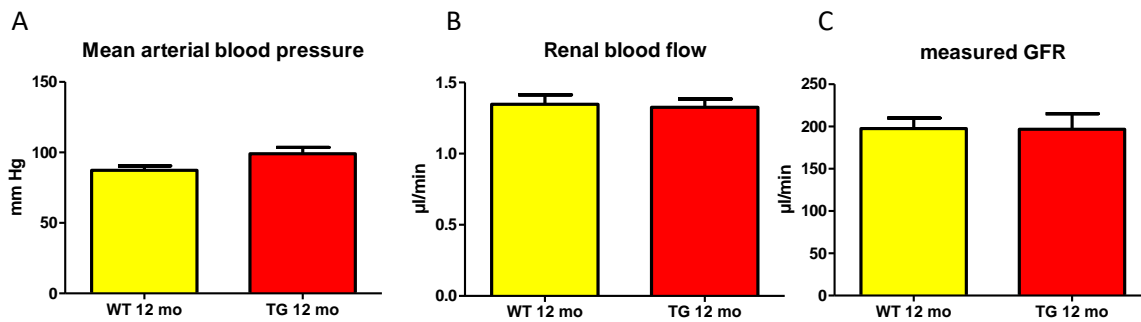


Supplementary Figure 1

Calpastatin overexpression in tubular cells in vitro does not protect against aging

Prominin positive proximal tubular cells have been isolated by flow cytometry and cultured during 5 months. After 12 passages, telomere length decreased similarly in cells from WT and CalpTG (TG) mice (A, n=3). In addition, after 6 passages, a similar proportion of WT and CalpTG cells expressed p21, a classical marker of senescence (B, n=3).

Supplementary Figure 2

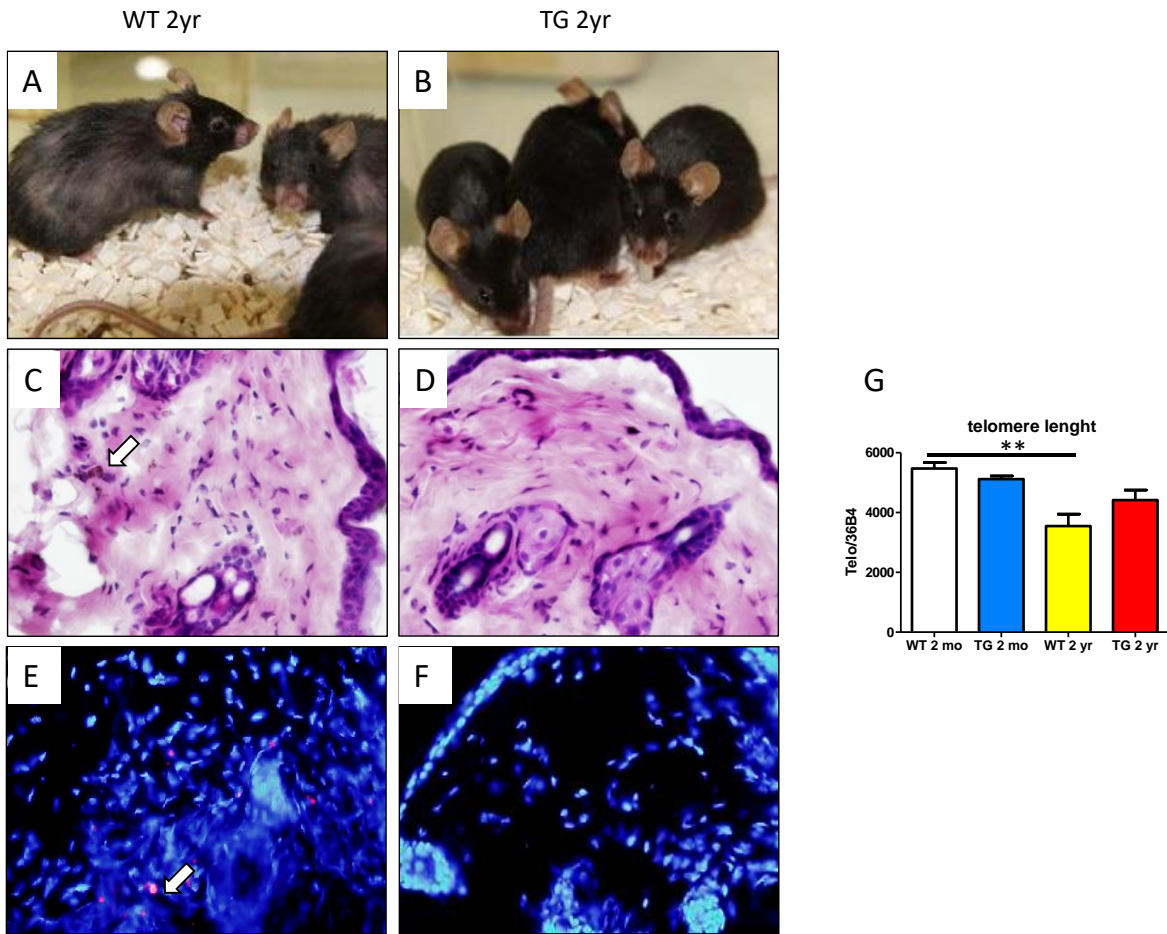


Supplementary Figure 2

Calpastatin overexpression does not impact hemodynamic or renal blood flow

At one year, blood pressure, renal blood flow and glomerular filtration rate (GFR) were similar in CalpTG (TG) and WT mice, evidencing that calpastatin does not protect kidney through hemodynamic improvement (A,B,C, n=6-10/group).

Supplementary Figure 3

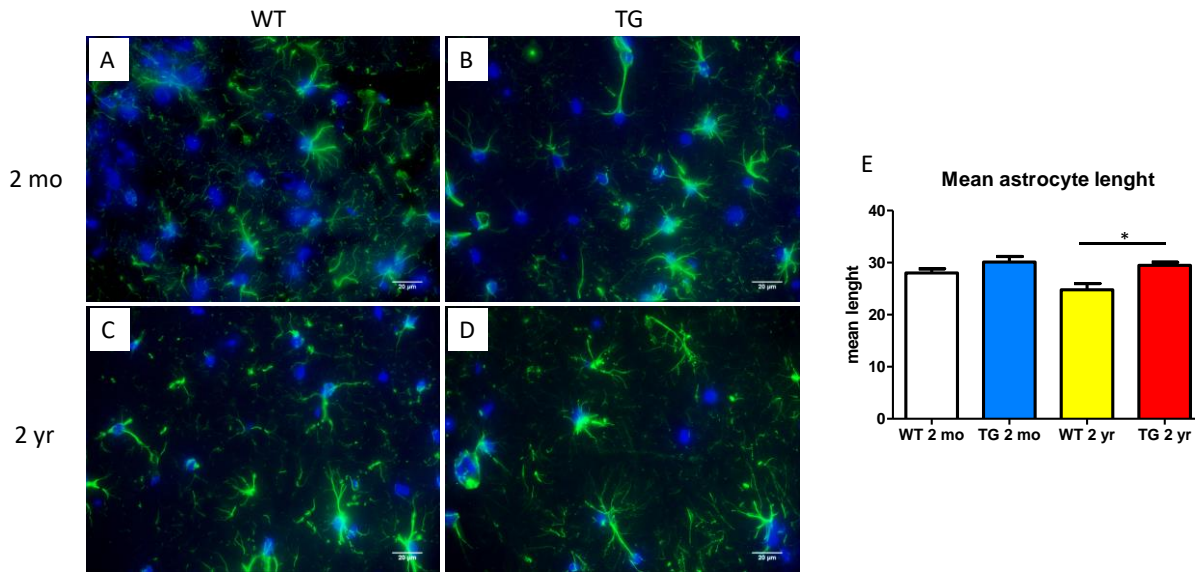


Supplementary Figure 3

Calpastatin overexpression protects against skin aging

At 2 years, CalpTG (TG) mice (B) were phenotypically less impacted by aging than WT mice bred in the same conditions (A). There was a macroscopic evidence that CalpTG (TG) mice fur was less affected by aging than WT mice. In addition, we observed less lipofuscin deposits in the skin after hematoxylin eosin staining (C,D, white arrow, magnification x200) or by using lipofuscin autofluorescent properties (E,F, white arrow, magnification x200). Moreover, telomere length decreased significantly in WT mice skin but not in CalpTG skin (G, $**p < 0.01$, $n = 10/\text{group}$).

Supplementary Figure 4

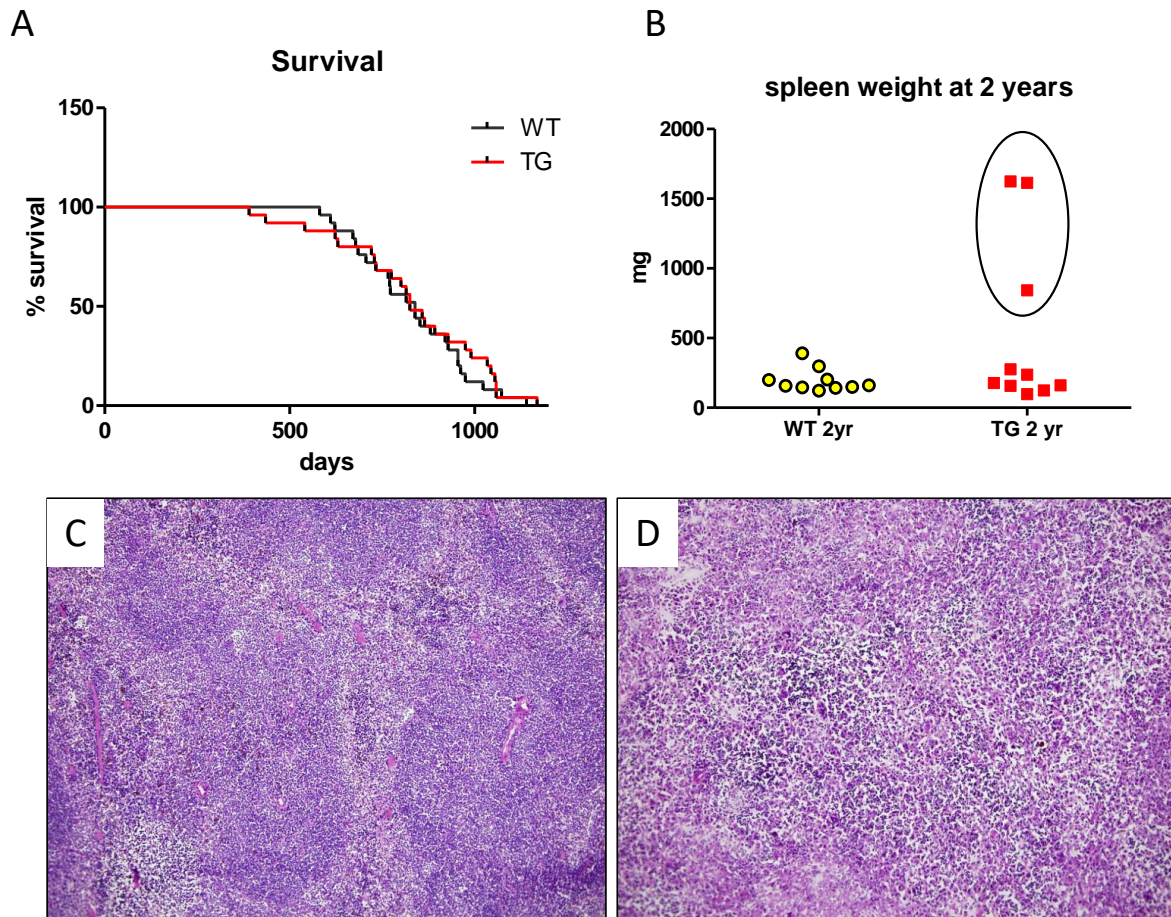


Supplementary Figure 4

Calpastatin overexpression protects against brain aging

The mean astrocytic length decreases with aging in the CA1 area of the hippocampus. This length was similar in 2-months old (2 mo) animals (A,B,E, magnification x600). Aged CalpTG (TG) mice were less affected by this decrease than 2 years (2 yr) old WT mice (C,D,E, * $p < 0.05$, $n = 6$ /group, magnification x600).

Supplementary Figure 5



Supplementary Figure 5

Calpastatin overexpression is associated to an increased frequency of spleen lymphoma

Most of CalpTG (TG) mice died with an abdominal distension due to a massive splenomegaly, there was no difference of survival rate between WT and CalpTG mice (A, n=25/group). Among the 10 CalpTG mice sacrificed at 2 years, 7 had an apparently normal spleen (B,C) but 3 were affected by splenic lymphoma, compressing abdominal organs and characterized by loss of lymphoid tissue architecture and lymphoid cells proliferation (B,D).

Travail 2 (préliminaire et en cours) :

Préliminaire

The Calpain/Calpastatin System Has Opposing Roles in Growth and Metastatic Dissemination of Melanoma

Quentin Raimbourg¹, Joëlle Perez¹, Sophie Vandermeersch¹, Aurélie Prignon², Guillaume Hanouna¹, Jean-Philippe Haymann³, Laurent Baud³, Emmanuel Letavernier^{3*}

1 Unité Mixte de Recherche 702 (UMR S 702), Université Pierre-et-Marie-Curie Paris VI et Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Hôpital Tenon, Paris, France, **2** Département de Médecine Nucléaire et Université Pierre-et-Marie-Curie Paris VI, Hôpital Tenon, Paris, France, **3** Unité Mixte de Recherche 702 (UMR S 702), Université Pierre-et-Marie-Curie Paris VI, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale et Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Hôpital Tenon, Paris, France

Abstract

Conventional calpains are ubiquitous cysteine proteases whose activity is promoted by calcium signaling and specifically limited by calpastatin. Calpain expression has been shown to be increased in human malignant cells, but the contribution of the calpain/calpastatin system in tumorigenesis remains unclear. It may play an important role in tumor cells themselves (cell growth, migration, and a contrario cell death) and/or in tumor niche (tissue infiltration by immune cells, neo-angiogenesis). In this study, we have used a mouse model of melanoma as a tool to gain further understanding of the role of calpains in tumor progression. To determine the respective importance of each target, we overexpressed calpastatin in tumor and/or host in isolation. Our data demonstrate that calpain inhibition in both tumor and host blunts tumor growth, while paradoxically increasing metastatic dissemination to regional lymph nodes. Specifically, calpain inhibition in melanoma cells limits tumor growth in vitro and in vivo but increases dissemination by amplifying cell resistance to apoptosis and accelerating migration process. Meanwhile, calpain inhibition restricted to host cells blunts tumor infiltration by immune cells and angiogenesis required for antitumor immunity, allowing tumor cells to escape tumor niche and disseminate. The development of highly specific calpain inhibitors with potential medical applications in cancer should take into account the opposing roles of the calpain/calpastatin system in initial tumor growth and subsequent metastatic dissemination.

Citation: Raimbourg Q, Perez J, Vandermeersch S, Prignon A, Hanouna G, et al. (2013) The Calpain/Calpastatin System Has Opposing Roles in Growth and Metastatic Dissemination of Melanoma. PLoS ONE 8(4): e60469. doi:10.1371/journal.pone.0060469

Editor: Fabrizio Mattei, Istituto Superiore di Sanità, Italy

Received: November 22, 2012; **Accepted:** February 26, 2013; **Published:** April 2, 2013

Copyright: © 2013 Raimbourg et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Quentin Raimbourg received grants from the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: emmanuel.letavernier@ttn.aphp.fr

Introduction

Calpains are ubiquitous cysteine proteases activated by calcium signaling and/or epidermal growth factor (EGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) [1–3]. The term “calpain” usually refers to “conventional” or “typical” μ - and m-calpains, which heterodimerize with calpain 4 or calpain small subunit 1 (Cssl), their regulatory subunit [1]. Other calpain isoform expression is limited and tissue-specific. Both m- and μ -calpain play essential roles in cellular homeostasis. For instance, they promote cell motility by modulating cytoskeleton organization through limited proteolysis, increase inflammation by facilitating NF- κ B activation and leukocyte diapedesis, or promote angiogenesis through various mechanisms [4–9]. A dramatic activation of calpain results in cell death by apoptosis and necrosis [10,11]. Calpain intracellular activity is however limited by their specific and ubiquitous inhibitor calpastatin [1]. Although calpain does not conform to a consensus cleavage site but recognizes a broad spectrum of PEST sequences, μ - and m-isoforms share a similar catalytic site and have redundant substrates in cells. Actually, targeted disruption of *Capn1* gene encoding μ -calpain does not result in any phenotype in mice, with the exception of platelet dysfunction, whereas targeted disruption of *Capns1* gene encoding

Cssl is lethal [12,13]. By contrast, mice knock out (KO) for *Capn2* gene encoding m-calpain are not viable from an embryonic stage but the underlying mechanisms remain mysterious [14].

The contribution of the calpain/calpastatin system in tumorigenesis remains unclear [15]. First, conventional calpain expression has been shown to be increased in human malignant cells, such as breast cancer, schwannoma, meningioma or colorectal cancer [16–18]. Expression levels of μ -calpain and Cssl correlate with renal cell carcinoma malignancy and hepatocarcinoma invasiveness, respectively [19,20]. In parallel, the calpastatin expression is increased in endometrial cancer [21]. Tissue-specific calpain isoforms may also be implied in some tumor development. Calpain 9 expression is decreased in gastric cancer, deletion of *CAPN9* gene encoding calpain 9 promotes the onset of malignant fibroblasts in culture, and *CAPN10* gene is involved in digestive and laryngeal cancers [22–24]. Interestingly, splicing variants of calpain 3, the muscle-specific isoform, are expressed in melanoma cells and their expression is downregulated in highly aggressive lesions [25].

Calpains may exert opposing roles in tumor progression. On the one hand, calpain activation could promote oncogenesis. Calpains degrade tumor suppressors such as p53 or the *NF2* gene product

Merlin [17,26]. Both μ - and m -calpains cleave $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ in a specific PEST sequence, allowing NF- κB translocation into nucleus, thus promoting cell survival [7]. Calpains are also essential for cytoskeleton reorganization and therefore promote cell migration and invasiveness, which are essential features of tumor cells [27]. Moreover, calpains are essential for VEGF-response and angiogenesis and could therefore promote tumor vascularization [3,8,9]. On the other hand, calpains may also exert protective effects against cancer. Calpains interfere with the Wnt/ β -catenin pathway by degrading β -catenin in the cytoplasm, thus limiting the transcription of genes involved in cancer [28]. Calpains activate caspases, particularly caspase 7, inducing cell apoptosis [29]. They also cleave Bcl-2, leading to BAX translocation into mitochondria, or degrade c-fos, c-jun, cain/cabin 1 what results in cell death [30–32]. Calpains perform a limited proteolysis of apoptosis-inducing factor (AIF), promoting its mitochondrial release and resulting in apoptosis/necroptosis [33]. In addition, calpains could be an important link between apoptosis and (macro-)autophagy, a process removing damaged proteins and organelles from cells. Autophagy acts either as a promoter or an inhibitor of tumorigenesis depending on tumor type or stage, suggesting that calpains could be either pro- or anti-tumoral according to the context [34]. At last, we have previously shown that μ - and m -calpain are highly expressed in T-cells and play an important role in allograft rejection [35]. Since immunity is essential to control malignant tumors, it may be hypothesized that calpains are involved in immunologic response against tumor cells.

Thus, in this study, we have used a mouse model of melanoma as a tool to gain further understanding of the role of calpains in tumor progression. Since specificity of available calpain inhibitors remains questionable, we compared melanoma progression in wild type (WT) mice and transgenic mice overexpressing calpastatin (CalpTG), which specifically inhibits both conventional isoforms [9,35–38]. Calpains are critically involved in tumor promotion and progression by targeting tumor cells themselves (oncogenesis, growth, migration, death) and/or tumor niche (immune response, proangiogenic events). To determine the respective importance of each target, we then overexpressed calpastatin in tumor or host in isolation, by using a melanoma cell line from the same C57BL/6 genetic background than tumor bearing mice. Our data demonstrate that calpain inhibition actually increases melanoma dissemination, mainly by decreasing apoptosis and increasing mobility of melanoma cells while limiting markedly infiltration of immune cells in tumor niche.

Results

Calpastatin transgene expression limits melanoma growth

To determine the role of calpains in melanoma progression, we subcutaneously implanted WT and CalpTG mice with the highly metastatic mouse melanoma cell line B16-F10. We took advantage that this cell line shares the same C57BL/6 background than WT and CalpTG mice, avoiding bias due to allograft immune reactivity. Calpain expression and activity in WT and CalpTG mice have been previously characterized [36]. Here, we characterized calpain isoforms transcripts *in vitro* in B16-F10 cells by quantitative polymerase chain reaction (qPCR). *Capn 6* and *7* isoforms transcripts were detected at significant levels but not *Capn 3, 8, 9, 10, 11, 12* and *13* transcripts. *Capn1*, *Capn2* and *Capns* transcripts, coding for calpains μ , m and the common regulatory sub-unit *Cssl* respectively, were abundant, especially *Capn2* transcript. *Cast* gene transcript coding for calpastatin was also expressed in B16-F10 (Figure 1A). Overall, the respective levels of

calpains transcripts in B16-F10 cells were similar to those observed in mice tissues such as kidneys (not shown). Spontaneous calpain activity in B16-F10 cells was high when compared to non-malignant cell lines (not shown). In order to inhibit this activity, a stable transfection of the same calpastatin transgene previously used to create transgenic mice was performed. Transfected melanoma cells (Calpast-Mel) expressed the rabbit calpastatin transgene (Figures 1B and 1C). Compared to control cells transfected with an empty vector (Ctrl-Mel), calpain activity in these cells was significantly limited as assessed by measuring both *in vitro* the cleavage of a fluorescent substrate and *in vivo* the accumulation of α -spectrin breakdown products (Figures 1D-F).

In a first study, we compared 10 WT mice receiving control melanoma cells (WT/Ctrl-Mel) and 10 CalpTG mice injected with transgenic melanoma cells (TG/Calpast-Mel). Primary tumor size was analyzed from day 9 to day 16 after cell injection and their weight was measured on the day of the sacrifice. Tumor growth was significantly reduced in TG/Calpast-Mel as compared to WT/Ctrl-Mel ($p < 0.01$, $n = 10/\text{group}$ Figure 2A). At day 16, there was a trend toward a lower tumor weight in the TG/Calpast-Mel group as compared to the WT/Ctrl-Mel group (1.7 ± 0.3 vs 3.2 ± 0.8 g, $n = 10/\text{group}$, $p = \text{NS}$ Figure 2B). There was a trend toward less vascular density in the TG/Calpast-Mel group (9.2 ± 0.5 vs 12.2 ± 1.4 vessels/HPF, $p = 0.06$, $n = 10/\text{group}$, Figure 2C). CD3 infiltrate was significantly reduced in TG/Calpast-Mel mice ($p = 0.03$, $n = 10/\text{group}$, Figure 2D). In addition, CD4 and NK cell recruitment was significantly reduced in TG/Calpast-Mel animals ($p = 0.02$ and $p = 0.004$, respectively, $n = 10/\text{group}$, Figures 2E and 2F) and the reduction of CD8 cells in this group was particularly marked (0.7 ± 0.1 vs 5.2 ± 1.5 cells/HPF, $p = 0.0003$, $n = 10/\text{group}$, Figure 2G). Pathological examination revealed no metastasis in organs including lungs or liver at that time. Metastatic regional (axillary) lymph nodes were observed in 90% of TG/Calpast-Mel mice but only 40% of WT/Ctrl-Mel mice ($p = 0.057$, $n = 10/\text{group}$, Figure 2H). Collectively, these data suggest that calpain inhibition by calpastatin overexpression limits melanoma growth, vascularization, and immune cell infiltrate but paradoxically amplifies its dissemination to regional lymph nodes. Such opposing effects could be explained by different roles of calpains in tumor cells and host cells.

Calpastatin transgene expression restricted to melanoma cells limits primary tumor growth while increasing its dissemination to regional lymph nodes

Given the specific roles of calpains in tumor and tumor microenvironment, we analyzed first the importance of calpains in melanoma cells by injecting Ctrl-Mel or Calpast-Mel to WT mice. Tumor growth was significantly slower in animals injected with Calpast-Mel cells as compared to animals receiving Ctrl-Mel cells ($p < 0.01$, $n = 10/\text{group}$ Figure 3A), as well as tumor weight at day 16 (2.22 ± 0.28 vs 3.43 ± 0.49 g, respectively, $p = 0.03$, $n = 10/\text{group}$, Figure 3B). All the WT mice receiving Calpast-Mel cells exhibited metastatic regional lymph nodes whereas only 5/10 animals receiving control melanoma had metastatic regional lymph nodes ($p = 0.032$, $n = 10/\text{group}$, Figure 3C). We did not find any difference between the 2 groups in tumor vascular density (Figure 3D, $n = 10/\text{group}$) and in the number of infiltrating immune cells, including CD3, CD4, CD8, and NK cells (Figure 3E-H, $n = 10/\text{group}$).

To further define the mechanisms whereby the calpain/calpastatin system would modify tumor size and metastatic properties, we studied *in vitro* the influence of calpastatin transgene expression on cell proliferation, spontaneous or induced apoptosis, and migration. As assessed by measuring BrdU

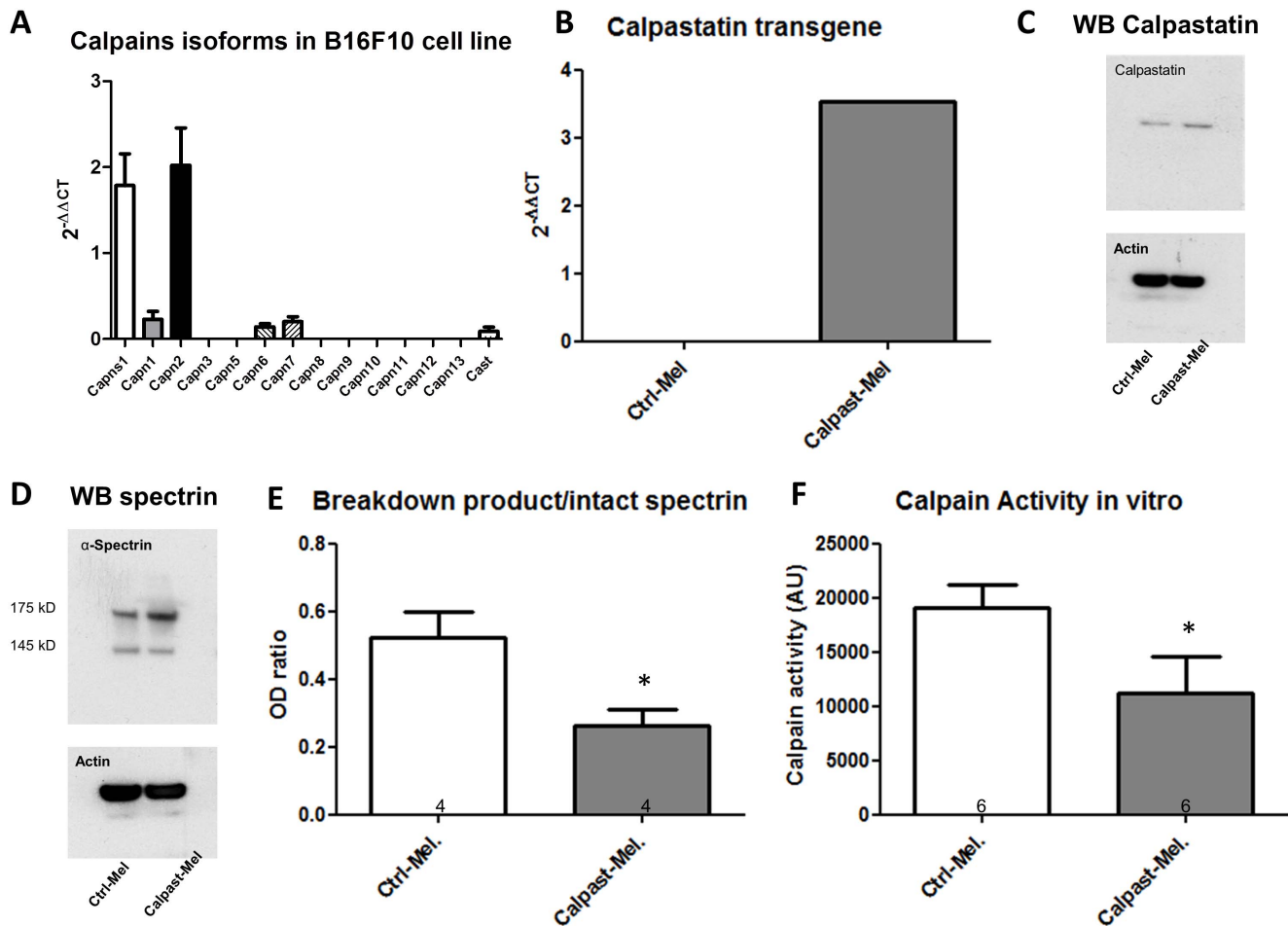


Figure 1. Calpain isoforms and calpastatin transgenic expression in B16-F10 cell line in culture. **A.** Calpain isoform transcripts were quantified by PCR. The most abundant was m calpain (*Cpn2*) followed by μ calpain transcript (*Cpn1*) and their common sub-unit calpain 4 transcript (*Cpn5*). Calpastatin transcript (*Cast1*) was also detected. Means and error bars correspond to 4 independent RNA extracts. *Gapdh* was the housekeeping gene used for normalization. **B.** Calpastatin rabbit transgene expression was assessed by quantitative PCR. Calpastatin transgene was stably and efficiently expressed in B16-F10 clone (Calpast-Mel) but not in control B16-F10 clones (Ctrl-Mel). **C.** Calpastatin expression was assessed by Western Blot. Calpastatin protein was overexpressed in Calpast-Mel clones. **D and E.** Spectrin intact form and calpain-dependent breakdown products were assessed by Western Blot and optical density measure (OD). Calpastatin overexpression (Calpast-Mel) decreased spectrin degradation by calpains. N = 4 independent experiments, * p < 0.05. **F.** Calpain activity in vitro was measured by specific substrate fluorescence. Calpain activity was decreased by calpastatin transgene. N = 6 independent experiments, * p < 0.05. doi:10.1371/journal.pone.0060469.g001

incorporation, proliferation of Calpast-Mel cells was decreased compared to Ctrl-Mel cells, consistent with our in vivo observation ($p = 0.028$, $n = 4$ experiments, Figure 4A). To assess whether calpastatin transgene in melanoma cells affects apoptosis, we measured propidium iodide-annexin V staining by flow cytometry. Apoptosis rate was very low in both cell lines in culture conditions. Apoptosis was therefore induced by a classical agent, mitomycin C. Interestingly, the decrease of calpain activity induced by calpastatin over-expression significantly reduced the apoptosis induced by mitomycin C ($p = 0.032$, $n = 5$ experiments, Figure 4B). To further examine the potential importance of this resistance to apoptosis in a more physiological model and to analyze the cytolytic potential of WT and CalpTG immune cells, we compared lymphocyte-mediated cytotoxicity against Calpast-Mel cells and Ctrl-Mel cells. To this aim, we immunized C57BL/6 WT and CalpTG mice against control B16F10 melanoma cells during 10 days. We next analyzed in vitro the cytolytic potential of their splenocytes against Calpast-Mel cells and Ctrl-Mel cells in a ⁵¹Cr-release assay. The cytotoxic effects of splenocytes from WT and

CalpTG mice were similar but significantly less marked on Calpast-Mel cells compared to Ctrl-Mel cells ($p = 0.018$, $n = 4$ experiments, Figure 4C). Surprisingly, calpastatin transgene increased melanoma cell migration properties, as evaluated in monolayer repair assay ($p = 0.026$ at 10 h, $n = 6$ experiments, Figures 4D and 4E). These results demonstrate that limiting calpain activity in melanoma cells is sufficient to blunt their proliferation while increasing their resistance to apoptosis and their mobility, thus facilitating metastatic dissemination.

Calpastatin transgene expression restricted to host cells increases mainly melanoma cell dissemination to regional lymph nodes

We and others have previously shown that calpain activity is reduced in tissues from CalpTG mice, including skin and immune cells [9,35–38]. To investigate the functional consequence of calpastatin transgene expression in host cells, Ctrl-Mel cells were injected subcutaneously in either WT or CalpTG mice. There was

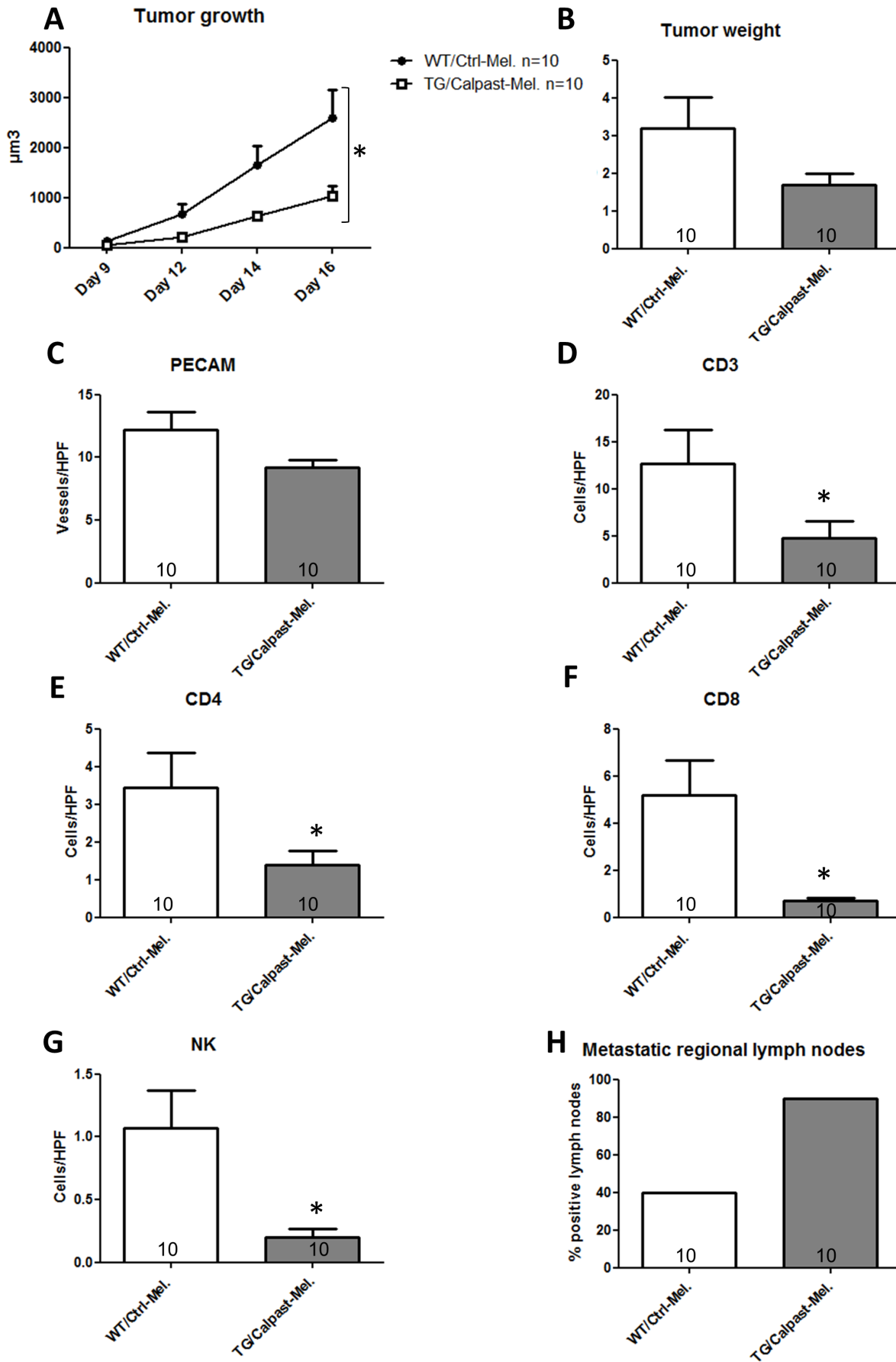


Figure 2. Inhibition of calpains in both host and melanoma cells (global inhibition). C57BL/6 control (WT mice) and transgenic mice (CalpTG mice) were injected with one million melanoma B16-F10 cells transfected with control plasmid (WT/Ctrl-Mel) and calpastatin plasmid (TG/Calpast-Mel) respectively. Mice were sacrificed at day 16 for tissue analysis. **A.** Tumor growth was measured from day 9 to day 16. Calpastatin overexpression in both hosts and melanoma decreased significantly tumor growth. $N=10/\text{group}$, $* p<0.05$. **B.** Tumor weight at day 16. Calpastatin overexpression in both hosts and melanoma decreased non-significantly tumor weight. $N=10/\text{group}$, $p=NS$. **C.** Angiogenesis assessed by vessel count at $200\times$ magnification after CD-31 staining. TG/Calpast-Mel mice had a trend to have less neo-angiogenesis than WT mice. $N=10/\text{group}$, $p=NS$. **D,E,F,G.** CD3, CD4, CD8 and NK cell number/HPF ($200\times$ magnification). Immune cell infiltrate was significantly lower in TG/calpast Mel mice than in WT/Ctrl mice. $N=10/\text{group}$, $* p<0.05$. **H.** Proportion of metastatic regional lymph nodes at day 16. TG/Calpast-Mel mice had a trend to have more metastatic lymph nodes than WT mice (9/10 vs 4/10 respectively, $p=NS$). doi:10.1371/journal.pone.0060469.g002

no difference in tumor size or weight between CalpTG and WT mice (Weight: 3.56 ± 0.50 and 3.61 ± 0.46 g, respectively, Figures 5A and 5B, $n=10/\text{group}$). Interestingly, CalpTG animals had a strong trend to have more metastatic regional lymph nodes compared to WT mice (90% vs 40%, $p=0.057$, Figure 5C, $n=10/\text{group}$). Neoangiogenesis was significantly decreased in CalpTG mice, the number of tumor vessels/HPF being 8.7 ± 0.9 as compared to 13.7 ± 1.7 in WT mice ($p=0.02$, Figures 5D-F, $n=10/\text{group}$). Immunostaining of tumors revealed significantly less tumor associated immune response in CalpTG animals as assessed by analyzing the number of CD3+, CD4+, CD8+ and NK cells (Figures 5G-J, $n=10/\text{group}$). However, calpain inhibition in CALP TG immune cells did not modify their *in vitro* cytolytic potential against melanoma cells (Figure 4C, $n=4$ experiments). Thus, the increase in metastatic regional lymph nodes in CalpTG mice may result mainly from a decrease of immune cell migration toward tumors, as we previously observed toward allograft in acute rejection process [35].

Survival Studies

Since calpain inhibition restricted to melanoma cells limits tumor growth but also increase melanoma cell resistance to apoptosis and dissemination toward lymph nodes, we analyzed the effect of calpastatin transgene expression in melanoma cells on mice survival. We did not observe any significant difference between the 2 groups (Figure 6A, $n=10/\text{group}$). Since calpain inhibition restricted to host cells limits angiogenesis but also immune cell infiltrate, we determined whether calpastatin transgene expression in host cells would modify mice survival. Once more, we did not evidence any significant difference between the 2 groups (Figure 6B, $n=10/\text{group}$).

Discussion

The role of calpains in tumor induction and progression has been addressed before [15–18]. Main studies report that calpains increase while calpastatin limits tumor dissemination [19,20,39]. In contrast, our results have indicated that the specific inhibition of calpains activity by calpastatin accelerates metastatic dissemination to regional lymph nodes. Our results were obtained by analyzing the progression of melanoma in WT and CalpTG mice injected subcutaneously with the highly metastatic B16-F10 cell line which shares the same C57BL/6 genetic background with tumor bearing mice. The design of our studies allows (i) to specifically inhibit calpain activity using calpastatin and (ii) for the first time, to discriminate the roles of the calpain/calpastatin system in tumor cells (growth, death, migration) and in host (angiogenesis, immune response).

As stated above, we have chosen to inhibit both μ - and m-calpain isoforms by overexpressing calpastatin, since they share similar catalytic sites. Although our study was not designed to focus on μ - and m-calpain specificities, several levels of evidence argue for a dominant role of m-calpain in tumor cell physiology. First, we observed that m-calpain transcript expression was much

higher than μ -calpain transcript one. Second, it has been shown that EGF-receptor signalling activates m-calpain rather than μ -calpain through MAP-kinase pathway [2]. It would be of interest to assess whether anti-oncogenic properties of EGF-R inhibitors are partly mediated by m-calpain repression. Third, m-calpain but not μ -calpain has been identified recently as a major actor of intrinsic or acquired resistance to chemotherapies in a colon cancer model, resulting in tumor growth through NF- κ B activation [40]. At last, a recent study evidenced that m-calpain specific inhibition by Si-RNA in a mouse mammary carcinoma cell line was sufficient to reduce cellular proliferation [41]. The latter results are of interest since calpain involvement in cell cycle depends on cell line. We have previously observed that calpain inhibition decreases endothelial cell proliferation but does not impair kidney epithelial cell proliferation and even increases splenocyte proliferation *in vitro* [9,35,42]. We show herein that specific calpain inhibition delays melanoma cell growth both *in vitro* and *in vivo*.

Surprisingly, whereas in murine experimental models of cancer, tumor size usually correlates to metastatic dissemination, we observed a discrepancy between the slow tumor growth and the high rate of metastatic dissemination in calpastatin transgenic tumors. We evidenced that calpain inhibition in melanoma cells (i) confers resistance to death when exposed to immune cells and (ii) increases paradoxically migration, both mechanisms potentially leading to locoregional metastasis. The first mechanism is consistent with the abundant literature focusing on calpain involvement in cell death by apoptosis or necrosis [10,11]. The observation that calpain inhibition increases tumor cell migration is unexpected since most reports show that calpain inhibition is much more likely to reduce cellular migration, as we previously observed in epithelial cell lines and splenocytes [9,35]. However, it has been shown in cells with high calpain activity, such as neutrophils, that calpain inhibition induces cellular adhesion and rapid chemokinesis [43]. Cellular migration requires a subtle balance between cellular focal adhesions and detachment from extracellular matrix. Calpain-mediated proteolysis of paxillin has been described to negatively regulate focal adhesion dynamics and cell migration [44]. One may hypothesize that tumor cells with high calpain activity have low focal adhesion dynamics since focal adhesion components are known targets for calpains. A limitation of calpain activity would therefore reinforce migration properties and increase metastasis towards regional lymph nodes.

Additional mechanisms might explain how calpastatin expression increases metastatic dissemination. For instance, we and others have previously demonstrated that calpain inhibition increases the level of heat shock protein 90 (Hsp90) by limiting the proteolytic cleavage of ~ 10 kDa C-terminal domain [45]. Since Hsp90 secretion, which requires a C-terminal motif, is essential for B16-F10 melanoma metastatic dissemination to regional lymph nodes, calpain inhibition would amplify this process [46]. This and other hypotheses all merit further investigation.

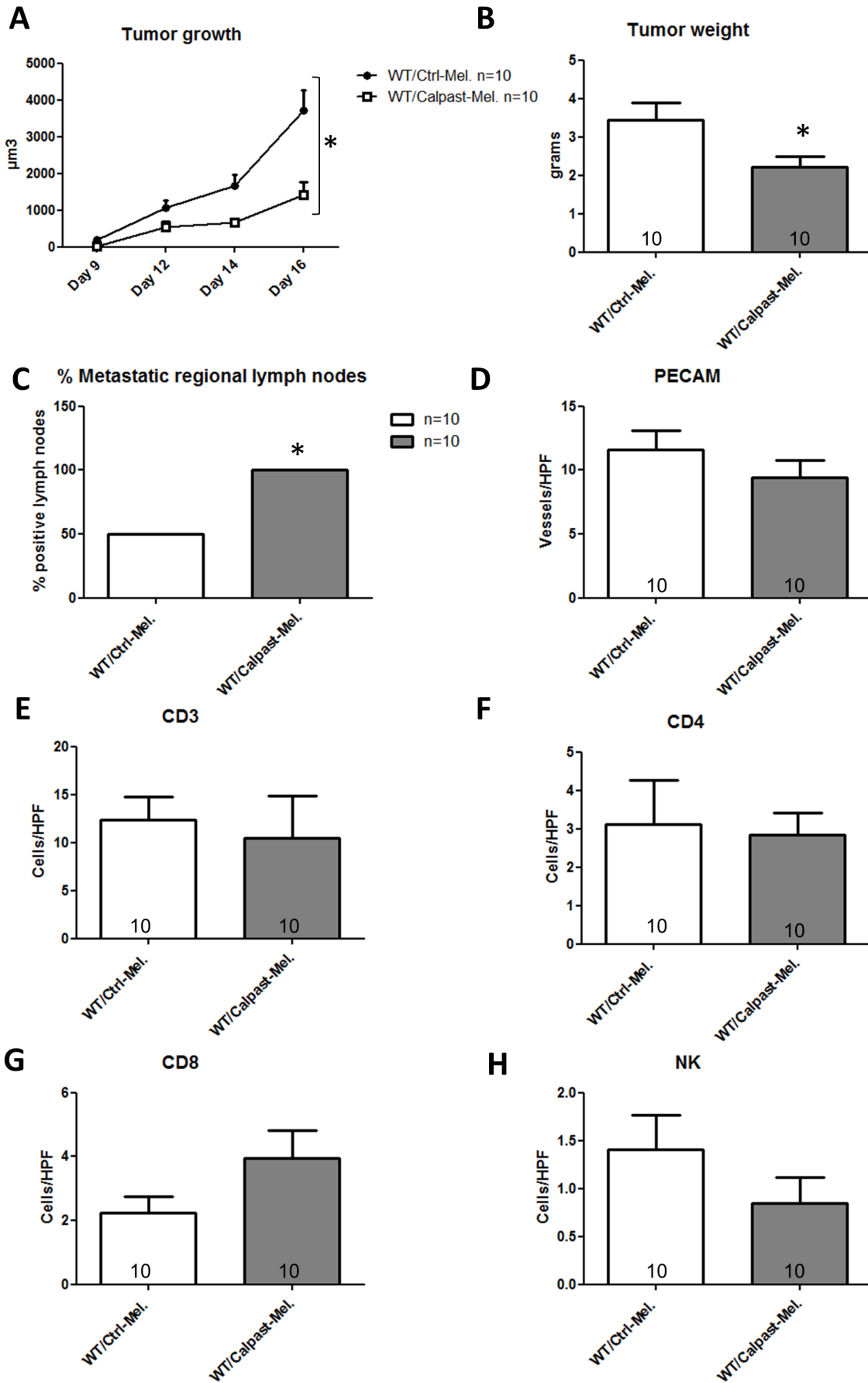


Figure 3. Inhibition of calpains in melanoma cells only: an in vivo approach. C57BL/6 WT mice were injected with one million melanoma B16-F10 cells either transgenic for calpastatin (Calpast-Mel) or transfected with a control plasmid (Ctrl-Mel) and sacrificed at day 16 for tissues analysis. **A.** Tumor growth was measured from day 9 to day 16. Calpastatin overexpression in melanoma decreased significantly tumor growth. N = 10/group, * p < 0.05. **B.** Tumor weight at day 16. Calpastatin overexpression reduced significantly melanoma weight. N = 10/group, * p < 0.05. **C.** Proportion of metastatic regional (axillary) lymph nodes at day 16. Mice injected with melanoma cells with reduced calpain activity (Calpast-Mel) had significantly more metastatic lymph nodes than controls (Ctrl-Mel) (10/10 vs 5/10 respectively, * p < 0.05). **D.** Angiogenesis assessed by vessel count at 200× magnification after CD-31 (PECAM) staining. Neo-angiogenesis was similar in transgenic and control melanomas. N = 10/group, p = NS. **E,F,G,H:** CD3, CD4, CD8 and NK cell number/HPF (200× magnification). Immune cell infiltrate was similar in transgenic and control tumors. N = 10/group, p = NS.
doi:10.1371/journal.pone.0060469.g003

Beyond the properties of tumor cells themselves, the implication of calpains in host cells is of importance. We observed that specific calpain inhibition resulted, as expected, in a limitation of tumor angiogenesis, consistent with the observed limitation of tumor growth. We and others have recently studied some molecular mechanisms involving calpains in angiogenesis, especially in CalpTG mice [3,8–9]. Calpains have been shown to be essential mediators of VEGF signalling in endothelial cells. Of notice, we also observed a decrease in immune cells infiltrating melanoma, which are essential to limit tumor extension and metastatic properties. We have previously shown that calpain inhibition by calpastatin transgene expression limits lymphocyte and NK cell migration toward inflammatory sites [35,37]. Moreover, we have evidenced that calpain inhibition limits interleukin-17 (IL-17)-producing (Th17) cell polarization and promotes T regulatory cell induction, due to the inhibition of calpain-dependent degradation of the common cytokine receptor γ chain [35]. Since IL-17 and Th17 pathway seem to exert anti-tumor properties, it could be hypothesized that immune cells overexpressing calpastatin have reduced ability to limit tumor cell viability and metastatic dissemination. The antitumor effect of IL-17 is not direct, consistent with our *in vitro* experiments that did not demonstrate any functional deficiency in cytotoxic properties of immune cells with reduced calpain activity. Rather, the cytotoxic function of Th17 cells against melanoma is due to their ability to enhance antigen presentation by dendritic cells, leading to increased capture of tumor antigens, which are then presented to tumor-reactive CD8+ T cells in the draining lymph nodes [47]. These effector CD8+ T cells migrate back to the tumor where they exert a cytotoxic effect. Consistent with that, we observed a marked decrease in the number of CD8+ T cells infiltrating melanoma in CalpTG mice. The poor tumor infiltration by immune effector cells in CalpTG mice correlates with tumor escape from immune response and may therefore explain, at least partly, the higher metastatic dissemination rate in these mice.

Our findings thus point towards a process in which calpain inhibition in melanoma and host cells promotes both primary tumor growth inhibition and more invasive metastatic disease. Very interestingly, these results are reminiscent of the recent experimental evidence that VEGF-targeted drugs inhibit primary tumor growth but promote tumor invasiveness and metastasis [48]. They comply with the fact that calpain inhibition blunts VEGF signalling as well, and potentially explain the contradictory reports on the benefit of calpain inhibition in cancer models [9].

Therapeutic calpain inhibition comes of age soon in the field of cardiovascular and neurodegenerative diseases therapy [49]. We and others have previously shown that specific calpain inhibition protects against pathological arterial wall remodelling and there is now evidence that pharmacological calpain inhibition may improve cognitive functions in Alzheimer disease models [37,49,50]. Since calpains are overexpressed in many tumor tissues, synthetic conventional calpain inhibitors could have been considered as a promising therapeutic tool against cancer, as well [51]. Our results highlight some of the mechanisms by which the

calpain/calpastatin system controls melanoma growth and metastatic dissemination. Clearly, calpain inhibition limits tumor growth and neo-angiogenesis, and could therefore prevent the initial growth of melanoma. These results are consistent with recent description of molecular mechanisms involving calpains in angiogenesis [3,9]. By contrast, inhibition of calpains protects tumor cells against death and limits immune cells motility, thereby increasing melanoma cell dissemination. The role of calpains in apoptotic processes and cell death has been extensively studied but our observation that calpains, are essential for immune cells motility toward their targets, i.e. solid tumor, is original and corroborates our previous observations in allograft immune response [35]. Further studies will be necessary to address whether our experimental results apply to other solid tumors models or human cancers. Overall, our results evidence that studies of the calpain/calpastatin in cancer models should distinguish the role of calpains in tumoral cells and in host tissues/immune system. The development of new specific calpain inhibitors with potential medical applications should take into account this complexity.

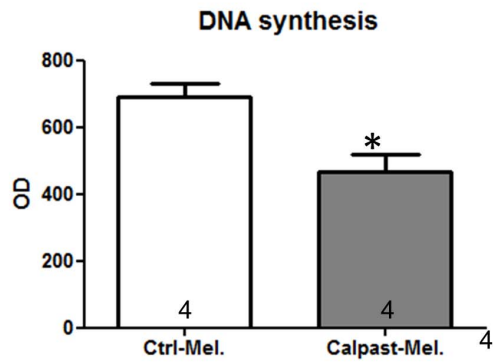
Materials and Methods

Mice and induction of melanoma tumors

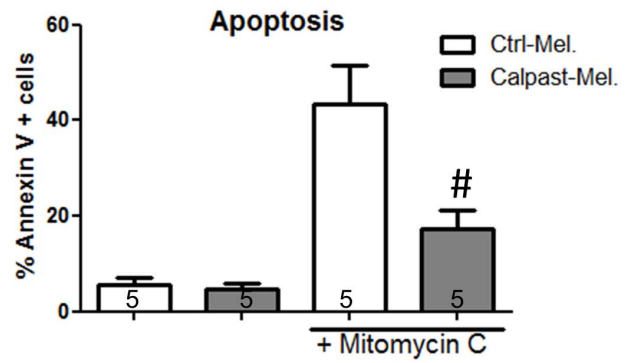
Studies were conducted in male 2-months old C57BL/6 mice. They were housed in a constant temperature room with a 12-h dark/light cycle and fed *ad libitum* on standard mouse chow. Calpastatin transgenic (CalpTG) mice were created in the laboratory using the cDNA clone of rabbit calpastatin inserted on the PCI expression vector, which includes a viral promoter (CMV immediate-early enhancer/promoter region) [36]. The presence and the expression of the transgene were identified in founder CalpTG mice by PCR and RT-PCR analysis, respectively [36]. All CalpTG mice used in these studies were backcrossed into the C57BL/6 background more than nine generations. CalpTG and WT were not littermates. To avoid genetic drift, CalpTG mice were therefore obtained from new frozen embryos within months before the study, sharing the same genetic C57BL/6 background than C57BL/6 control mice and bred in similar conditions.

One million tumoral B16-F10 cells (ATCC, USA) were injected subcutaneously under isoflurane anesthesia at the upper right part of the back of C57BL/6 control or CalpTG mice. These cells share the same C57BL/6 genetic background than mice. All procedures involving these animals were conducted in accordance with national guidelines and institutional policies. This study was carried out in strict accordance with the recommendations of the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and the *in vivo* procedures were approved by the local ethical committee (CREEA Ile de France N°3). The sacrifice was performed under sodium pentobarbital anesthesia, and all efforts were made to minimize animals suffering. Tumor size was measured between days 9 and 16 by using a micrometer. Tumor volume was calculated from radius of the 3 axis: Volume = $4/3 \times \pi \times (r1) \times (r2) \times (r3)$. The follow-up was performed until day 16.

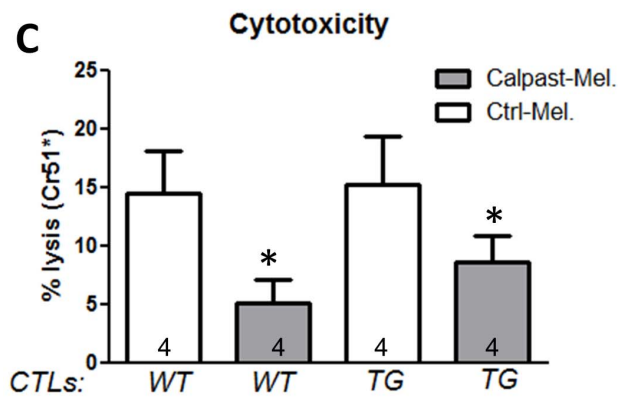
A



B



C



D

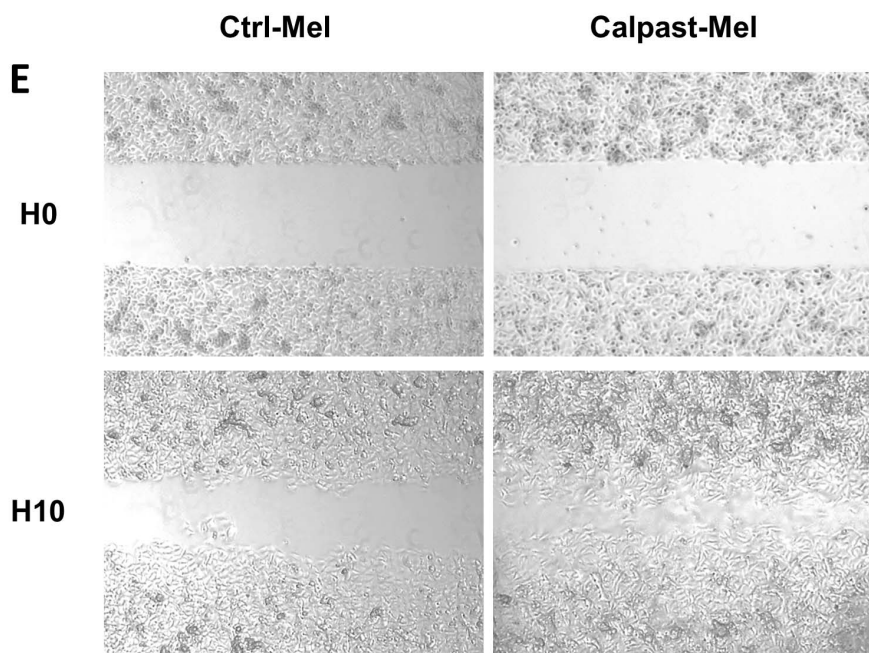
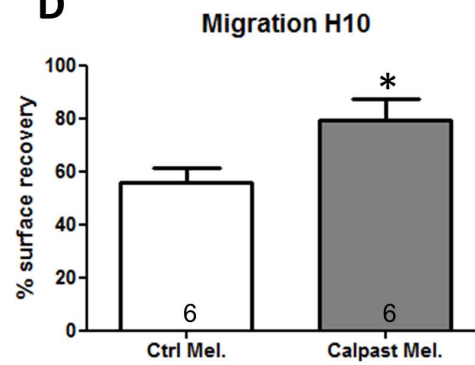


Figure 4. Inhibition of calpains in melanoma cells only: an in vitro approach. **A.** Cellular proliferation measured by BrdU incorporation (DNA synthesis). Calpastatin overexpression reduced significantly DNA synthesis under basal culture conditions. N=4 independent experiments, * p<0.05. **B.** Quantification of apoptotic cells by Annexin V (+/- propidium iodide) staining by flow cytometry under basal conditions and after 24 hours exposure to mitomycin C. Melanoma cells overexpressing calpastatin were protected against mitomycin C-induced apoptosis. N=5 independent experiments, # p<0.05 vs Ctrl-Mel+ Mitomycin C. **C.** Cytotoxic effect of previously immunized splenocytes (CTLs, previously immunized against control B16F10 cells) from C57BL/6 mice (WT) or calpastatin transgenic mice (TG) against B16-F10 melanoma cells transfected with calpastatin (Calpast-Mel) or control plasmid (Ctrl-Mel). Cytotoxicity was measured by chromium release after incorporation in melanoma cells. TG CTLs and WT CTLs cells exerted a similar cytolytic response (p=NS) but Calpast-Mel cells were partly protected against immune effectors as compared to Ctrl-Mel cells. N=4 independent experiments, * p<0.05. **D, E.** Melanoma cell migration measured by cell free gap surface recovery 10 hours after removing insert. Calpastatin overexpression increased significantly cellular migration properties in vitro. N=6 independent experiments, * p<0.05. doi:10.1371/journal.pone.0060469.g004

Tumors and lymph nodes were harvested at this time after sacrifice. Survival studies were performed along the same protocol. For ethical reasons and due to the tumor size, the survival analyzes were performed until day 30. Mice on the point of death and exhibiting signs of distress were sacrificed.

Cell cultures and induction of stable transgenic cell lines

B16-F10 cells were cultured in RPMI medium (Gibco, France), containing 10% fetal bovine serum (Biowest, France) and supplemented with Hepes1M (Gibco, 10 µl/ml) and penicillin/streptomycin (Gibco, 5 µl/ml).

Stable double transfections were performed in B16-F10 cells with (i) 3 µg of PCI expression vector including a CMV promoter and the cDNA clone of rabbit calpastatin or empty control plasmids (PM 194, pCI-neoMammalian Expression Vector, Promega, UK) altogether with (ii) 0.3 µg of another plasmid including a neomycin resistance gene cassette. Calpastatin cDNA was the same cDNA previously used to generate transgenic mice. Double transfections were performed using a Nanofectin Kit according to manufacturer's instructions (PAA Laboratories, Austria). Cells were cultured with geneticin (G418, Merck) for 3 weeks and clones transfected by Calpastatin cDNA or control plasmids (controls) were selected. The efficiency of the transfection was assessed by quantitative RT-PCR. All experiments with calpastatin-transfected B16-F10 cells were performed with at least 2 different transfected clones.

Quantitative RT-PCR

Quantitative RT-PCR. RNA was extracted from B16F10 cells using RNeasy Micro Kit columns (QIAGEN, Hilden, Germany). By using a reverse transcriptase (Fermentas, Saint Léon-Rot), cDNA was obtained from RNA and then amplified in a thermocycler (LightCycler 480, Roche Diagnostics) as follows: 95°C for 5 min followed by 45 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 15 s, 72°C for 15 s, 96°C for 5 s and 60°C for 1 min, by using SYBR Green (Roche Diagnostics) and specific primers for mouse *Capn1*: F: AGTGGAAAGGACCCTGGAGT and R: TCTCG-TTCATAGGGTCCAC, mouse *Capn2*: F: TGGCTTCG-GCATCTATGAG and R: AAGTTTTTGGCGAGGTGGAT, mouse *Capn3 var a/b/c*: F: TTGTGAGAATCCCCGTTTAA and R: TGCAAGAAACCAGCAGTCC, mouse *Capn4 or Capn5*: F: GGTTTTGGCATTGACACTTG and R: TTGCCTGTGG-TGTCGCTAT, mouse *Capn5*: F: CGCACTGTGCTCTGCATC and R: AAGAAGGGGAGGCACCTG, mouse *Capn6*: F: GC-ATTTTCCTGTTTGGCTGT and R: TGATCCTTGTGG-TTGGGAAT, mouse *Capn7*: F: ACAAGACTGATGGCAA-GAAGG and R: GTCAAGTAATGAGGGCTGTTAATTC, mouse *Capn8*: F: ATAGGCTATGCTGTCTACCAGATTC and R: CCAGGTGCTCATCGGTGT, mouse *Capn9*: F: GGACC-GACATTTGCCAAG and R: GAGGGTTAGGGAGGCAATG, mouse *Capn10*: F: TGTCTAATCAGCTGCTCTGTGC and R: ATGAAGGCATGGAACCTCTCC, mouse *Capn11*: F: TCTAGG-TGTTTCATCTGATAGATAGCC and R: TCCTTTTTCA-GCCCAAGAGA, mouse *Capn12*: F: AAAGGGGTGGAATG-

GAAGAG and R: GGCACACATCTGTTCTGCTC, mouse *Capn13*: F: AACCTGGTCATGTACAGCTGAG and R: CG-AGTGACCACTGGGAACA, mouse *Cast*: F: TCGCAAAGTTGG-TGGTACAAG and R: CTCCCCAAACTTGCTGCTT, rabbit *Cast*: F: AGCCAGCAAGTCGCTCAG and R: CCATCTCT-TTGCTGATTGGAA. *Gapdh*, *Gusb* and *Rpl32* (respectively F: AGCTTGTCATCAACGGGAAG and R: TTTGATGTTAG-TGGGGTCTCG, F: CTCTGGTGGCCTTACCTGAT and R: CAGTTGTTGTACCTTCACCTC and F: GCTGCCATC-TGTTTTACGG and R: TGACTGGTGCCTGATGAACT) were the housekeeping genes used for normalization. Results shown are expressed as 2-ΔΔCt and *Gapdh* was the housekeeping gene used for normalization.

Western Blots

For western blot analysis, cell lysates were prepared by scraping cells into an ice-cold protease inhibitory buffer. Protein quantification was performed according to the standard Bradford technique. Twenty five micrograms of proteins were separated by electrophoresis on Novex BisTris 4–12% gels (NuPAGE, Invitrogen, San Diego, CA, USA) as described by the manufacturer and transferred onto a PVDF membrane (Immobilon-P, Millipore, Billerica, MA, USA) prior to detection of the following proteins with a specific primary Ab: Spectrin (Chemicon international; 1:1500), Actin (Imgenex; 1:2000), Calpastatin (Affinity Bioreagents; 1:200), and peroxidase labelled anti-IgG secondary Ab (Amersham, dilution 1/4000 and GE Healthcare 1/4000). Thereafter, the membrane was developed with the ECL plus detection reagent (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA).

Immunohistochemical analyzes

Melanoma tumors, local and regional lymph nodes were snap frozen and cut into 3 µm sections. Axillary lymph nodes histology was analyzed to determine their metastatic status. Endothelial cells were immunostained with purified rat anti-mouse CD31 antibody (MEC 13.3; BD Biosciences), rabbit anti-CD3 (1/200, Dako), rat anti-CD68 (1/500, Abcam, USA), rat anti-NK cells (1/500 BD Biosciences, USA), rat anti-CD4 (1/500 BD Pharmingen, USA) and rat anti-CD8 (1/600, Serotec, USA). Samples were revealed with Single Stain Mouse MAX PO (rat, goat or rabbit) Histofine (Nichirei Biosciences). Density of tumor vessels and immune cell counts were determined on pictures at 200× magnification by using Image J software. A grid was applied to blinded pictures and two independent observers trained in pathology performed cell and vessel count in 10 fields/mouse. The mean value of the ten fields was considered as a unique variable. The mean number of cells/HPF (n = 10 experiments) is shown.

Calpain activity assay

Calpain activity in B16-F10 cells was measured as previously described, i.e. by both measuring the calpain-specific cleavage of

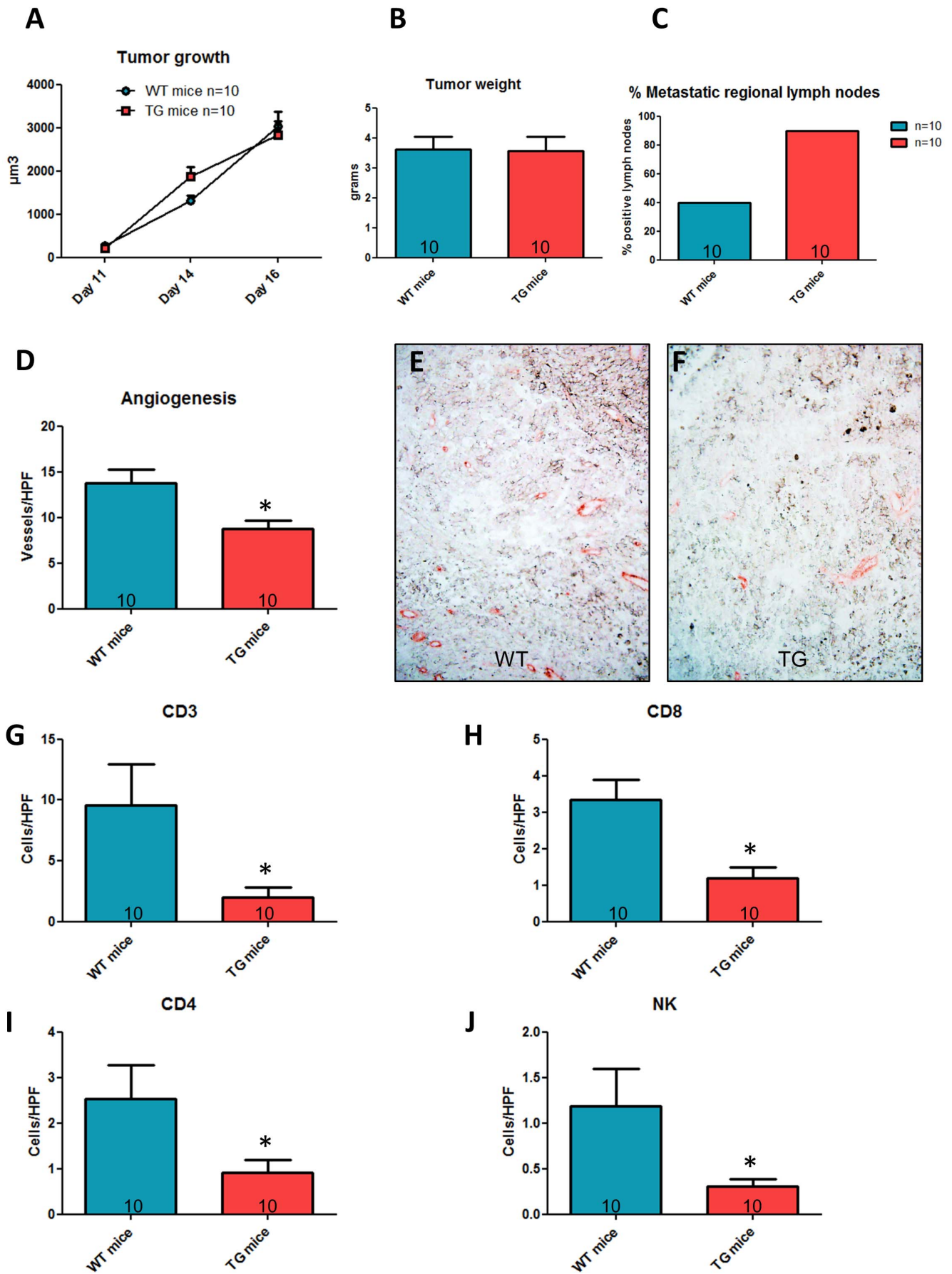


Figure 5. Inhibition of calpains in host mice only. C57BL/6 control (WT mice) or transgenic mice (CalpTG mice) were injected with one million melanoma B16F10 cells and sacrificed at day 16 for tissue analysis. **A.** Tumor growth was measured from day 11 to day 16. Calpastatin overexpression in host did not modify tumor growth. $N=10/\text{group}$, $p=NS$. **B.** Tumor weight at day 16. Calpastatin overexpression in hosts did not modify tumor weight. $N=10/\text{group}$, $p=NS$. **C.** Proportion of metastatic regional lymph nodes at day 16. CalpTG mice had a trend to have more metastatic lymph nodes than WT mice (9/10 vs 4/10 respectively, $N=10/\text{group}$, $p=NS$). **D,E,F.** Angiogenesis as assessed by vessel count at $200\times$ magnification after CD-31 staining. Neo-angiogenesis was significantly decreased in CalpTG mice when compared to WT mice. $N=10/\text{group}$, $*p<0.05$. **G,H,I,J:** CD3, CD4, CD8 and NK cell number/HPF ($200\times$ magnification). Immune cell infiltrate was significantly lower in CalpTG mice than in WT mice. $N=10/\text{group}$, $*p<0.05$. doi:10.1371/journal.pone.0060469.g005

fluorescent AMC substrate and by measuring the accumulation of 145/150-kDa spectrin BDP by Western blot analysis [13,37].

Cell proliferation

To perform BrdU incorporation assays, B16-F10 transgenic and control cells (50×10^3 cells/well) were cultured in medium. BrdU was added to the wells at the later time. After further incubation (24 hours), cells were fixed, denatured, and immunostained with the anti-BrdU antibody (Cell Proliferation ELISA, BrdU, Roche).

DNA synthesis was quantified by photometry according to manufacturer's instructions.

Apoptosis

Melanoma cells were exposed to $50\ \mu\text{g}/\text{mL}$ mitomycin C for 24 hours. Apoptotic cells were quantified by flow cytometry by using the Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Sigma, USA) according to manufacturer's instructions, FACScalibur flow cytometer and CellQuest Software (BD Biosciences).

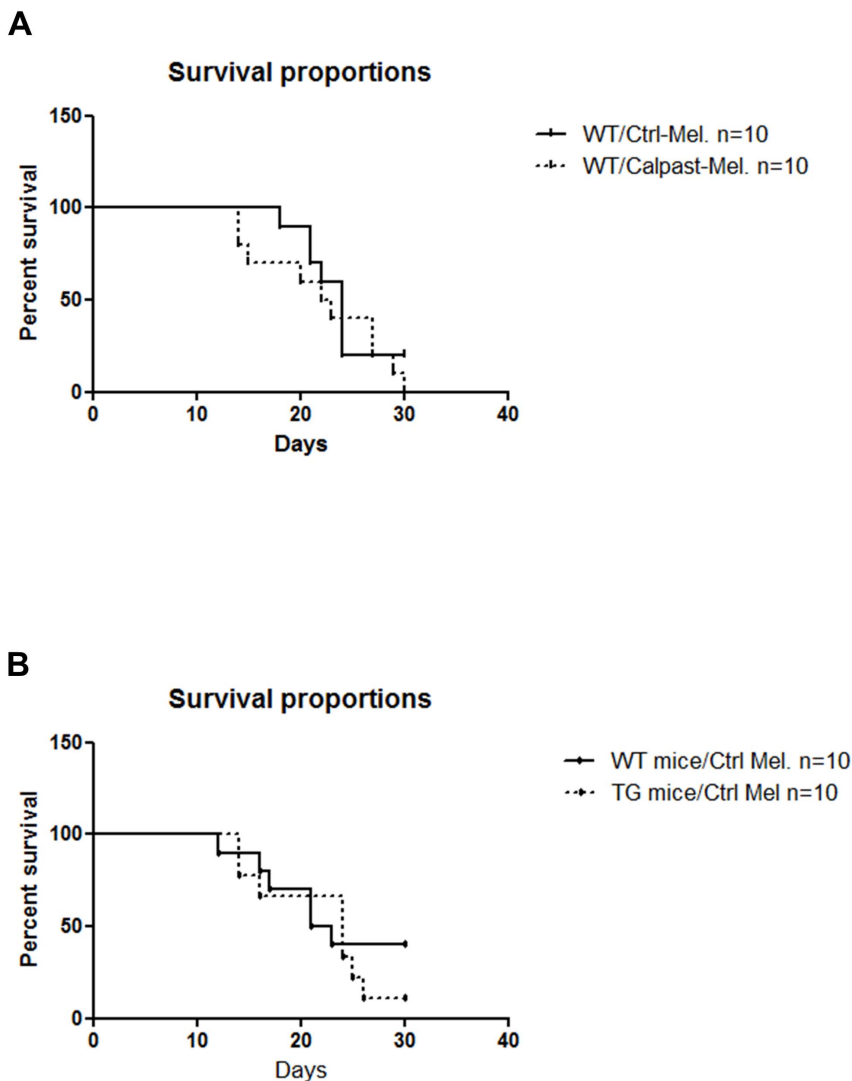


Figure 6. Survival studies. **A.** Specific limitation of calpain activity in melanoma cells only by calpastatin overexpression in vivo. C57BL/6 WT mice were injected with one million melanoma B16-F10 cells either transgenic for calpastatin (Calpast-Mel) or transfected with a control plasmid (Ctrl-Mel), $n=10/\text{group}$. Limitation of calpain activity in melanoma cells only did not modify survival at day 30. **B.** Specific limitation of calpain activity in mice transgenic for calpastatin. C57BL/6 control (WT mice) or transgenic mice (CalpTG mice) were injected with one million control melanoma B16F10 cells, $n=10/\text{group}$. Limitation of calpain activity in host did not modify survival at day 30. doi:10.1371/journal.pone.0060469.g006

Cell migration

Melanoma monolayer repair assay: 7×10^4 B16-F10 transgenic and control cells were cultured to confluence in each of the two wells of a Culture-Insert (Ibidi). After 24 h, the Culture Insert was removed and the cell monolayer including a central cell-free gap of 0.5 mm was covered with fresh medium. Gap surface area was analyzed at 0, 2, 4, 6, 8 and 10 hours by phase contrast microscopy and Image J software® (NIH).

In vitro cytotoxic T-cell response

B16-F10 transgenic and control cells, first labelled with $100 \mu\text{Ci Na}^{51}\text{CrO}_4$ (GE Healthcare) for 90 min at 37°C , were added (2×10^4 target cells in 200 μL) to each microwell of splenocytes from C57BL/6 WT or CalpTG mice previously immunized against one million B16-F10 control melanoma cells (Ctrl-Mel) injected 10 days before (4×10^5 effector cells in 200 μL), allowing an effector/target ratio of 20:1. After a 5 h incubation period at 37°C , the plates were centrifuged and ^{51}Cr was detected in supernatants and cells by gamma count (LKB 1282 Compu-

gamma CS). Results are expressed as% specific lysis, i.e. $100 \times (\text{sample} - \text{spontaneous}) / (\text{maximum} - \text{spontaneous})^{51}\text{Cr}$ release.

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SEM. Means and SEM were generated from independent experiments. RT-PCR data were analyzed by the non-parametric Kruskal-Wallis and Mann-Whitney test. Other results were analyzed by Mann-Whitney or student bilateral t test and ANOVA when distribution was normal, and Fisher's exact test for comparison of proportions. Survival was analyzed by log-rank tests. Results with $P < 0.05$ were considered statistically significant (Statview and graphpad Prism softwares).

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: EL QR LB. Performed the experiments: EL QR JP SV AP GH JPH LB. Analyzed the data: EL QR LB JP. Contributed reagents/materials/analysis tools: AP SV EL QR GH JP. Wrote the paper: EL LB QR.

References

- Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J (2003) The calpain system. *Physiol Rev* 83: 731-801.
- Glading A, Uberall F, Keyse SM, Lauffenburger DA, Wells A (2001) Membrane proximal ERK signaling is required for M-calpain activation downstream of epidermal growth factor receptor signaling. *J Biol Chem* 276: 23341-8.
- Su Y, Cui Z, Li Z, Block ER (2006) Calpain-2 regulation of VEGF-mediated angiogenesis. *FASEB J* 20: 1443-51.
- Franco SJ, Huttenlocher A (2005) Regulating cell migration: calpains make the cut. *J Cell Sci* 118: 3829-38.
- Dewitt S, Hallett M (2007) Leukocyte membrane "expansion": a central mechanism for leukocyte extravasation. *J Leukoc Biol* 81: 1160-4.
- Beckerle MC, Burrige K, DeMartino GN, Croall DE (1987). Colocalization of calcium-dependent protease II and one of its substrates at sites of cell adhesion. *Cell* 51: 569-77.
- Han Y, Weinman S, Boldogh I, Walker RK, Brasier AR (1999) Tumor necrosis factor-alpha-inducible I-kappaBalpha proteolysis mediated by cytosolic m-calpain. A mechanism parallel to the ubiquitin-proteasome pathway for nuclear factor-kappaB activation. *J Biol Chem* 274: 787-94.
- Youn JY, Wang T, Cai H (2009) An ezrin/calpain/PI3K/AMPK/eNOSs1179 signaling cascade mediating VEGF-dependent endothelial nitric oxide production. *Circ Res* 104: 50-9.
- Letavernier B, Zafrani L, Nassar D, Perez J, Levi C, et al. (2012) Calpains contribute to vascular repair in rapidly progressive form of glomerulonephritis: potential role of their externalization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32: 335-42.
- Lu T, Xu Y, Mericle MT, Mellgren RL (2002) Participation of the conventional calpains in apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1590: 16-26.
- Squier MK, Sehnert AJ, Sellins KS, Malkinson AM, Takano E, et al. (1999) Calpain and calpastatin regulate neutrophil apoptosis. *J Cell Physiol* 178: 311-9.
- Arthur JS, Elce JS, Hegadorn C, Williams K, Greer PA (2000) Disruption of the murine calpain small subunit gene, *Capn4*: calpain is essential for embryonic development but not for cell growth and division. *Mol Cell Biol* 20: 4474-81.
- Azam M, Andrabi SS, Sahr KE, Kamath L, Kuliopulos A, et al. (2001) Disruption of the mouse mu-calpain gene reveals an essential role in platelet function. *Mol Cell Biol* 21: 2213-20.
- Dutt P, Croall DE, Arthur JS, Veyra TD, Williams K, et al. (2006) m-Calpain is required for preimplantation embryonic development in mice. *BMC Dev Biol* 24: 6-3.
- Storr SJ, Carragher NO, Frame MC, Parr T, Martin SG (2011) The calpain system and cancer. *Nat Rev Cancer* 11: 364-74.
- Shiba E, Kambayashi JI, Sakon M, Kawasaki T, Kobayashi T, et al. (1996) Ca²⁺-Dependent Neutral Protease (Calpain) Activity in Breast Cancer Tissue and Estrogen Receptor Status. *Breast Cancer* 3: 13-17.
- Kimura Y, Koga H, Araki N, Mugita N, Fujita N, et al. (1998) The involvement of calpain-dependent proteolysis of the tumor suppressor NF2 (merlin) in schwannomas and meningiomas. *Nat Med* 4: 915-22.
- Lakshminikuttyamma A, Selvakumar P, Kanthan R, Kanthan SC, Sharma RK (2004) Overexpression of m-calpain in human colorectal adenocarcinomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13: 1604-9.
- Braun C, Engel M, Seifert M, Theisinger B, Seitz G, et al. (1999) Expression of calpain I messenger RNA in human renal cell carcinoma: correlation with lymph node metastasis and histological type. *Int J Cancer* 84: 6-9.
- Bai DS, Dai Z, Zhou J, Liu YK, Qiu SJ, et al. (2009) *Capn4* overexpression underlies tumor invasion and metastasis after liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 49: 460-70.
- Salchin D, Fromberg I, Haugk C, Dohmen B, Georg T, et al. (2010) Immunohistochemical analysis for expression of calpain 1, calpain 2 and calpastatin in endometrial cancer. *Anticancer Res* 30: 2837-43.
- Yoshikawa Y, Mukai H, Hino F, Asada K, Kato I (2000) Isolation of two novel genes, down-regulated in gastric cancer. *Jpn J Cancer Res* 91: 459-63.
- Moreno-Luna R, Abrante A, Esteban F, González-Moles MA, Delgado-Rodríguez M, et al. (2011) Calpain 10 gene and laryngeal cancer: a survival analysis. *Head Neck* 33: 72-6.
- Frances CP, Conde MC, Saez ME, Diez SF, Rey CM, et al. (2007) Identification of a protective haplogenotype within CAPN10 gene influencing colorectal cancer susceptibility. *J Gastroenterol Hepatol* 22: 2298-302.
- Moretti D, Del Bello B, Cosci E, Biagioli M, Miracco C, et al. (2009) Novel variants of muscle calpain 3 identified in human melanoma cells: cisplatin-induced changes in vitro and differential expression in melanocytic lesions. *Carcinogenesis* 30: 960-7.
- Kubbutat MH, Vousden KH (1997) Proteolytic cleavage of human p53 by calpain: a potential regulator of protein stability. *Mol Cell Biol* 17: 460-8.
- Potter DA, Tirnauer JS, Janssen R, Croall DE, Hughes CN, et al. (1998) Calpain regulates actin remodeling during cell spreading. *J Cell Biol* 141: 647-62.
- Benetti R, Copetti T, Dell'Orso S, Melloni E, Brancolini C et al. (2005) The calpain system is involved in the constitutive regulation of beta-catenin signaling functions. *Biol Chem* 280: 22070-80.
- Gafni J, Cong X, Chen SF, Gibson BW, Ellerby LM (2009) Calpain-1 cleaves and activates caspase-7. *J Biol Chem* 284: 25441-9.
- Gao G, Dou QP (2000) N-terminal cleavage of bax by calpain generates a potent proapoptotic 18-kDa fragment that promotes bcl-2-independent cytochrome C release and apoptotic cell death. *J Cell Biochem* 80: 53-72.
- Hirai S, Kawasaki H, Yaniv M, Suzuki K (1991) Degradation of transcription factors, c-Jun and c-Fos, by calpain. *FEBS Lett* 287: 57-61.
- Kim MJ, Jo DG, Hong GS, Kim BJ, Lai M, et al. (2002) Calpain-dependent cleavage of cain/cabin1 activates calcineurin to mediate calcium-triggered cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 9870-5.
- Polster BM, Basañez G, Etxebarria A, Hardwick JM, Nicholls DG (2005) Calpain I induces cleavage and release of apoptosis-inducing factor from isolated mitochondria. *J Biol Chem* 280: 6447-54.
- Demarchi F, Bertoli C, Copetti T, Tanida I, Brancolini C, et al. (2006) Calpain is required for macroautophagy in mammalian cells. *J Cell Biol* 175: 595-605.
- Letavernier E, Dansou B, Lochner M, Perez J, Bellocq A, et al. (2011) Critical role of the calpain/calpastatin balance in acute allograft rejection. *Eur J Immunol* 41: 473-84.
- Peltier J, Bellocq A, Perez J, Doublier S, Dubois YC, et al. (2006) Calpain activation and secretion promote glomerular injury in experimental glomerulonephritis: evidence from calpastatin-transgenic mice. *J Am Soc Nephrol* 17: 3415-23.
- Letavernier E, Perez J, Bellocq A, Mesnard L, de Castro Keller A, et al. (2008) Targeting the calpain/calpastatin system as a new strategy to prevent cardiovascular remodeling in angiotensin II-induced hypertension. *Circ Res* 102: 720-8.
- Nassar D, Letavernier E, Baud L, Aractingi S, Khosrotehrani K (2012) Calpain activity is essential in skin wound healing and contributes to scar formation. *PLoS One* 7: e37084.
- Storr SJ, Mohammed RA, Woolston CM, Green AR, Parr T, et al. (2011) Calpastatin is associated with lymphovascular invasion in breast cancer. *Breast* 20: 413-8.

40. Fenouille N, Grosso S, Yunchao S, Mary D, Pontier-Bres R, et al. (2012) Calpain 2-dependent I κ B α degradation mediates CPT-11 secondary resistance in colorectal cancer xenografts. *J Pathol* 227: 118-29.
41. Ho WC, Pikor L, Gao Y, Elliott BE, Greer PA (2012) Calpain 2 regulates Akt-FoxO-p27(Kip1) protein signaling pathway in mammary carcinoma. *J Biol Chem* 287: 15458-65.
42. Frangić C, Zhang W, Perez J, Dubois YC, Haymann JP, et al. (2006) Extracellular calpains increase tubular epithelial cell mobility. Implications for kidney repair after ischemia. *J Biol Chem* 281: 26624-32.
43. Lokuta MA, Nuzzi PA, Huttenlocher A (2003) Calpain regulates neutrophil chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 4006-11.
44. Cortesio CL, Boateng LR, Piazza TM, Bennin DA, Huttenlocher A (2011) Calpain-mediated proteolysis of paxillin negatively regulates focal adhesion dynamics and cell migration. *J Biol Chem* 286: 9998-10006.
45. Bellocq A, Doublier S, Suberville S, Perez J, Escoubet B, et al. (1999) Somatostatin increases glucocorticoid binding and signaling in macrophages by blocking the calpain-specific cleavage of Hsp 90. *J Biol Chem* 274: 36891-6.
46. Wang X, Song X, Zhuo W, Fu Y, Shi H, et al. (2009) The regulatory mechanism of Hsp90 α secretion and its function in tumor malignancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 21288-93.
47. Martin-Orozco N, Muranski P, Chung Y, Yang XO, Yamazaki T, et al. (2009) T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity. *Immunity* 31: 787-98.
48. Loges S, Mazzone M, Hohensinner P, Carmeliet P (2009) Silencing or fueling metastasis with VEGF inhibitors: antiangiogenesis revisited. *Cancer Cell* 15: 167-70.
49. Getz GS (2012) Calpain inhibition as a potential treatment of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 181: 388-91.
50. Higuchi M, Iwata N, Matsuba Y, Takano J, Suemoto T, et al. (2012) Mechanistic involvement of the calpain-calpastatin system in Alzheimer neuropathology. *FASEB J* 26: 1204-17.
51. Leloup L, Wells A (2011) Calpains as potential anti-cancer targets. *Expert Opin Ther Targets* 15: 309-23.

En cours

Abstract

Calpains 1 and 2 are ubiquitous cysteine proteases stimulated by calcium signalling and especially limited by calpastatin. Intracellular calpain activity has major pro-inflammatory effects. They seem to play paradoxical roles in melanoma, increasing tumor growth and lymphocyte infiltration but limiting metastasis. Calpains can also be externalised. Extracellular calpains pathophysiological roles are globally less studied and unknown in tumors. Recently Perez *et al* have shown that extracellular calpains have an anti-inflammatory effect through TLR2 cleavage and that calpains are excreted through an ABCA1 mediated mechanism. They also demonstrated that TLR2 inhibition limited Th17 lymphocyte response with a decrease of interleukin 17A (IL-17A) production. Melanoma is an immunoresponsive tumor. Our actual study has been based on those results and on known positive effects of TLR2 stimulation and Th17 response. To study the role of extracellular calpains in melanoma, we used transgenic mice in which extracellular calpains are inhibited. Our first results confirm that in vivo extracellular calpain inhibition can limit melanoma growth. This action is associated with an increase of lymphocyte infiltration (particularly in CD8+ cells) and with a higher TLR2 expression in transgenic mice. We confirm that TLR2 stimulation limits melanoma growth and this stimulation is stronger in TG mice. We are actually testing ABCA1 pharmacological inhibition (probenecid) as a treatment for melanoma. In vitro results confirmed that probenecid decreases extracellular activity of calpains and increases TLR2 expression on lymphocytes. In vivo first results show a frank effect on tumor growth. Thus, extracellular calpain inhibition is a good target in melanoma and seems to act as an immunomodulator. We need to confirm the exact in vivo immune effects of extracellular calpain inhibition and to confirm in vivo that the effect of probenecid is due to the inhibition of calpain externalisation and TLR2 stimulation.

Key words: calpain, TLR2, melanoma

Introduction

Calpains are cytosolic calcium activated neutral cysteine proteases. Two isoforms are ubiquitously expressed, calpain 1 or μ and calpain 2 or m . They respectively need μ M and mM calcium concentration to be activated. Their activity is controlled by calpastatin, an ubiquitous inhibitor¹.

Calpains are implicated in multiple pathologies through their pro-inflammatory activity as Alzheimer disease, cardiovascular pathologies^{2,3}. This pro-inflammatory effect is mediated through several mechanisms as activation of NF- κ B by I κ B α cleavage, promoting chemotaxis and inflammatory cells activation, limiting the anti-inflammatory effect of glucocorticoids via cleavage of HSP90 which normally stabilizes glucocorticoids receptor⁴⁻⁶.

Calpains are in some cases a prognostic marker in tumors⁷⁻¹⁰. But their exact contributions remain unclear. Due to their ubiquity and their multiple substrates they could act in different pro- or anti-tumor processes. Indeed their activity is linked to cell proliferation, migration, angiogenesis or apoptosis/cells surviving processes¹¹⁻¹³. This is why in a first study we have studied the in vivo effects of calpains in a mice model of melanoma. We concluded that calpains contribute to limit tumor growth but promote migration and nodes metastases. In the same time calpains promote lymphocyte infiltration but without tumor control, and without any effect on survival¹⁴.

It is known that calpains could be excreted through the process of apoptosis but also in a controlled fashion. This is a poorly studied action of calpains. Few data exhibit that lymphocytes, endothelial or chondrocytes could excrete calpains^{15,16}. Perez *et al* recently showed that calpains could be excreted through an ABCA1 involving mechanism, and that this excretion is responsible for an anti-inflammatory process through specific cleavage of TLR2. They also showed that this excretion mechanism could be induced by low doses of interleukin-2, known for Treg lymphocyte induction and this TLR2 cleavage limits Th17 lymphocyte activation¹⁷.

Recent therapeutic development in melanoma focuses on modulation of immune response and particularly in lymphocyte (anti CTLA-4 and anti PD-1 antibody)^{18,19}. Several studies reported positive effects on melanoma control of Th17 response and TLR2 stimulation^{20,21}.

Here we report the first results of positive extracellular calpain inhibition in melanoma through an immunomodulatory action.

Methods:

-Mice

-Studies were conducted in male C57BL/6 (WT) mice and transgenic mice CRP calpastatin (CRP Calpast) aged matched (aged between 2 and 5 month). CRP Calpast were created as already described¹⁷, they have a C57BL/6 background. Briefly, a transgene composed with human CRP promoter, signal peptide and mouse calpastatin gene was added in C57BL/6 background. All procedures involving mice were conducted in accordance with national guidelines and institutional policies. Mice were housed in constant temperature room with a 12h dark/light cycle and fed *ad libitum* on standard mouse chow.

-Melanoma models-injection

One million tumoral B16-F10 cells (ATCC, USA) were injected subcutaneously under isoflurane anesthesia at upper right part of the back of mice. These cells share the same genetic background than mice. Tumors sizes were measured using a micrometer every two days since day nine until sacrifice at day fifteen. Tumor volume was calculated from radius of 3 axis: $\text{volume} = \frac{4}{3} \pi \times r1 \times r2 \times r3$. Sacrifice was performed under sodium pentobarbital anesthesia. Tumors were weight and harvested at this time. TLR2 agonist (PAM3CSK4, Invivogen) was injected in peritoneal cavity (5mg/kg) at day 5 and day 10 after melanoma cells injection. Probenecid (36400, Life technologie) was administrated in peritoneal cavity (50mg/kg) at days 0, 5 and 10 after melanoma cells injection. Survival study was conducted in WT and CRP Calpast mice under the same procedure. We monitored every two day after day nine. For ethical condition we had to stop this study when tumor radius was higher to 2 cm.

Cells cultures

B16-F10 cells were cultured in RPMI medium (Gibco, France), containing 10% foetal cow serum (FCS) and supplemented with HEPES 1M (Gibco, 10 μ l/ml) and 100U/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin. Spleen cells from C57BL/6J mice were isolated by passing the tissue through a nylon membrane. They were depleted of erythrocytes by a 90 seconds exposure to ACK lysing buffer (BioWhittaker), washed, and suspended in DMEM supplemented with 10% FCS, 1% glutamine, 10mM HEPES, 0.05mM 2-Mercaptoethanol, 100U/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin. Lymphocytes were isolated from this preparation using the lympholyte-cell separation media (CL5035, CEDARLANE). Isolated mouse spleen lymphocytes were cultured at 5.10⁶ cells/well in a

24-well plate in 500µl DMEM supplemented with 1% FCS, 2µM L-glutamine, 100U/ml penicillin, and 100µg/ml streptomycin.

Cell proliferation

To perform BrdU incorporation assays, B16-F10 cells were plated: $5 \cdot 10^6$ /well 24 h before incubation. Calpain 1 human erythrocyte (208713, merckmillipore) and calpastatin (208902, merckmillipore) were added as described in RPMI FCS 2% 4 hours before BrdU. BrdU (11647229001, BrdU Cell Proliferation ELISA, Roche Diagnostic) was added during 30 mn (final concentration 10µM). Then a wash out period of 15 min in PBS solution without BrdU was practiced and cells were taken off and fixed in 70% ethanol solution before treated 30 mn in 2M HCl solution. Antibody anti BrdU-FITC (11-5071-42, e Bioscience) was added 30 mn and cells were finally marked in PI/RNase staining buffer (550825, BD pharmingen) before analyse by flow cytometry MACSquant analyser with MACSquantify software (Miltenyi Biotec).

Calpain activity assay

Extracellular calpain activity was determined in spleen lymphocytes cells. They were cultured in 24-well plate ($5 \cdot 10^6$ cells/ well), in 500µl DMEM medium supplemented with 2% FCS and stimulated systematically with 1µg/ml soluble anti-CD3 (553057, BD Pharmingen) for 12 hours. Cells were placed incubation during 4 hours in Krebs-Ringer HEPES (KRH) solution (pH7.4) containing 2mM CaCl_2 with or without probenecid (36400, Life technologie) then: for extracellular calpain activity KRH was taken off and calpain inhibitor 1 was added or not and incubated 30 mn before the addition of calpain substrate N-succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amino-4-methylcoumarin (AMC, Sigmal Adrich) ; for cellular calpain activity after initial KRH was take off we put on KRH solution (pH7.4) containing 2mM CaCl_2 with or without calpain inhibitor 1, and incubated 30 mn before the addition of calpain substrate N-succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amino-4-methylcoumarin (AMC, Sigmal Adrich). After 30 mn for cellular and 2 hours for extracellular activity, fluorescence was detected at 360 nm excitation and 460nm emission, using the FLx 800 spectrometer (BioTek Instruments). Calpain specific activity was determined as the difference between fluorescence measured with and without calpain inhibitor 1.

PCR

Tissu mRNA was extracted using trizol technic and DNase 1 was used before RT-PCR. RNA concentration was measured using NanoDrop1000 spectrophotometer (ThermoScientific). cDNA

synthesis was performed using SYBR green and specific probes on the light cycler 480 (Roche). Expression levels were normalized to the house keeping gene *Gusb* using lightcycler advanced relative quantification program (Roche). Probes used were from eurogentec:

mouse *gusb* s: CTCTGGTGGCCTTACCTGAT and as: CAGTTGTTGTACCTTCACCTC, mouse *il1 alpha* s: TTGGTTAAATGACCTGCAACA and as: GAGCGCTCACGAACAGTTG, mouse *il1 beta* s: TGTAATGAAAGACGGCACACC and as: TCTTCTTTGGGTATTGCTTGG, mouse *il2* s: GCTGTTGATGGACCTACAGGA and as: TTCAATTCTGTGGCCTGCTT, mouse *il6* s: GCTACCAAAGTGGATATAATCAGGA and as: CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA, mouse *il10* s: ACTGCACCCACTTCCCAGT and as: TGTCCAGCTGGTCCTTTGTT.

Flow cytometry

Analysis was made in WT and CRP Calpast aged matched. After sacrificed on day fifteen, one part of melanoma was fine cut and then incubates at 37°C one hour in collagenase from clostridium histolyticum type IV solution (1mg/ml, C5138, Sigma). Tissue was then passed through a nylon membrane. For lymphocyte analysis cells were prepared as already described. 10⁶ cells were incubated with antibodies during one hour at +4°C before washed and then analysed with flow cytometry MACSquant analyser and MACSquantify software (Miltenyi Biotec). Antibodies used were: anti CD45 vioblue mouse (130-102-430, Miltenyi Biotec), anti-F4/80-PE mouse (130-102-422, Miltenyi Biotec), anti CD4 APC (17-0042-82, eBioscience), anti CD8a FITC mouse (130-102-490) and monoclonal mouse anti TLR2 FITC (M Ab mTLR2-FITC, Invivogen).

Immuno histochemical analyzes

After sacrificed a part of melanoma were: immersed in formalin 4% fixed, or snap-frozen. Immunohistochemistry for CD3 were made after dewaxed, heated in citric acid bath (pH6 for CD3), aspecific connection were blocked with PBS BSA 2% solution and endogenous peroxidase blocking. Primary antibody was: mouse CD3 monoclonal antibody (A0452, Dako, 1/200). We then used specific histofin (Nichirei Biosciences) and revealed with AEC (k34769, Dako), hematoxylin QS (Vector) and mount with aquagenous mount (Scytek laboratory). 5 fields were analyzed per mouse inside tumor lesion to exclude in situ cutaneous lymphocyte(x 200).

Western blot

Proteins from WT and CRP Calpast tissue were extracted in RIPA lysis buffer and protease inhibitor cocktail (1µg/ml, Sigma). After homogenization, lysate was centrifuged at 1000g for 1h and

supernatant was frozen at -80°C . Protein concentration was measured using the Bradford method. $15\mu\text{g}$ of protein was separated by electrophoresis on a Bis-Tris gel 4-12% (Novex, thermos fisher). After proteins were transferred onto PVDF membrane, not specific sites were blocked in PBS Tween and 5% milk solution before incubation with primary antibody overnight at 4°C . Membrane was washed, and then incubated for one hour with secondary antibody conjugated with peroxidase. ECL (RPN 3222, GE Healthcare life sciences) was applied 5mn on membrane for chemiluminescent reaction. Reaction was read in Syngen Pxi imager (Ozyme) and analyse using the software Image J or with GeneSys software (Ozyme). Primary antibodies used were: rabbit polyclonal antibody anti TLR2 (IMG-410-A, Imgenex, 1/250), rabbit polyclonal antibody anti GAPDH (G9545, Sigma Aldrich, 1/50000). Secondary antibody used was anti rabbit IgG F (ab 1) 2 fragment antibody (NA9340V GE Healthcare, 1/5000).

Statistical analysis: Data are expressed in mean \pm SEM. Data are analyzed by ANOVA or/and non parametric Mann-Whitney test or two way-ANOVA with Tukey's multiple comparisons test (analyse of PAM and/or genotype effect, BRDU analyse). Surviving study was analysed with log-Rank. Results with $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Preliminary data:

1) Extracellular calpain inhibition limits melanoma growth with preserved full length TLR2 expression and an increased lymphocyte infiltration:

To determine if extracellular calpains are implicated in melanoma growth we used CRP Calpast mice. Those mice have specific extracellular calpain inhibition due to transgenic calpain expression associated with peptid signal. Moreover, CRP promoter permitted specific transgene expression in inflammatory conditions as tumoral pathology. We compared WT mice with CRP Calpast mice in a subcutaneous melanoma model. B16-F10 cells have C57BL/6 background, like mice we used in all this study. It avoided to allograft immune reactivity. A Previous study confirmed calpains 1 and 2 expression in B16-F10 cells¹⁴.

In a first study we compared 9 WT mice and 9 CRP Calpast mice receiving melanoma cells. We measured tumor size from day 9 after melanoma cells injection to day 15. Weight was measured the day of sacrifice. Tumor weight was significantly reduced at day 15 in CRP Calpast mice ($p=0.02$, Figure 1 A, 3 ± 0.57 vs 1.5 ± 0.47 g, $n=7$ vs $n=8$) and tumor growth was significantly different in CRP Calpast mice compared to WT mice ($p< 0.05$, Figure 1 B). CD3 infiltration count inside tumor was increased in CRP Calpast mice ($p=0.026$, Figure C, 7.4 ± 2 vs 17.5 ± 3.7 /fields, $n=7$ vs $n=8$). Flow cytometry showed that there was a trend toward increased infiltration by immune cell CD45+ ($p=0.12$, Figure 1 D, 2.8 ± 0.9 vs 5 ± 0.92 /fields, $n=7$ vs $n=7$), but no difference in CD4+ ($p=0.31$, Figure 1 E, 1.14 ± 0.53 vs $1.52\pm 0.34\%$ of cells, $n=7$ vs $n=7$) and so CD3+ difference was due to a CD8+ increase in CRP Calpast tumor ($p=0.039$, Figure 1 F, 0.28 ± 0.04 vs 0.67 ± 0.16 % of cells, $n=7$ vs $n=7$). Finally F4/80+ was not increased significantly ($p=0.13$, Figure 1 G, 1.04 ± 0.25 vs 2.07 ± 0.54 % of cells, $n=7$ vs $n=7$). TLR2 full length protein (100kDa) expression in melanoma was significantly more preserved in CRP Calpast mice compared with WT as shown by western blot analysis ($p=0.026$, Figure 2 A, B 1 ± 0.18 vs 1.79 ± 0.3 arbitrary unit, $n=5$ vs $n=5$). ARN expression of a first panel of cytokines confirmed this global increase in inflammation (Figure 3 A, B, C, D, E).

Unfortunately, a specific surviving study has been stopped because of ethical reasons and did not permit to show a possible positive effect of extracellular calpain inhibition *via* a transgene.

All those results permitted to confirm that extracellular calpain inhibition limits tumor progression of melanoma with a positive effect due to intra-tumoral CD8+ lymphocyte infiltration. This immunomodulatory effect was associated with TLR2 preservation.

2) Extracellular calpains activity has no cells in vitro effect in melanoma cell proliferation

To eliminate the effect of extracellular activity of calpains in melanoma cell proliferation, we exposed in vitro B16-F10 cells to calpain or calpastatine. We measured percentage of cells with BrdU incorporation by flow cytometry in different conditions. There was no effect of calpain or calpastatin on proliferation (Figure 4). This confirmed that extracellular calpain inhibition was probably mediated through an immune process. One limit of this in vitro experiment is the missing of an extracellular matrix which could be targeted by calpains enzymatic activity.

3) TLR2 stimulation limits melanoma growth especially in CRP Calpast mice.

To confirm that anti-tumoral activity of CRP Calpast mice was mediated through TLR2 preservation, we compared the effect of a TLR2 agonist (PAM3CSK4) in subcutaneous melanoma models implanted in WT mice and CRP Calpast mice. 12 mice were injected at day 0 in each group. TLR2 agonist was administered by intraperitoneal injections on day 5 and 10. Tumor size and weight were measured as already described.

CRP Calpast mice treated with PAM3CSK4 showed the lowest tumor growth and this was significantly different than CRP Calpast mice not treated at day 15. WT mice and WT mice treated with PAM3CSK4 had no statistically difference in tumor growth and in tumor weight at day 15 (Figure 5 A, B). Additionally, at day 15 there was a statistically difference on tumor weight in CRP Calpast mice receiving PAM3CSK4 compared to CRP Calpast mice alone ($p=0.037$, Figure 5 B, 1.93 ± 0.28 vs 1.13 ± 0.21 grams, $n=10$ vs $n=11$). We also noted that the highest mortality during 15 days occurred in the not treated WT mice group with 4 death among 12 mice while CRP Calpast mice receiving PAM3CSK4 had no melanoma linked death (one secondary to a traumatic intraperitoneal injection) whereas CRP Calpast alone and WT treated mice had intermediary mortality.

TLR2 specific stimulation response intensity in CRP Calpast mice compared to WT confirmed our presumption that extra cellular effect of calpain inhibition was TLR2 linked.

4) Probenecid, an ABCA1 antagonist, a first “therapeutic mice trial”

Given the confirmation that extracellular calpains are potential targets to modulate immune response during melanoma, we were interested in probenecid, an antagonist of ABCA1. Probenecid is a commercialized molecule used for the treatment of hyperuricemia *via* its renal effects of organic anion transporter inhibitor which permits higher uric acid excretion in the urine. As already described by Perez *et al*, calpains could be excreted through a mechanism involving ABCA1 activity, making this transporter a target for extracellular calpain modulation. At first, we tested in vitro probenecid effect on extracellular and cellular calpains activity. Lymphocytes were first activated with anti CD3 antibody and then exposed to probenecid during 4 hours. Calpain activity in medium and on cells were then measured. Increasing probenecid dosages showed a decrease of extracellular calpain activity associated with an increase of intracellular activity (Figure 6 A). In the same time we found an increase of TLR2 lymphocyte expression (Figure 6 B).

After this first confirmation, we wondered if in vivo probenecid has beneficial effects on melanoma evolution. We used 6 WT mice as control and 6 WT mice receiving 50mg/kg probenecid at 0, 5 and 10 days after melanoma cell injection and tumor growth was monitored as already described. We found a significant decrease in tumor growth with a significant difference on tumor weight at day 15 ($p=0.026$, Figure 6 C D, 2 ± 0.4 vs 0.63 ± 0.4 grams, $n=6$ vs $n=6$). We have tried to study TLR2 modification in this model but half of probenecid treated mice had too small tumor size to complete flow cytometry analysis or western blot. We only found a trend toward increased TLR2 expression in the sickest treated mice compared to not treated mice ($p=0.16$, not show, 63.2 ± 15.64 vs 128 ± 68.25 MFI, $n=6$ vs $n=3$). Inflammatory cell infiltration study was not possible in these mice for the same reasons.

Conclusion and in course project

Our first results confirm that extracellular calpain inhibition is susceptible to modulate in vivo tumor evolution.

This effect is at least partially mediated by immune in situ modulation with a TLR2 cleavage and lymphocyte infiltration. Investigations to understand the exact mechanism of calpain inhibition immune modification are undertaken. Indeed we need to investigate the effect of calpain inhibition particularly on lymphocyte CD4+ polarisation with a specific look on Th1, Th17 and Treg.

CRP Calpast mice treated with TLR2 agonist seemed to confirm that calpain inhibition could act through TLR2 preservation. But this result could be discussed; WT mice had also an important response to treatment. This suggests a cumulative effect in CRP Calpast mice of TLR2 stimulation (share with WT treated mice) and another unknown mechanism. The answer will be brought by a TLR2 knock-out mice study.

Extracellular externalisation is mediated through an ABCA1 mechanism. Probenecid is a known ABCA1 inhibitor without any direct anti-tumoral action. Probenecid has been used as a co-stimulator with chemotherapy to limit renal excretion, and seems to limit major phenotype of multidrug resistance (MDR) through its inhibition of ABC transporters^{22,23}. Here we report an original action of probenecid, with a direct anti-tumoral action. If we confirm probenecid action on TLR2 membrane preservation, its action could be double: first through calpain excretion inhibition and second through mobilization of lipid rafts bringing TLR2 to the membrane²⁴. Current data cannot conclude to a direct immunomodulatory effect of probenecid and cannot exclude a direct toxicity.

Our study will be continued with several investigational axes. 1/ in vitro confirmation that probenecid inhibits calpains excretion and limits by this way TLR2 expression in lymphocyte and +/- in melanoma cells, 2/ in vitro probenecid effect on proliferation and toxicity in B16-F10 cells 3/ probenecid effect on in vivo polarisation and in vitro stimulated lymphocytes 4/ to argue for a TLR2 mediated effect of probenecid we will test probenecid melanoma model in TLR2 knockout mice. If we achieve to demonstrate the immunomodulatory effect of probenecid, the latter would be a promising therapeutic for the treatment of melanoma especially in patients showing resistance to other already existing drugs.

Figure:

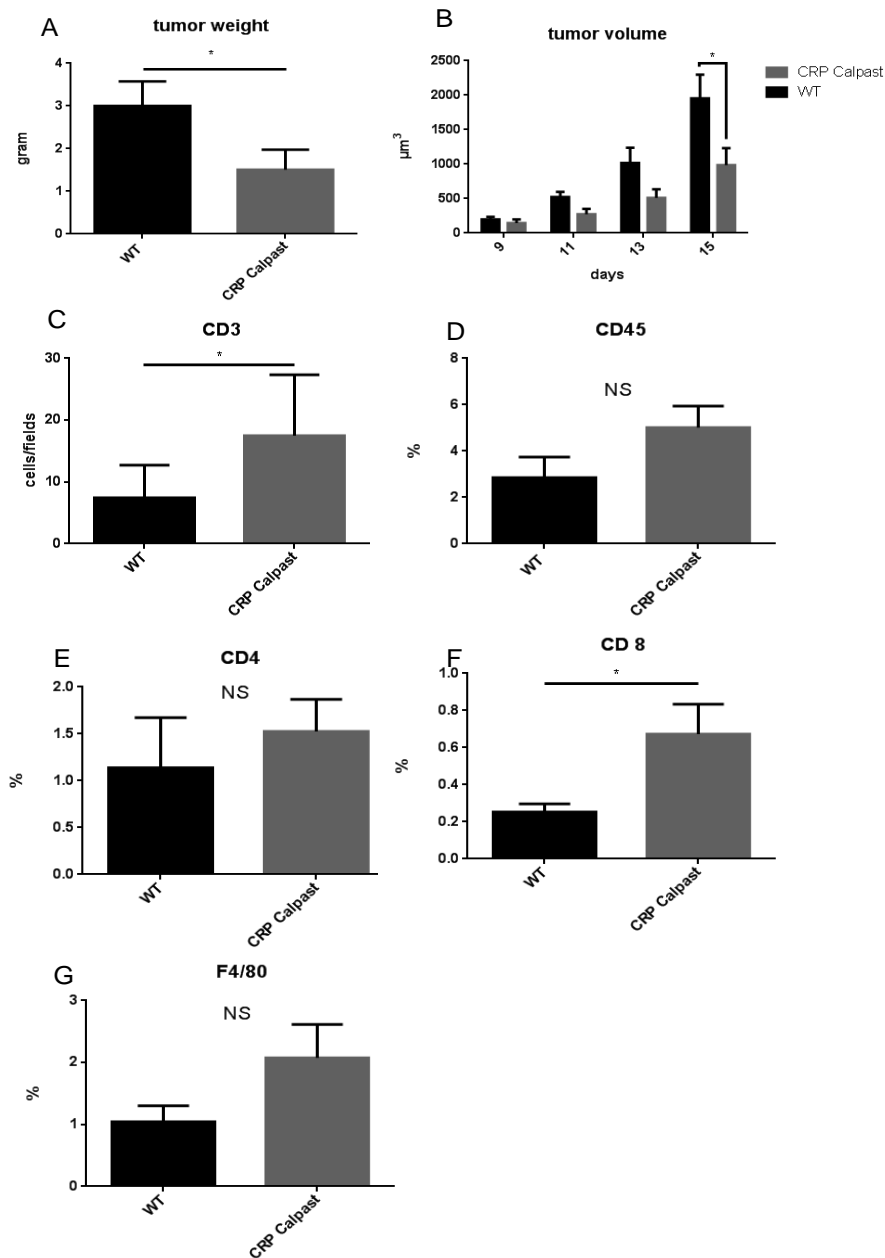


Figure 1: **Extracellular calpains inhibition in melanoma models:** 9 C57BL/6 control (WT) and 9 transgenic mice (CRP Calpast) were injected with one million melanoma B16-F10 cells and sacrificed at day 15 for tissues analysis. A Tumor weight at day 15. Extracellular calpains inhibition decreased significantly tumor weight, * $p < 0.05$. B tumor volume was estimated from day 9 to day 15. Extracellular calpains inhibition decreased significantly tumor growth, * $p < 0.05$. C CD3 analysis in immunohistochemistry (200x). Extracellular calpains inhibition increased significantly lymphocyte infiltration, * $p < 0.05$. D E F G Flow cytometry analyse of immune infiltration melanoma CD45+, F4/80+, CD4+ and CD8+, ns=non significant, * $p < 0.05$.

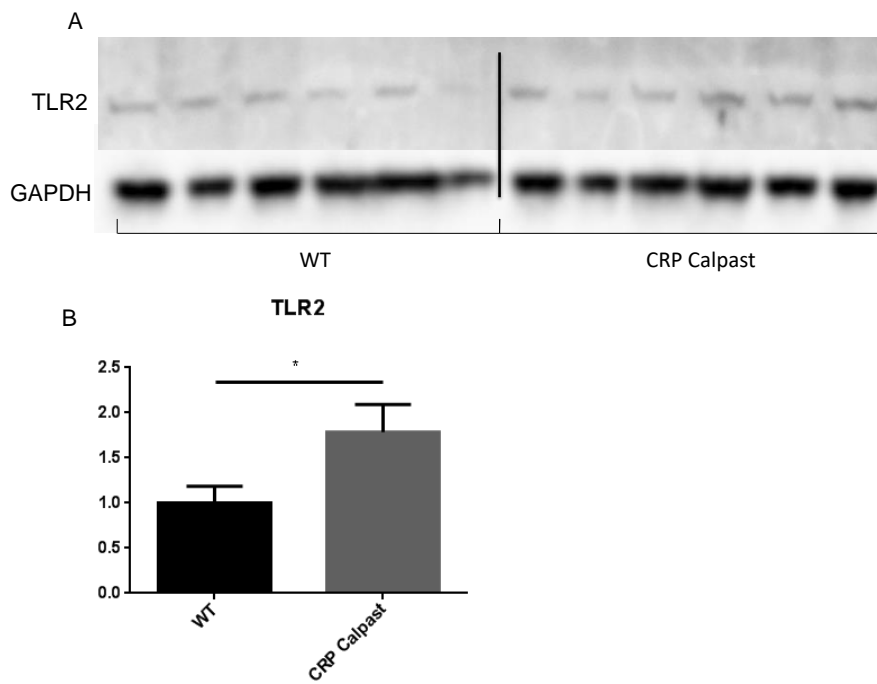


Figure 2: **Western blot analyse of melanoma protein in WT and CRP Calpast.** A TLR2 native (100kDa) was more preserved in CRP Calpast mice, B analyzed was made on optic density ratio of TLR2 and GAPDH (reference protein), * $p < 0.05$.

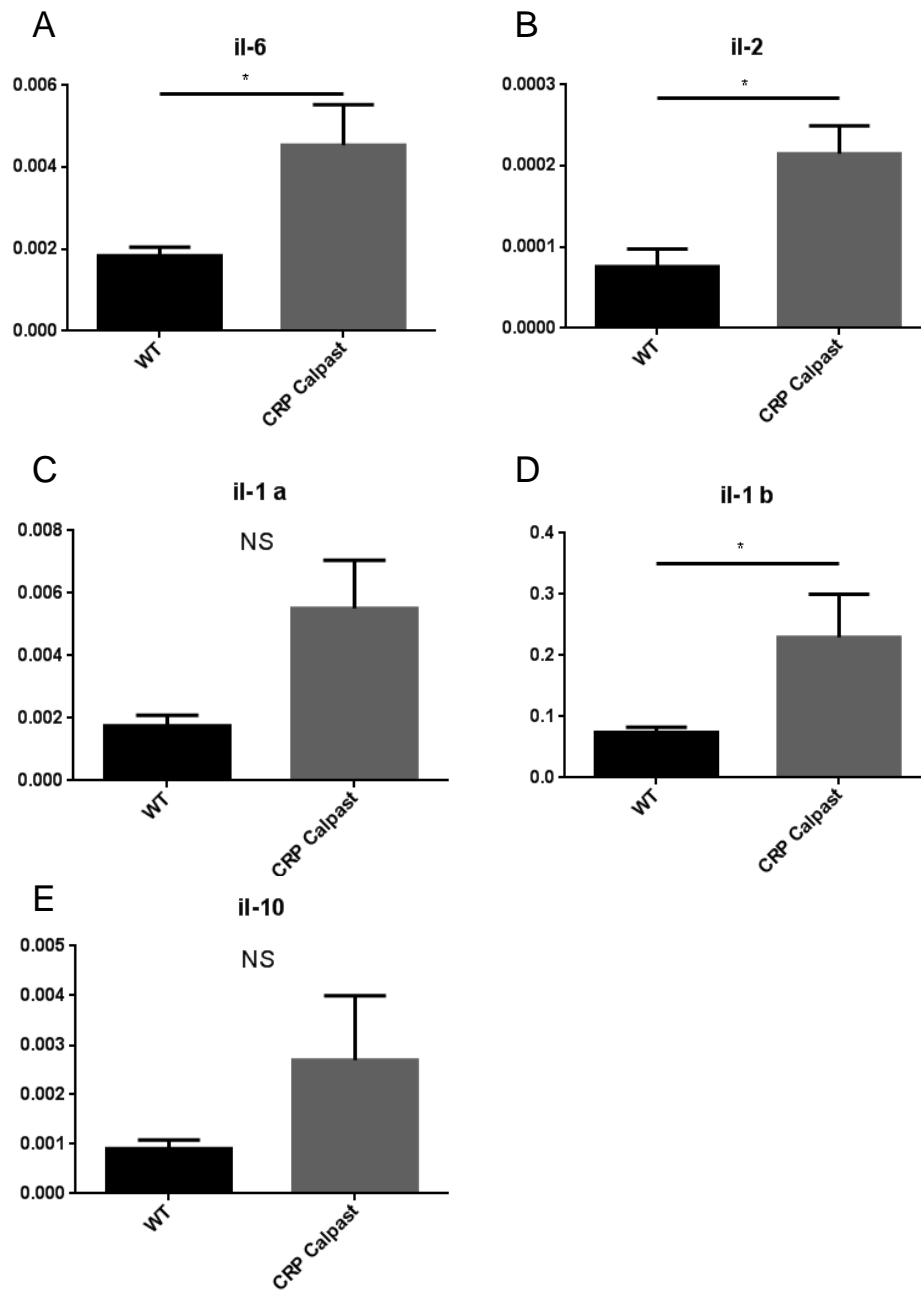


Figure 3: **qPCR cytokine expression in melanoma from WT and CRP Calpast express in 2^{-Act}**. CRP Calpast first analysis of cytokine panel expression showed a global increase of inflammation in CRP Calpast (A,B,C,D,E), *p<0.05.

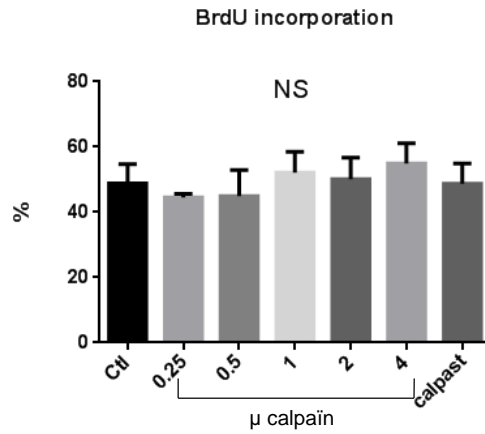


Figure 4: **Extracellular calpain activity effect on B16-F10 cells proliferation:** Melanoma cells BRDU incorporation was measured by flow cytometry after 4 hours calpain or calpastatin exposition as described. There was no significant effect of any conditions compare with control (ctl).

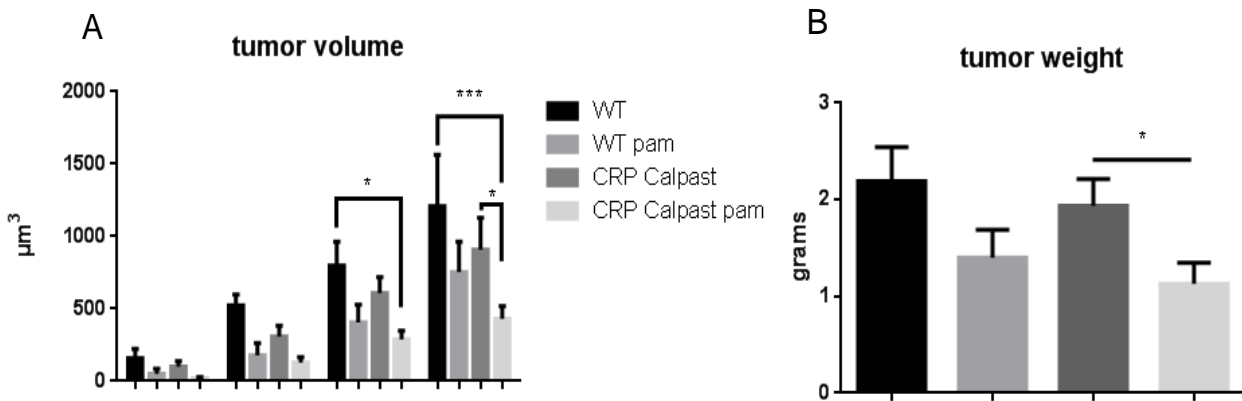


Figure 5: **TLR2 in vivo stimulation with PAM3CSK4 (pam) amplified calpain extracellular inhibition:** A Evolution of tumor volume, growth evolution of CRP Calpast pam compare to WT decreased significantly at day 13 and 15 and growth evolution of CRP Calpast pam compare to CRP Calpast decreased significantly at day 15, * $p < 0.05$ *** $p < 0.01$. B Tumor weight at day 15: PAM3CSK4 improved tumor weight significantly only in CRP Calpast mice and not in WT, * $p < 0.05$.

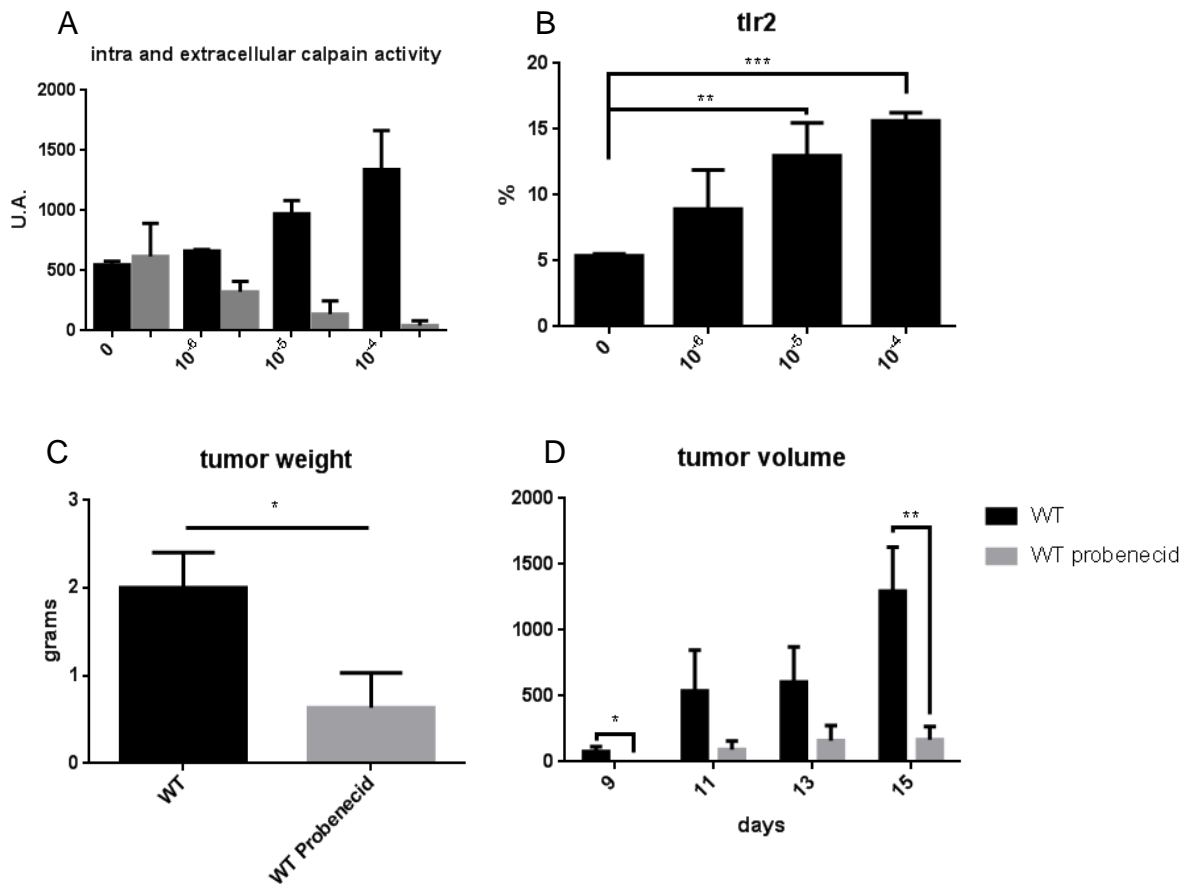


Figure 6: **Effect of ABCA1 pharmacologic inhibition in vitro and in vivo:** A. In vitro log dose probenecid (mM) show extracellular calpains inhibition and increase of cellular calpain activity (n=3 in course) (grey: extracellular activity, black: intracellular activity). B In vitro probenecid (mM) show extracellular TLR2 higher expression with increasing concentration, **p<0.01 ***p<0.005. C Tumor weight at day 15: probenecid limited significantly melanoma weight at day 15, *p<0.05. D Evolution of tumor volume was significantly decreased with probenecid administration, *p<0.05 **p<0.01.

Bibliography

1. Goll, D. E., Thompson, V. F., Li, H., Wei, W. & Cong, J. The calpain system. *Physiol. Rev.* **83**, 731–801 (2003).
2. Saito, K., Elce, J. S., Hamos, J. E. & Nixon, R. A. 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.* **90**, 2628–2632 (1993).
3. Letavernier, E. *et al.* Targeting the calpain/calpastatin system as a new strategy to prevent cardiovascular remodeling in angiotensin II-induced hypertension. *Circ. Res.* **102**, 720–728 (2008).
4. Letavernier, E. *et al.* Critical role of the calpain/calpastatin balance in acute allograft rejection. *Eur. J. Immunol.* **41**, 473–484 (2011).
5. Shumway, S. D., Maki, M. & Miyamoto, S. The PEST domain of I κ B α is necessary and sufficient for in vitro degradation by μ -calpain. *J. Biol. Chem.* **274**, 30874–30881 (1999).
6. Kim, Y. S. *et al.* The role of calpains in ligand-induced degradation of the glucocorticoid receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **374**, 373–377 (2008).
7. Storr, S. J., Thompson, N., Pu, X., Zhang, Y. & Martin, S. G. Calpain in Breast Cancer: Role in Disease Progression and Treatment Response. *Pathobiol. J. Immunopathol. Mol. Cell. Biol.* **82**, 133–141 (2015).
8. Storr, S. J. *et al.* Expression of the calpain system is associated with poor clinical outcome in gastro-oesophageal adenocarcinomas. *J. Gastroenterol.* **48**, 1213–1221 (2013).
9. Braun, C. *et al.* Expression of calpain I messenger RNA in human renal cell carcinoma: correlation with lymph node metastasis and histological type. *Int. J. Cancer* **84**, 6–9 (1999).
10. Zhang, C. *et al.* Prognostic significance of Capn4 overexpression in intrahepatic cholangiocarcinoma. *PLoS One* **8**, e54619 (2013).
11. Huttenlocher, A. *et al.* Regulation of cell migration by the calcium-dependent protease calpain. *J. Biol. Chem.* **272**, 32719–32722 (1997).
12. Liu, L., Xing, D. & Chen, W. R. Micro-calpain regulates caspase-dependent and apoptosis inducing factor-mediated caspase-independent apoptotic pathways in cisplatin-induced apoptosis. *Int. J. Cancer* **125**, 2757–2766 (2009).
13. Zheng, X. *et al.* Hypoxia-induced and calpain-dependent cleavage of filamin A regulates the hypoxic response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 2560–2565 (2014).
14. Raimbourg, Q. *et al.* The calpain/calpastatin system has opposing roles in growth and metastatic dissemination of melanoma. *PLoS One* **8**, e60469 (2013).

15. Szomor, Z. *et al.* Externalization of calpain (calcium-dependent neutral cysteine proteinase) in human arthritic cartilage. *Clin. Exp. Rheumatol.* **17**, 569–574 (1999).
16. Letavernier, B. *et al.* Calpains contribute to vascular repair in rapidly progressive form of glomerulonephritis: potential role of their externalization. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **32**, 335–342 (2012).
17. Perez, J. *et al.* Calpains Released by T Lymphocytes Cleave TLR2 To Control IL-17 Expression. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **196**, 168–181 (2016).
18. Leach, D. R., Krummel, M. F. & Allison, J. P. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* **271**, 1734–1736 (1996).
19. Lee, L., Gupta, M. & Sahasranaman, S. Immune Checkpoint inhibitors: An introduction to the next-generation cancer immunotherapy. *J. Clin. Pharmacol.* **56**, 157–169 (2016).
20. Muranski, P. *et al.* Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. *Blood* **112**, 362–373 (2008).
21. Zhang, Y. *et al.* TLR1/TLR2 agonist induces tumor regression by reciprocal modulation of effector and regulatory T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **186**, 1963–1969 (2011).
22. Fury, M. G. *et al.* A phase I clinical pharmacologic study of pralatrexate in combination with probenecid in adults with advanced solid tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **57**, 671–677 (2006).
23. Campos-Arroyo, D., Martínez-Lazcano, J. C. & Melendez-Zajgla, J. Probenecid is a chemosensitizer in cancer cell lines. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **69**, 495–504 (2012).
24. Zhu, X. *et al.* Macrophage ABCA1 reduces MyD88-dependent Toll-like receptor trafficking to lipid rafts by reduction of lipid raft cholesterol. *J. Lipid Res.* **51**, 3196–3206 (2010).

Discussion et perspective

1) Discussion

A) Implications du système calpaïnes-calpastatine au cours du vieillissement

Nous avons pu démontrer dans le cadre de ce travail que l'inhibition spécifique des calpaïnes μ et m par la surexpression systémique de la calpastatine protégeait contre les effets du vieillissement. Il était connu depuis plusieurs décennies que les calpaïnes ou du moins leur activité augmente dans le cerveau avec l'âge, jouant un rôle important dans le développement des processus neurodégénératifs comme la maladie d'Alzheimer^{1,252}. Plus récemment, le bénéfice de l'inhibition des calpaïnes, par des moyens pharmacologiques ou génétiques, a été démontré dans des modèles de pathologies neurologiques. Ainsi, l'administration d'inhibiteurs pharmacologiques des calpaïnes à des rats affectés de lésions cérébrales proches de la maladie d'Alzheimer a permis d'améliorer les capacités cognitives et la transmission synaptique chez ces animaux²⁵³. Cette amélioration serait due à une interaction des calpaïnes avec le facteur de transcription CREB, leur inhibition restaurant une phosphorylation normale de ce facteur. D'autre part, l'inhibition spécifique de l'activité calpaïne par la calpastatine a permis de prévenir la dégénération des neurones et la restauration d'une durée de vie normale chez les souris tau P301L, un modèle murin mimant une partie des lésions cérébrales de la maladie d'Alzheimer²⁵⁴. Cette protection était attribuée à la diminution des formes toxiques de la protéine tau induite par l'activité calpaïne. A ce jour, nos travaux sont les seuls à démontrer une protection « systémique » et pas seulement cérébrale de l'inhibition spécifique des calpaïnes contre les effets du vieillissement. Récemment, il a été démontré qu'un inhibiteur des protéases (BDA-410) était capable d'inhiber les effets du vieillissement induit par la délétion de Klotho mais la spécificité des inhibiteurs pharmacologiques vis-à-vis des calpaïnes est toujours sujette à caution¹⁶⁰. La protection contre le vieillissement observée dans notre modèle génétique était suffisamment importante pour être évidente simplement en observant le phénotype des souris âgées de 2 ans. La première série d'animaux transgéniques pour la calpastatine (CalpTG) et de contrôles a été hébergée en zone exempte de pathogènes spécifiques dans l'animalerie de l'unité. Lorsque les animaux ont été

accessibles au bout de 2 ans, il a été surprenant de constater que les souris CalpTG avaient conservé un phénotype de “jeunes” souris, avec un pelage non altéré et une mobilité comparable aux jeunes souris. Outre la peau, tous les organes analysés étaient moins atteints par les effets de l’âge. L’hypertrophie du muscle cardiaque et des media artérielles était moins prononcée chez les animaux transgéniques, les reins de ces animaux présentaient moins de sclérose glomérulaire, moins de fibrose interstitielle et moins de lésions vasculaires. Le raccourcissement astrocytaire observé avec l’âge était moindre également.

A l’origine, ce travail a été motivé par la démonstration que l’inhibition spécifique des calpaïnes in vivo par la surexpression de la calpastatine protège contre les lésions vasculaires et cardiaques induites par l’angiotensine 2, et ce indépendamment de la pression artérielle¹³⁵. Les souris CalpTG ont en effet une réponse réduite à la signalisation intracellulaire induite par la fixation de l’angiotensine 2 sur son récepteur AT1 et notamment une moindre activation du facteur de transcription NF- κ B dans le rein et le cœur, ce qui est cohérent avec l’effet connu des calpaïnes sur le clivage de I κ B α ³³. Dans ce modèle, la surexpression de la calpastatine a permis de réduire très spectaculairement l’inflammation périvasculaire induite par l’angiotensine 2. Scalia et ses associés ont par la suite mis en évidence que les calpaïnes sont impliquées dans la dysfonction endothéliale induite par l’angiotensine 2 via son récepteur AT1R, les calpaïnes dégradant I κ B α et augmentant la synthèse via NF- κ B de molécules d’adhésion cellulaire à la surface des cellules endothéliales²⁵⁵. De plus, un rôle pivot des calpaïnes a été démontré dans l’athérosclérose favorisée par l’angiotensine 2, impliquant les cellules immunitaires¹³⁴. En effet, la surexpression de calpastatine par les cellules dérivées de la moelle osseuse permet de diminuer l’inflammation et les lésions d’athérosclérose et influence les fonctions macrophagiques in vitro en diminuant les propriétés d’adhérence et de migration des monocytes-macrophages. Globalement, ces études ont démontré que les calpaïnes sont de puissants médiateurs des lésions tissulaires notamment rénales et vasculaires induites par le système rénine-angiotensine (SRA), indépendamment de la pression artérielle, et impliquant les cellules immunes.

Au cours de ces dernières années, les données se sont accumulées suggérant que le SRA et en particulier l’angiotensine 2 sont des acteurs du développement des lésions vasculaires et rénales apparaissant avec le vieillissement²⁵⁶. L’inactivation génétique du gène codant pour le récepteur AT1a de l’angiotensine 2 permet en effet de prévenir le développement de l’hypertrophie et de la fibrose cardiaque qui apparaissent avec l’âge, indépendamment de toute hypertension artérielle, et permet même d’augmenter la durée de vie des animaux génétiquement modifiés¹⁵¹. Les

animaux déficients pour le récepteur AT1a développent moins de lésions liées au stress oxydant. Dans une moindre mesure, l'inhibition pharmacologique du SRA peut également protéger contre les lésions liées à l'âge dans des modèles murins^{257,258}. Si l'ensemble de ces observations nous a incité à spéculer que l'inhibition spécifique et prolongée des calpaïnes pourrait diminuer les lésions rénales et vasculaires médiées par le SRA au long cours, il est intéressant de noter que nous avons observé une protection contre le vieillissement dans tous les organes analysés (cœur, reins, aorte, mais également peau et cerveau). Toutefois, les résultats ont été particulièrement spectaculaires dans les reins et les vaisseaux. De façon notable, la protection observée contre les lésions liées au vieillissement ressemble à celle observée lors de la perfusion prolongée d'angiotensine 2 avec une moindre hypertrophie du muscle cardiaque et des media artérielles, et moins d'inflammation tissulaire et périvasculaire¹³⁵. Il est intéressant de noter que les analyses réalisées sur des animaux de un an n'ont pas mis en évidence de modifications hémodynamiques chez les souris transgéniques pour la calpastatine, ce qui exclut l'hypothèse d'une protection qui serait liée à une moindre pression artérielle.

Les reins des souris transgéniques ont révélé moins de fibrose interstitielle, des lésions glomérulaires moindres, des marqueurs d'atteinte tubulaire (Kim-1) moins prononcés et moins de lésions vasculaires, ainsi qu'une fonction rénale (créatininémie) discrètement préservée (mais peu altérée globalement). Ainsi, tous les « compartiments » du rein sont préservés contre les lésions liées au vieillissement. Les marqueurs de senescence qui sont considérés comme le reflet de la réponse au stress oxydant, notamment P21 et l'activité de la bêta-galactosidase rénale, étaient très fortement réduits chez ces animaux transgéniques pour la calpastatine. D'autre part, le raccourcissement des télomères, marqueur de sénescence répllicative, était moindre également dans les reins et la peau de ces souris, ce qui n'était pas nécessairement attendu et résulte vraisemblablement de la protection globale des tissus plus que d'une influence spécifique sur l'activité télomérase. Des cellules tubulaires issues de souris CalpTG et contrôles ont été cultivées in vitro et nous n'avons pas observé de différence dans le raccourcissement progressif des télomères ou dans l'expression des marqueurs de sénescence cellulaire (activité bêta-galactosidase, P21), ce qui est un argument important pour penser que la protection contre le vieillissement observée in vivo n'est pas un processus interne aux cellules épithéliales mais est lié à une réponse à des stimuli extracellulaires. Les analyses différentielles détaillées du transcriptome du cortex rénal (RNA-Seq) chez les souris âgées de 2 ans ont mis en évidence que les voies de signalisation les plus influencées par le transgène calpastatine sont celles liées aux

processus inflammatoires, et en particulier des ARN messagers codants pour des protéines de l'immunité innée, régulés par le facteur de transcription NF- κ B et impliqués dans la formation de l'inflammasome NLRP3. Nous avons confirmé que l'infiltrat tissulaire rénal par les macrophages était réduit chez les souris CalpTG. Des analyses complémentaires par cytométrie en flux tissulaire ont été réalisées et ont confirmé que la proportion de macrophages par rapport aux cellules rénales était plus basse chez les animaux sur-exprimant la calpastatine, mais sans mettre en évidence de polarisation de ces macrophages préférentiellement vers un type M1 ou M2. Ces observations suggèrent que les calpaïnes participent au recrutement des cellules inflammatoires mais, du moins à deux ans alors que les lésions sont installées, ne semblent pas jouer de rôle dans la polarisation des macrophages.

L'équipe d'accueil a pu démontrer précédemment que les souris CalpTG étaient protégées contre les lésions inflammatoires dans divers modèles affectant en particulier le rein comme la glomérulonéphrite expérimentale induite par un sérum anti-membrane basale glomérulaire, le sepsis induit par la perforation caecale, le rejet d'allogreffe ou encore la néo-angiogenèse rénale^{6,251}. Nos observations démontrent toutefois pour la première fois que l'inhibition spécifique des calpaïnes protège contre l'inflammation liée au vieillissement ou « inflammaging », et contre les lésions liées au vieillissement dans d'autres organes que le cerveau. Le terme « inflammaging » décrit un état d'inflammation de bas grade systémique qui se développe avec l'âge en l'absence d'infection ou de pathologie inflammatoire spécifique⁹⁴. Il est particulièrement intéressant de noter que les voies de l'inflammation régulées par les calpaïnes et les voies classiques de l'«inflammaging » partagent des similitudes importantes. Un des principaux médiateurs de cet inflammaging est l'activation de l'inflammasome NLRP3 par le stress oxydant et le métabolisme mitochondrial. NLRP3 est un complexe multi-protéique activant la caspase 1 et favorisant la production et notamment la maturation des interleukines 1 α , 1 β et 18²⁵⁹. La sénescence cellulaire est caractérisée par la sécrétion de protéines spécifiques, incluant des cytokines pro-inflammatoires (senescence associated secretory phenotype ou SASP), incluant les interleukines 1 α et 1 β , 6 et 8 ou encore le TNF- α pour les plus connues^{260,261}. NF- κ B régule l'expression de la majorité de ces gènes et logiquement son rôle dans la promotion du SASP a été envisagé^{262,263}. NF- κ B a été récemment impliqué comme favorisant le vieillissement cérébral et d'autres tissus^{264,265}.

Les calpaïnes ubiquitaires μ et m sont des protéases pro-inflammatoires qui agissent via plusieurs mécanismes pour promouvoir l'inflammation tissulaire, détaillés dans l'introduction de ce manuscrit. Pour mémoire, elles participent à la réorganisation du cytosquelette des cellules

inflammatoires, favorisant leur migration vers les foyers inflammatoires, elles dégradent la protéine HSP-90, limitant l'effet des glucocorticoïdes endogènes et favorisent la diapédèse en modifiant l'architecture des cellules endothéliales^{58,266,267}. Un de leurs principaux rôles dans le développement de la réaction inflammatoire est leur capacité à cliver, et donc dégrader, I κ B α sur une séquence d'acides aminés spécifique de type PEST, augmentant ainsi l'activité de NF- κ B. L'équipe d'accueil et d'autres groupes ont pu confirmer que la translocation nucléaire et l'activité de NF- κ B étaient diminués chez les souris CalpTG, dans le cadre de modèles inflammatoires et de lésions vasculaires¹³⁵. Enfin, les calpaïnes sont spécifiquement impliquées dans la maturation de l'interleukine-1 α , transformant le précurseur intracellulaire de 33 kDa en une cytokine pro-inflammatoire sécrétée de 17 kDa⁶¹.

Le profil d'expression du génome réalisé sur le cortex rénal d'animaux âgés de 2 ans a révélé que la production de cytokines dépendantes de NF- κ B et impliquées dans la réponse immune innée était diminuée par la surexpression de calpastatine. In vitro, la synthèse des ARN messagers de l'interleukine-1 α et de l'interleukine-1 β , en réponse au LPS et aux activateurs classiques de l'inflammasome était globalement moindre dans les macrophages, ce qui est cohérent avec le rôle des calpaïnes dans l'activation de NF- κ B. Toutefois, seule la sécrétion d'interleukine1 α dans le milieu a été significativement impactée par l'inhibition spécifique des calpaïnes en réponse aux activateurs particuliers de l'inflammasome (urate de sodium, silice), mais pas en réponse aux activateurs non particuliers (ATP, nigericine). Cette observation confirme la description par Gross et ses associés du rôle particulier de ces activateurs particuliers dans la production d'interleukine1 α de façon partiellement indépendante de l'inflammasome NLRP3 mais impliquant un signal calcique et l'activation des calpaïnes⁶¹. Toutefois, in vivo, dans le cadre du modèle de péritonite induite par l'urate de sodium, la production d'interleukine-1 α et d'interleukin-1 β était réduite chez les souris CalpTG, suggérant que la production de cytokines dans ce contexte fait intervenir des voies multiples et qu'il existe des boucles d'amplification de la réponse inflammatoire.

Nous n'avons malheureusement pas observé d'augmentation de la durée de vie des animaux transgéniques pour la calpastatine. Ceci était dû au développement de syndromes lymphoprolifératifs affectant en particulier la rate. L'équipe d'accueil a précédemment décrit que les calpaïnes sont impliquées dans le clivage de la chaîne gamma commune (γ C) permettant la réponse des splénocytes à l'interleukine-2 notamment⁶. Ainsi, la prolifération lymphocytaire en réponse à l'interleukine-2 est-elle accrue par la surexpression de calpastatine, ce qui pourrait

expliquer le phénotype splénique parfois létal. D'autre part, nous avons montré dans un travail figurant dans ce manuscrit que les calpaïnes intracellulaires jouent à la fois un rôle pro-tumoral mais également anti-tumoral en favorisant l'apoptose des cellules cancéreuses et en permettant une réponse immune adaptée ¹⁹⁴. Leur inhibition chronique pourrait donc favoriser l'émergence de pathologies tumorales.

Nous avons donc mis en évidence que les calpaïnes sont un médiateur essentiel de l'inflammaging, particulièrement dans le rein et les vaisseaux, et que leur inhibition au long cours peut réduire l'impact du vieillissement. Parmi les mécanismes, la production de cytokines reliées au SASP et la maturation de l'interleukine-1 α sont clairement impactés par l'inhibition des calpaïnes. Ces travaux démontrent de façon plus générale le rôle de l'inflammation chronique à bas bruit dans le vieillissement rénal et vasculaire.

D'autre part, le rôle complexe des calpaïnes dans l'oncogénèse est illustré par l'importance des syndromes lymphoprolifératifs dans ce modèle.

B) Calpaïnes intra et extracellulaires et oncogénèse

Dans le cadre d'un premier travail, il avait pu être démontré que les calpaïnes jouent un rôle complexe dans l'oncogénèse, en utilisant pour cela un modèle de mélanome murin¹⁹⁴. En inhibant spécifiquement l'activité des calpaïnes par la surexpression de la calpastatine soit dans le mélanome injecté aux souris, soit dans l'animal recevant cette tumeur (modèle CalpTG décrit précédemment), un rôle à la fois pro- et anti-tumoral des calpaïnes a ainsi été mis en évidence. En effet, les calpaïnes favorisent la prolifération des mélanocytes ainsi que la néo-angiogénèse induite par les tumeurs, ce qui augmente le développement tumoral. Toutefois, les calpaïnes augmentent également l'apoptose des cellules tumorales, du moins dans ce modèle, et les cellules sur-exprimant la calpastatine échappent au processus d'apoptose, favorisant le développement de métastases probablement en partie par ce biais. D'autre part, la réponse immune anti-tumorale est affectée par l'inhibition des calpaïnes intracellulaires.

Dans ce premier travail, seules les calpaïnes intracellulaires avaient été envisagées comme un médiateur potentiel de la tumorigénèse. La prise en considération d'un rôle propre des calpaïnes extracellulaires dans le développement tumoral a fait l'objet d'un travail spécifique présenté ici.

Comme détaillé dans l'introduction, l'équipe d'accueil a mis en évidence un rôle spécifique des calpaïnes externalisées dans le contrôle de la réponse immune qui est, par bien des aspects, opposé au rôle des calpaïnes intracellulaires²⁶⁸. Il a pu être montré que les calpaïnes intracellulaires peuvent être externalisées hors des cellules et notamment des lymphocytes par le transporteur ABCA1, peut être par la formation de microparticules (phénomène de flip-flop membranaire). Hors des cellules, les calpaïnes clivent TLR2, un récepteur impliqué dans la réponse immune et notamment la production d'interleukine-17A⁷³. Les calpaïnes extracellulaires bloquent ainsi cette réponse. Grâce au développement d'une souris transgénique qui surexprime uniquement la calpastatine extracellulaire, synthétisée par le foie en réponse aux stimuli inflammatoires, sécrétée puis circulant dans le sang (souris CRP-Calpast), l'équipe d'accueil a pu démontrer que l'inhibition des calpaïnes extracellulaires jouait un rôle pro-inflammatoire in vivo (alors que l'inhibition des calpaïnes intracellulaires joue un rôle anti-inflammatoire). Or, une réponse immune appropriée et notamment l'activation de TLR2 sont nécessaires pour une réponse anti-tumorale adaptée²⁴⁵.

Dans un premier temps, nous avons testé à l'aide du modèle d'injection de mélanome sous-cutané si l'inhibition des calpaïnes extracellulaires uniquement pouvait favoriser le développement tumoral et en effet, le volume tumoral ainsi que le poids du mélanome 15 jours après l'injection étaient moindres chez les souris CRP-Calpast, qui présentaient un infiltrat inflammatoire, notamment de lymphocytes T CD8+, plus important dans les tumeurs analysées, suggérant une réponse anti-tumorale accrue. Nous avons d'autre part, pu mettre en évidence que l'expression de TLR2 intact était préservée dans les tumeurs de ces animaux, ce qui confirme le rôle clé des calpaïnes dans le clivage de ce récepteur. Enfin, les cytokines induites par les voies de signalisation en aval de TLR2 étaient augmentées chez les animaux CRP-Calpast. Afin de confirmer que les effets sur la croissance tumorale impliquaient bien TLR2, nous avons effectué des expérimentations complémentaires en injectant à intervalles réguliers un agoniste de TLR2, le Pam3Cys. L'injection de cet agoniste a permis de réduire la croissance des tumeurs chez tous les animaux mais proportionnellement encore plus chez les animaux transgéniques qui ont une expression conservée de TLR2, ce qui suggère un rôle important de TLR2 dans cette réponse anti-tumorale. Ces travaux étaient motivés par la recherche de nouveaux traitements anti-cancéreux et aux vues de nos résultats, nous avons envisagé que des drogues permettant de bloquer l'efflux des calpaïnes hors des cellules par le transporteur ABCA1 puissent apporter un bénéfice anti-tumoral. Nous avons testé in vitro et in vivo les effets du probénécide qui possède de tels effets. In vitro, le

probénécide diminue l'efflux de calpaïnes hors des splénocytes et préserve ainsi l'expression de TLR2 à leur surface. In vivo, l'injection répétée de probénécide a eu un effet spectaculaire en termes de limitation de la croissance tumorale.

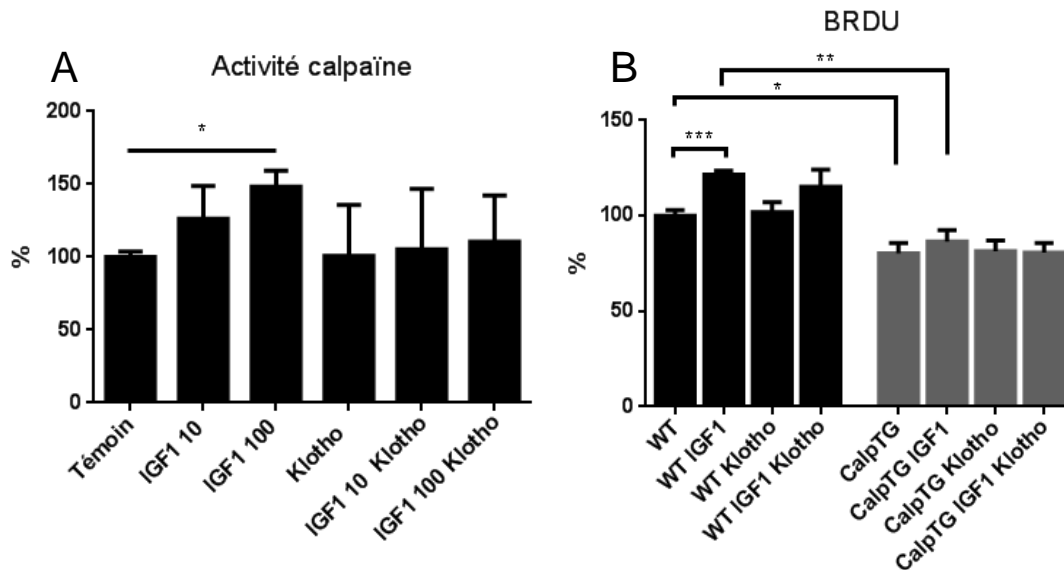
Ainsi, alors que l'inhibition globale des calpaïnes apparait comme difficilement applicable en thérapeutique, l'utilisation de drogues permettant de moduler l'efflux de calpaïnes pourrait être utile, en diminuant cet efflux dans le cadre du cancer, ou en le provoquant dans le cadre de traitements anti-inflammatoires.

2) Perspectives

A) Calpaïnes et vieillissement

Dans le cadre des travaux sur le rôle des calpaïnes au cours du vieillissement, nous nous sommes focalisés sur le rôle de l'inflammation ou inflammaging. Ceci était motivé principalement par les observations des tissus et notamment du tissu rénal, et par les profils d'expression du génome dans le cortex rénal. Il est toutefois envisageable que d'autres mécanismes soient impliqués et nous avons obtenu des résultats le suggérant.

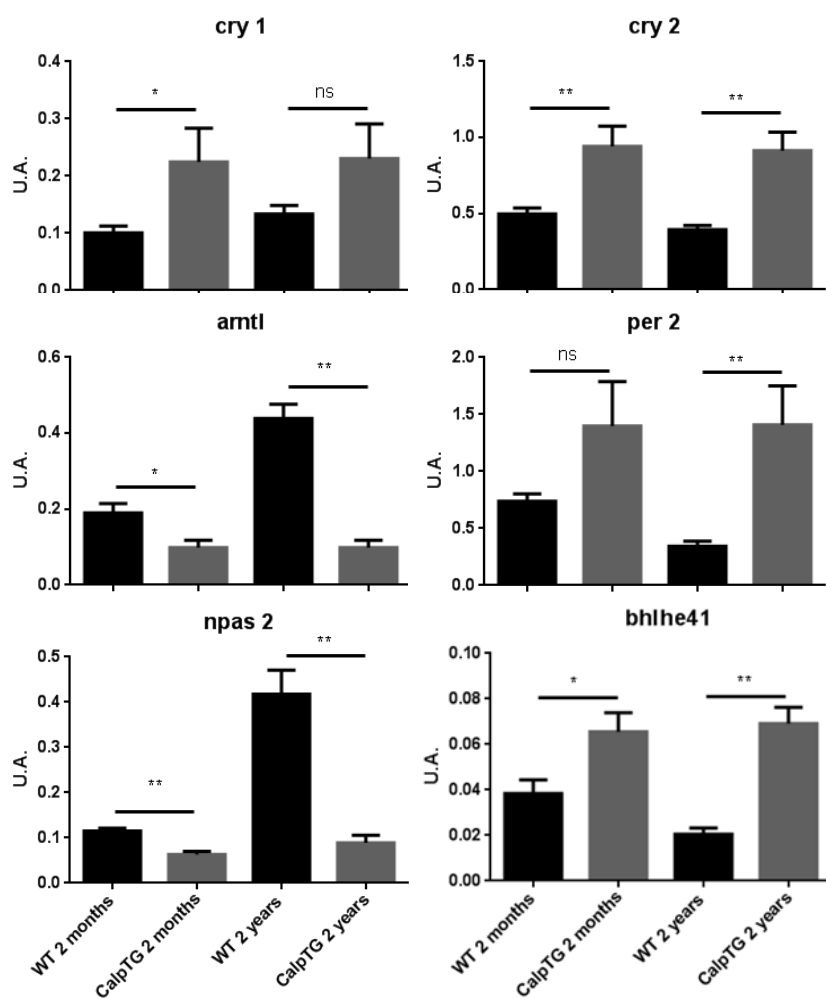
Des travaux antérieurs basés sur des analyses protéomiques ont montré que les souris déficientes en Klotho, affectées par un vieillissement précoce, ont une protéolyse accrue de l'alpha-spectrine, qui s'est avérée liée à une activité accrue de la calpaïne μ ¹⁴⁹. Nous avons pu mettre en évidence in vitro que l'addition de la protéine Klotho recombinante sur des cellules épithéliales rénales permettait de bloquer l'activation des calpaïnes par l'insulin-like growth factor 1 (IGF-1), ce dernier étant un médiateur reconnu du vieillissement (Annexe 1 : A,B)¹⁵². D'autre part, la culture de cellules épithéliales tubulaires provenant de souris CalpTG et de souris contrôles a permis de montrer que la réponse proliférative à l'IGF-1 était diminuée dans les cellules issues des souris transgéniques, témoignant du rôle des calpaïnes dans la réponse cellulaire à l'IGF-1 (Annexe 1 : C). Ces observations in vitro nécessiteront des expérimentations in vivo complémentaires afin d'identifier la régulation par Klotho et IGF-1 de l'activité calpaïne et leur implication éventuelle dans les processus de vieillissement.



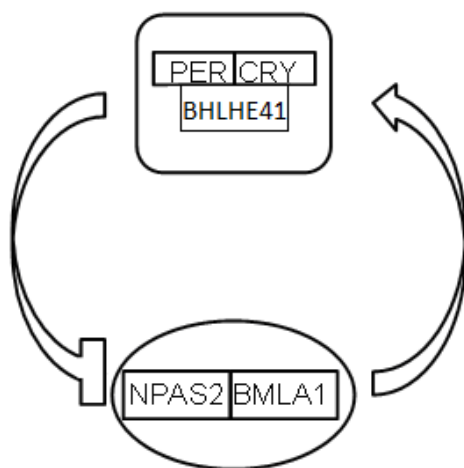
Annexe1 : L'activité des calpaïnes mesurée in vitro sur des podocytes murins immortalisés stimulés par de l'IGF-1 met en évidence un effet positif dose dépendant de l'IGF-1 et cette stimulation des calpaïnes par l'IGF-1 est complètement annulée en présence de Klotho (A). De plus, l'étude de la prolifération de cellules musculaires lisses de souris WT et CalpTG permet de montrer un effet positif des calpaïnes sur la prolifération majoré par l'IGF-1. Cet effet de l'IGF-1 est annulé par Klotho (B).

L'analyse du profil d'expression du génome rénal nous a également permis d'identifier un impact de l'inhibition des calpaïnes sur le rythme circadien. En effet, les voies de signalisation correspondant à la régulation du rythme circadien étaient modifiées. Le rythme circadien module l'expression de gènes sur un rythme de 24h, selon une horloge centrale intracérébrale et des horloges périphériques tissulaires, rythmées par l'environnement et notamment l'alternance jour/nuit. La dérégulation de ce rythme a été impliquée dans de nombreux processus pathologiques et dans le vieillissement²⁶⁹⁻²⁷¹. Nous avons observé que les ARN messagers des gènes *per2* et *cry2* étaient surexprimés dans le rein des souris CalpTG âgées alors que les gènes *arntl* et *npas2* étaient moins exprimés (Annexe 2). Il existe une balance intracellulaire entre ces 2

groupes de gènes impliqués dans le rythme biologique de la cellule sous la dépendance du facteur de transcription CREB, qui est activé une fois phosphorylé. Or l'activation des calpaïnes diminue l'activation de CREB, ce qui correspond au profil d'expression des ARN messagers observé²⁵³. Des expérimentations préliminaires effectuées sur des cellules tubulaires issues de souris CalpTG et contrôles et « synchronisées » avec de la dexaméthasone ont permis d'identifier une perturbation du rythme circadien chez les animaux transgéniques qui reste à confirmer. D'autre part, des expérimentations in vivo seront nécessaires pour confirmer ces résultats concernant le rôle inattendu des calpaïnes dans la régulation du rythme circadien, dont l'implication dans le vieillissement reste toutefois inconnue, et pour analyser si ces modifications dépendent effectivement de la phosphorylation de CREB.



A



B

Annexe 2 : Etude comparative de l'expression par qPCR au niveau rénal de différents gènes impliqués dans le rythme circadien retrouvant une expression différentielle

entre souris WT et CalpTG jeunes et âgées. *PER2*, *CRY1* et *2* et *BHLHE41* sont surexprimés chez les CalpTg alors qu'*ARNTL* (codant pour la protéine BMAL1) et *NPAS2* sont surexprimés chez les souris WT (A). Chacun de ces deux groupes de protéines (*NPAS2/BMAL1* et *PERs/CRYs/BHLHE41*) interagissent et leurs expressions oscillent en alternance par un jeu de répression et stimulation responsable de l'oscillation circadienne (B).

Enfin, l'implication des calpaïnes dans les processus d'autophagie pourrait également expliquer, du moins en partie, leur rôle au cours du vieillissement. L'autophagie désigne la dégradation d'une partie de la cellule par ses propres lysosomes, permettant de maintenir l'intégrité cellulaire⁸⁵. Il existe plusieurs formes d'autophagie qui ne seront pas détaillées ici. Les calpaïnes sont impliquées dans les processus de macroautophagie, et les études les plus récentes suggèrent que l'inhibition des calpaïnes pourrait augmenter l'autophagie^{272,273}. Or le maintien d'une autophagie appropriée est nécessaire à la protection contre le vieillissement, notamment rénal²⁷⁴. Il est donc possible que l'inhibition chronique des calpaïnes, en maintenant des processus d'autophagie adaptés, préserve les cellules rénales contre le vieillissement, ce qui ouvre un nouvel axe de recherche.

B) Calpaïnes extracellulaires et cancer

Nous avons pu montrer que l'inhibition de l'efflux de calpaïnes par le probénécide offre une protection contre le développement du mélanome. Dans la mesure où il s'agit potentiellement d'une application pré-thérapeutique, nous allons effectuer les mêmes expérimentations avec des doses moindres pour vérifier si l'effet anti-tumoral est bien dose-dépendant et s'il peut être atteint avec des doses de probénécide plus proches de celles utilisées en clinique où ce médicament était utilisé comme uricosurique. De plus, nous avons montré *in vitro* que le probénécide permettait de diminuer l'externalisation des calpaïnes mais la spécificité *in vivo* reste à démontrer. Lorsque nous aurons identifié si une dose moindre de probénécide offre une protection anti-tumorale « intermédiaire », nous exposerons des souris CRP-Calpast et contrôles à cette dose de probénécide. Il est attendu que le bénéfice du probénécide sera moindre chez les souris CRP-

Calpast chez les souris contrôles dans ces conditions, ce qui sera un argument pour penser que son action dépend bien de l'inhibition des calpaïnes extracellulaires. D'autre part, nous effectuerons des expériences similaires sur des souris invalidées pour TLR2. Il est attendu que chez ces souris la réponse anti-tumorale soit altérée mais que le probénécide ne modifie pas cette réponse. Enfin, nous avons préalablement observé que les cellules tumorales du mélanome ont une activité calpaïne très importante¹⁹⁴. Il est possible que l'externalisation des calpaïnes hors de ces cellules au sein des tumeurs clive TLR2 et inhibe la réponse immune anti-tumorale. A l'aide de modèles de co-culture de splénocytes et de cellules de mélanome B16F10, nous testerons grâce à des techniques de cytométrie en flux si le clivage de TLR2 des splénocytes est modulé par les cellules tumorales, et éventuellement modifié par le probénécide.

Au total, nos travaux auront permis d'étendre le champ d'étude du rôle des calpaïnes au vieillissement rénal et vasculaire mais également au rythme circadien, ouvert la voie vers des études complémentaires faisant le lien entre Klotho et l'activité calpaïne intracellulaire et mis en évidence le rôle des calpaïnes extracellulaires dans la réponse immune anti-tumorale. Ce dernier aspect laisse entrevoir des perspectives de modulation de l'externalisation des calpaïnes qui pourraient engendrer des applications thérapeutiques dans le domaine du traitement de l'inflammation en augmentant l'efflux vers le secteur extracellulaire ou à l'inverse dans le traitement des tumeurs en diminuant cet efflux, permettant d'optimiser la réponse immune anti-tumorale.

Bibliographie

1. Goll, D. E., Thompson, V. F., Li, H., Wei, W. & Cong, J. The calpain system. *Physiol. Rev.* **83**, 731–801 (2003).
2. Tompa, P., Emori, Y., Sorimachi, H., Suzuki, K. & Friedrich, P. Domain 2I of calpain is a Ca^{2+} -regulated phospholipid-binding domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **280**, 1333–1339 (2001).
3. Wendt, A., Thompson, V. F. & Goll, D. E. Interaction of calpastatin with calpain: a review. *Biol. Chem.* **385**, 465–472 (2004).
4. Schád, E., Farkas, A., Jékely, G., Tompa, P. & Friedrich, P. A novel human small subunit of calpains. *Biochem. J.* **362**, 383–388 (2002).
5. CaMPDB :: Calpain :: Overview. Available at: <http://calpain.org/overview.rb?cls=calpain>. (Accessed: 30th August 2016)
6. Letavernier, E. *et al.* Critical role of the calpain/calpastatin balance in acute allograft rejection. *Eur. J. Immunol.* **41**, 473–484 (2011).
7. Goll, D. E., Thompson, V. F., Taylor, R. G. & Zalewska, T. Is calpain activity regulated by membranes and autolysis or by calcium and calpastatin? *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* **14**, 549–556 (1992).
8. Suzuki, K. & Sorimachi, H. A novel aspect of calpain activation. *FEBS Lett.* **433**, 1–4 (1998).
9. Molinari, M., Anagli, J. & Carafoli, E. Ca^{2+} -activated neutral protease is active in the erythrocyte membrane in its nonautolyzed 80-kDa form. *J. Biol. Chem.* **269**, 27992–27995 (1994).
10. Moldoveanu, T., Gehring, K. & Green, D. R. Concerted multi-pronged attack by calpastatin to occlude the catalytic cleft of heterodimeric calpains. *Nature* **456**, 404–408 (2008).
11. Strobl, S. *et al.* The crystal structure of calcium-free human m-calpain suggests an electrostatic switch mechanism for activation by calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 588–592 (2000).
12. Calpain Research Portal: Calpain Structure and Nomenclature. Available at: <http://calpain.net/3dstructure/index.html>. (Accessed: 30th August 2016)
13. Kitagaki, H. *et al.* Autolysis of calpain large subunit inducing irreversible dissociation of stoichiometric heterodimer of calpain. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 689–695 (2000).
14. Yoshizawa, T., Sorimachi, H., Tomioka, S., Ishiura, S. & Suzuki, K. Calpain dissociates into subunits in the presence of calcium ions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **208**, 376–383 (1995).
15. Yoshizawa, T., Sorimachi, H., Tomioka, S., Ishiura, S. & Suzuki, K. A catalytic subunit of calpain possesses full proteolytic activity. *FEBS Lett.* **358**, 101–103 (1995).
16. Hood, J. L., Brooks, W. H. & Roszman, T. L. Subcellular mobility of the calpain/calpastatin network: an organelle transient. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* **28**, 850–859 (2006).

17. Gil-Parrado, S. *et al.* Subcellular localization and in vivo subunit interactions of ubiquitous mu-calpain. *J. Biol. Chem.* **278**, 16336–16346 (2003).
18. Molinari, M. & Carafoli, E. Calpain: a cytosolic proteinase active at the membranes. *J. Membr. Biol.* **156**, 1–8 (1997).
19. Chakrabarti, A. K., Dasgupta, S., Gadsden, R. H., Hogan, E. L. & Banik, N. L. Regulation of brain m-calpain Ca²⁺ sensitivity by mixtures of membrane lipids: activation at intracellular Ca²⁺ level. *J. Neurosci. Res.* **44**, 374–380 (1996).
20. Cong, J., Goll, D. E., Peterson, A. M. & Kapprell, H. P. The role of autolysis in activity of the Ca²⁺-dependent proteinases (mu-calpain and m-calpain). *J. Biol. Chem.* **264**, 10096–10103 (1989).
21. Hood, J. L., Logan, B. B., Sinai, A. P., Brooks, W. H. & Roszman, T. L. Association of the calpain/calpastatin network with subcellular organelles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **310**, 1200–1212 (2003).
22. Glading, A., Chang, P., Lauffenburger, D. A. & 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.* **275**, 2390–2398 (2000).
23. Shiraha, H., Glading, A., Chou, J., Jia, Z. & Wells, A. Activation of m-calpain (calpain 2) by epidermal growth factor is limited by protein kinase A phosphorylation of m-calpain. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 2716–2727 (2002).
24. Asada, K. *et al.* cDNA cloning of human calpastatin: sequence homology among human, pig, and rabbit calpastatins. *J. Enzym. Inhib.* **3**, 49–56 (1989).
25. Raynaud, P., Jayat-Vignoles, C., Laforêt, M.-P., Levéziel, H. & Amarger, V. Four promoters direct expression of the calpastatin gene. *Arch. Biochem. Biophys.* **437**, 69–77 (2005).
26. Takano, E. & Murachi, T. Purification and some properties of human erythrocyte calpastatin. *J. Biochem. (Tokyo)* **92**, 2021–2028 (1982).
27. Takano, J., Watanabe, M., Hitomi, K. & Maki, M. Four types of calpastatin isoforms with distinct amino-terminal sequences are specified by alternative first exons and differentially expressed in mouse tissues. *J. Biochem. (Tokyo)* **128**, 83–92 (2000).
28. 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.* **260**, 339–345 (1999).
29. Huang, F. *et al.* Cleavage of the calpain inhibitor, calpastatin, during postmortem ageing of beef skeletal muscle. *Food Chem.* **148**, 1–6 (2014).
30. Maki, M. *et al.* Analysis of structure-function relationship of pig calpastatin by expression of mutated cDNAs in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **263**, 10254–10261 (1988).
31. Tompa, P., Mucsi, Z., Orosz, G. & Friedrich, P. Calpastatin subdomains A and C are activators of calpain. *J. Biol. Chem.* **277**, 9022–9026 (2002).

32. Salamino, F. *et al.* Modulation of rat brain calpastatin efficiency by post-translational modifications. *FEBS Lett.* **412**, 433–438 (1997).
33. Shumway, S. D., Maki, M. & Miyamoto, S. The PEST domain of I κ B α is necessary and sufficient for in vitro degradation by μ -calpain. *J. Biol. Chem.* **274**, 30874–30881 (1999).
34. Carillo, S. *et al.* PEST motifs are not required for rapid calpain-mediated proteolysis of c-fos protein. *Biochem. J.* **313 (Pt 1)**, 245–251 (1996).
35. Glading, A., Lauffenburger, D. A. & Wells, A. Cutting to the chase: calpain proteases in cell motility. *Trends Cell Biol.* **12**, 46–54 (2002).
36. Robles, E., Huttenlocher, A. & Gomez, T. M. Filopodial calcium transients regulate growth cone motility and guidance through local activation of calpain. *Neuron* **38**, 597–609 (2003).
37. Sato, K. & Kawashima, S. Calpain function in the modulation of signal transduction molecules. *Biol. Chem.* **382**, 743–751 (2001).
38. Shea, T. B., Spencer, M. J., Beermann, M. L., Cressman, C. M. & Nixon, R. A. Calcium influx into human neuroblastoma cells induces ALZ-50 immunoreactivity: involvement of calpain-mediated hydrolysis of protein kinase C. *J. Neurochem.* **66**, 1539–1549 (1996).
39. Nishizuka, Y. Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* **233**, 305–312 (1986).
40. Miyazaki, T. *et al.* Calpastatin counteracts pathological angiogenesis by inhibiting suppressor of cytokine signaling 3 degradation in vascular endothelial cells. *Circ. Res.* **116**, 1170–1181 (2015).
41. Huang, Z. *et al.* Calpastatin prevents NF- κ B-mediated hyperactivation of macrophages and attenuates colitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **191**, 3778–3788 (2013).
42. Pariat, M. *et al.* 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.* **345 Pt 1**, 129–138 (2000).
43. Woo, M. G., Xue, K., Liu, J., McBride, H. & Tsang, B. K. Calpain-mediated processing of p53-associated parkin-like cytoplasmic protein (PARC) affects chemosensitivity of human ovarian cancer cells by promoting p53 subcellular trafficking. *J. Biol. Chem.* **287**, 3963–3975 (2012).
44. Gélis, C., Mavon, A. & Vicendo, P. The contribution of calpains in the down-regulation of Mdm2 and p53 proteolysis in reconstructed human epidermis in response to solar irradiation. *Photochem. Photobiol.* **81**, 975–982 (2005).
45. Qin, Q., Liao, G., Baudry, M. & Bi, X. Role of calpain-mediated p53 truncation in semaphorin 3A-induced axonal growth regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 13883–13887 (2010).
46. Arthur, J. S., Elce, J. S., Hegadorn, C., Williams, K. & Greer, P. A. Disruption of the murine calpain small subunit gene, *Capn4*: calpain is essential for embryonic development but not for cell growth and division. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 4474–4481 (2000).
47. Azam, M. *et al.* Disruption of the mouse μ -calpain gene reveals an essential role in platelet function. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 2213–2220 (2001).

48. Dutt, P. *et al.* m-Calpain is required for preimplantation embryonic development in mice. *BMC Dev. Biol.* **6**, 3 (2006).
49. Dedieu, S. *et al.* Myoblast migration is regulated by calpain through its involvement in cell attachment and cytoskeletal organization. *Exp. Cell Res.* **292**, 187–200 (2004).
50. Carragher, N. O., Fincham, V. J., Riley, D. & Frame, M. C. Cleavage of focal adhesion kinase by different proteases during SRC-regulated transformation and apoptosis. Distinct roles for calpain and caspases. *J. Biol. Chem.* **276**, 4270–4275 (2001).
51. Wang, C. *et al.* Calpain inhibitor attenuates ER stress-induced apoptosis in injured spinal cord after bone mesenchymal stem cells transplantation. *Neurochem. Int.* **97**, 15–25 (2016).
52. Serapio-Palacios, A. & Navarro-Garcia, F. EspC, an Autotransporter Protein Secreted by Enteropathogenic Escherichia coli, Causes Apoptosis and Necrosis through Caspase and Calpain Activation, Including Direct Procaspase-3 Cleavage. *mBio* **7**, (2016).
53. Chen, M. *et al.* Bid is cleaved by calpain to an active fragment in vitro and during myocardial ischemia/reperfusion. *J. Biol. Chem.* **276**, 30724–30728 (2001).
54. Li, X. *et al.* The role of the Hsp90/Akt pathway in myocardial calpain-induced caspase-3 activation and apoptosis during sepsis. *BMC Cardiovasc. Disord.* **13**, 8 (2013).
55. Huang, Y. & Wang, K. K. The calpain family and human disease. *Trends Mol. Med.* **7**, 355–362 (2001).
56. Boaru, S. G. *et al.* NLRP3 inflammasome expression is driven by NF- κ B in cultured hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **458**, 700–706 (2015).
57. Song, S.-H. *et al.* Suppression of inducible nitric oxide synthase by (-)-isoeleutherin from the bulbs of *Eleutherine americana* through the regulation of NF- κ B activity. *Int. Immunopharmacol.* **9**, 298–302 (2009).
58. Kim, Y. S. *et al.* The role of calpains in ligand-induced degradation of the glucocorticoid receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **374**, 373–377 (2008).
59. Bellocq, A. *et al.* [Interactions between glucocorticoids and anti-inflammatory peptides]. *J. Société Biol.* **193**, 381–383 (1999).
60. Schaub, F. J. *et al.* Fas and Fas-associated death domain protein regulate monocyte chemoattractant protein-1 expression by human smooth muscle cells through caspase- and calpain-dependent release of interleukin-1 α . *Circ. Res.* **93**, 515–522 (2003).
61. Gross, O. *et al.* Inflammasome activators induce interleukin-1 α secretion via distinct pathways with differential requirement for the protease function of caspase-1. *Immunity* **36**, 388–400 (2012).
62. Katsnelson, M. A., Rucker, L. G., Russo, H. M. & Dubyak, G. R. K⁺ efflux agonists induce NLRP3 inflammasome activation independently of Ca²⁺ signaling. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **194**, 3937–3952 (2015).
63. McCarthy, D. A., Clark, R. R., Bartling, T. R., Trebak, M. & Melendez, J. A. Redox control of the senescence regulator interleukin-1 α and the secretory phenotype. *J. Biol. Chem.* **288**, 32149–32159 (2013).

64. Hayakawa, M. *et al.* Mature interleukin-33 is produced by calpain-mediated cleavage in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **387**, 218–222 (2009).
65. Wan, F. *et al.* Calpastatin overexpression impairs postinfarct scar healing in mice by compromising reparative immune cell recruitment and activation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **309**, H1883–1893 (2015).
66. Imam, S. A. *et al.* Increased calpain correlates with Th1 cytokine profile in PBMCs from MS patients. *J. Neuroimmunol.* **190**, 139–145 (2007).
67. Szomor, Z. *et al.* Externalization of calpain (calcium-dependent neutral cysteine proteinase) in human arthritic cartilage. *Clin. Exp. Rheumatol.* **17**, 569–574 (1999).
68. Ménard, H. A. & el-Amine, M. The calpain-calpastatin system in rheumatoid arthritis. *Immunol. Today* **17**, 545–547 (1996).
69. Yamamoto, S. *et al.* Calcium-dependent cysteine proteinase (calpain) in human arthritic synovial joints. *Arthritis Rheum.* **35**, 1309–1317 (1992).
70. Suzuki, K. *et al.* Characterization of proteoglycan degradation by calpain. *Biochem. J.* **285 (Pt 3)**, 857–862 (1992).
71. Abe, M., Oda, N. & Sato, Y. Cell-associated activation of latent transforming growth factor-beta by calpain. *J. Cell. Physiol.* **174**, 186–193 (1998).
72. Letavernier, B. *et al.* Calpains contribute to vascular repair in rapidly progressive form of glomerulonephritis: potential role of their externalization. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **32**, 335–342 (2012).
73. Perez, J. *et al.* Calpains Released by T Lymphocytes Cleave TLR2 To Control IL-17 Expression. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **196**, 168–181 (2016).
74. Laurence, A. *et al.* Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* **26**, 371–381 (2007).
75. Letavernier, E. & Baud, L. [Calpains: a double edge sword]. *Médecine Sci. MS* **32**, 435–438 (2016).
76. Sohal, R. S. & Weindruch, R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* **273**, 59–63 (1996).
77. Wątroba, M. & Szukiewicz, D. The role of sirtuins in aging and age-related diseases. *Adv. Med. Sci.* **61**, 52–62 (2016).
78. Brunet, A. *et al.* Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* **303**, 2011–2015 (2004).
79. Tran, H., Brunet, A., Griffith, E. C. & Greenberg, M. E. The many forks in FOXO's road. *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.* **2003**, RE5 (2003).
80. Kops, G. J. P. L. *et al.* Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature* **419**, 316–321 (2002).

81. Cuervo, A. M. & Dice, J. F. Age-related decline in chaperone-mediated autophagy. *J. Biol. Chem.* **275**, 31505–31513 (2000).
82. Liebl, M. P. & Hoppe, T. It's all about talking - two-way communication between proteasomal and lysosomal degradation pathways via ubiquitin. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* ajpcell.00074.2016 (2016). doi:10.1152/ajpcell.00074.2016
83. Hsu, C.-Y., Qiu, J. T. & Chan, Y.-P. Cellular degradation activity is maintained during aging in long-living queen bees. *Biogerontology* (2016). doi:10.1007/s10522-016-9652-x
84. Nakayama, H., Nishida, K. & Otsu, K. Macromolecular Degradation Systems and Cardiovascular Aging. *Circ. Res.* **118**, 1577–1592 (2016).
85. Rubinsztein, D. C., Mariño, G. & Kroemer, G. Autophagy and aging. *Cell* **146**, 682–695 (2011).
86. Conboy, I. M. *et al.* Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature* **433**, 760–764 (2005).
87. Moresi, R. *et al.* Age- and gender-related alterations of the number and clonogenic capacity of circulating CD34+ progenitor cells. *Biogerontology* **6**, 185–192 (2005).
88. Hall, B. M. *et al.* Aging of mice is associated with p16(Ink4a)- and β -galactosidase-positive macrophage accumulation that can be induced in young mice by senescent cells. *Aging* (2016).
89. Baker, D. J. *et al.* Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature* **530**, 184–189 (2016).
90. Jonker, M. J. *et al.* Life spanning murine gene expression profiles in relation to chronological and pathological aging in multiple organs. *Aging Cell* **12**, 901–909 (2013).
91. Park, D. *et al.* RNA-Seq analysis reveals new evidence for inflammation-related changes in aged kidney. *Oncotarget* (2016). doi:10.18632/oncotarget.9152
92. Sharpless, N. E. & Sherr, C. J. Forging a signature of in vivo senescence. *Nat. Rev. Cancer* **15**, 397–408 (2015).
93. Freund, A., Orjalo, A. V., Desprez, P.-Y. & Campisi, J. Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Mol. Med.* **16**, 238–246 (2010).
94. Franceschi, C. *et al.* Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **908**, 244–254 (2000).
95. Franceschi, C., Bonafè, M. & Valensin, S. Human immunosenescence: the prevailing of innate immunity, the failing of clonotypic immunity, and the filling of immunological space. *Vaccine* **18**, 1717–1720 (2000).
96. Fagiolo, U. *et al.* Increased cytokine production in mononuclear cells of healthy elderly people. *Eur. J. Immunol.* **23**, 2375–2378 (1993).
97. Vescovini, R. *et al.* Different contribution of EBV and CMV infections in very long-term carriers to age-related alterations of CD8+ T cells. *Exp. Gerontol.* **39**, 1233–1243 (2004).

98. Coppola, R., Mari, D., Lattuada, A. & Franceschi, C. Von Willebrand factor in Italian centenarians. *Haematologica* **88**, 39–43 (2003).
99. Salminen, A., Kaarniranta, K. & Kauppinen, A. Inflammaging: disturbed interplay between autophagy and inflammasomes. *Aging* **4**, 166–175 (2012).
100. Song, F., Ma, Y., Bai, X.-Y. & Chen, X. The Expression Changes of Inflammasomes in the Aging Rat Kidneys. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* (2015). doi:10.1093/gerona/glv078
101. Youm, Y.-H. *et al.* Canonical Nlrp3 inflammasome links systemic low-grade inflammation to functional decline in aging. *Cell Metab.* **18**, 519–532 (2013).
102. Vandanmagsar, B. *et al.* The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat. Med.* **17**, 179–188 (2011).
103. Stout-Delgado, H. W. *et al.* Age-Dependent Susceptibility to Pulmonary Fibrosis Is Associated with NLRP3 Inflammasome Activation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **55**, 252–263 (2016).
104. Du, W. *et al.* Age-associated vascular inflammation promotes monocytosis during atherogenesis. *Aging Cell* **15**, 766–777 (2016).
105. Costello, D. A., Keenan, K., McManus, R. M., Falvey, A. & Lynch, M. A. The age-related neuroinflammatory environment promotes macrophage activation, which negatively impacts synaptic function. *Neurobiol. Aging* **43**, 140–148 (2016).
106. Giunta, B. *et al.* Inflammaging as a prodrome to Alzheimer’s disease. *J. Neuroinflammation* **5**, 51 (2008).
107. Troiano, L. *et al.* Evaluation of adrenal function in aging. *J. Endocrinol. Invest.* **22**, 74–75 (1999).
108. Li, M. O., Wan, Y. Y., Sanjabi, S., Robertson, A.-K. L. & Flavell, R. A. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **24**, 99–146 (2006).
109. Carrieri, G. *et al.* The G/C915 polymorphism of transforming growth factor beta1 is associated with human longevity: a study in Italian centenarians. *Aging Cell* **3**, 443–448 (2004).
110. Lio, D. *et al.* Gender-specific association between -1082 IL-10 promoter polymorphism and longevity. *Genes Immun.* **3**, 30–33 (2002).
111. Nixon, R. A. *et al.* Calcium-activated neutral proteinase (calpain) system in aging and Alzheimer’s disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **747**, 77–91 (1994).
112. Wood, D. E. *et al.* Bax cleavage is mediated by calpain during drug-induced apoptosis. *Oncogene* **17**, 1069–1078 (1998).
113. Gil-Parrado, S. *et al.* Ionomycin-activated calpain triggers apoptosis. A probable role for Bcl-2 family members. *J. Biol. Chem.* **277**, 27217–27226 (2002).
114. Valero, J. G. *et al.* μ -Calpain conversion of antiapoptotic Bfl-1 (BCL2A1) into a prodeath factor reveals two distinct alpha-helices inducing mitochondria-mediated apoptosis. *PLoS One* **7**, e38620 (2012).

115. Reimertz, C., Kögel, D., Lankiewicz, S., Poppe, M. & Prehn, J. H. Ca²⁺-induced inhibition of apoptosis in human SH-SY5Y neuroblastoma cells: degradation of apoptotic protease activating factor-1 (APAF-1). *J. Neurochem.* **78**, 1256–1266 (2001).
116. Crocker, S. J. *et al.* Inhibition of calpains prevents neuronal and behavioral deficits in an MPTP mouse model of Parkinson's disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **23**, 4081–4091 (2003).
117. Games, D. *et al.* Reducing C-terminal-truncated alpha-synuclein by immunotherapy attenuates neurodegeneration and propagation in Parkinson's disease-like models. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **34**, 9441–9454 (2014).
118. Mathews, P. M. *et al.* Calpain activity regulates the cell surface distribution of amyloid precursor protein. Inhibition of calpains enhances endosomal generation of beta-cleaved C-terminal APP fragments. *J. Biol. Chem.* **277**, 36415–36424 (2002).
119. Peterson, C. & Goldman, J. E. Alterations in calcium content and biochemical processes in cultured skin fibroblasts from aged and Alzheimer donors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 2758–2762 (1986).
120. Adamec, E., Mohan, P., Vonsattel, J. P. & Nixon, R. A. Calpain activation in neurodegenerative diseases: confocal immunofluorescence study with antibodies specifically recognizing the active form of calpain 2. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **104**, 92–104 (2002).
121. Lee, M. S. *et al.* Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature* **405**, 360–364 (2000).
122. Noble, W. *et al.* Cdk5 is a key factor in tau aggregation and tangle formation in vivo. *Neuron* **38**, 555–565 (2003).
123. Shukla, V., Skuntz, S. & Pant, H. C. Deregulated Cdk5 activity is involved in inducing Alzheimer's disease. *Arch. Med. Res.* **43**, 655–662 (2012).
124. Higuchi, M. *et al.* Mechanistic involvement of the calpain-calpastatin system in Alzheimer neuropathology. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **26**, 1204–1217 (2012).
125. Trinchese, F. *et al.* Inhibition of calpains improves memory and synaptic transmission in a mouse model of Alzheimer disease. *J. Clin. Invest.* **118**, 2796–2807 (2008).
126. Nikkel, A. L. *et al.* The novel calpain inhibitor A-705253 prevents stress-induced tau hyperphosphorylation in vitro and in vivo. *Neuropharmacology* **63**, 606–612 (2012).
127. Müller, A. L. & Dhalla, N. S. Role of various proteases in cardiac remodeling and progression of heart failure. *Heart Fail. Rev.* **17**, 395–409 (2012).
128. Zhao, Y. *et al.* Calpain-Calcineurin-Nuclear Factor Signaling and the Development of Atrial Fibrillation in Patients with Valvular Heart Disease and Diabetes. *J. Diabetes Res.* **2016**, 4639654 (2016).
129. Patterson, C., Portbury, A. L., Schisler, J. C. & Willis, M. S. Tear me down: role of calpain in the development of cardiac ventricular hypertrophy. *Circ. Res.* **109**, 453–462 (2011).
130. Ni, R. *et al.* Mitochondrial Calpain-1 Disrupts ATP Synthase and Induces Superoxide Generation in Type 1 Diabetic Hearts: A Novel Mechanism Contributing to Diabetic Cardiomyopathy. *Diabetes* **65**, 255–268 (2016).

131. Letavernier, E. *et al.* The role of calpains in myocardial remodelling and heart failure. *Cardiovasc. Res.* **96**, 38–45 (2012).
132. Li, Y. *et al.* Targeted inhibition of calpain reduces myocardial hypertrophy and fibrosis in mouse models of type 1 diabetes. *Diabetes* **60**, 2985–2994 (2011).
133. Miyazaki, T. *et al.* Calpain and atherosclerosis. *J. Atheroscler. Thromb.* **20**, 228–237 (2013).
134. Howatt, D. A. *et al.* Leukocyte Calpain Deficiency Reduces Angiotensin 2-Induced Inflammation and Atherosclerosis But Not Abdominal Aortic Aneurysms in Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **36**, 835–845 (2016).
135. Letavernier, E. *et al.* Targeting the calpain/calpastatin system as a new strategy to prevent cardiovascular remodeling in angiotensin 2-induced hypertension. *Circ. Res.* **102**, 720–728 (2008).
136. Curcio, M., Salazar, I. L., Mele, M., Canzoniero, L. M. T. & Duarte, C. B. Calpains and neuronal damage in the ischemic brain: the swiss knife in synaptic injury. *Prog. Neurobiol.* (2016).
doi:10.1016/j.pneurobio.2016.06.001
137. Ye, T. *et al.* Over-expression of calpastatin inhibits calpain activation and attenuates post-infarction myocardial remodeling. *PLoS One* **10**, e0120178 (2015).
138. Thompson, J., Hu, Y., Lesnfsky, E. J. & Chen, Q. Activation of mitochondrial calpain and increased cardiac injury: beyond AIF release. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **310**, H376–384 (2016).
139. Zheng, D., Wang, G., Li, S., Fan, G.-C. & Peng, T. Calpain-1 induces endoplasmic reticulum stress in promoting cardiomyocyte apoptosis following hypoxia/reoxygenation. *Biochim. Biophys. Acta* **1852**, 882–892 (2015).
140. Chatterjee, P. K. *et al.* Calpain inhibitor-1 reduces renal ischemia/reperfusion injury in the rat. *Kidney Int.* **59**, 2073–2083 (2001).
141. Sabe, A. A. *et al.* Calpain inhibition improves collateral-dependent perfusion in a hypercholesterolemic swine model of chronic myocardial ischemia. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **151**, 245–252 (2016).
142. David, L. L., Wright, J. W. & Shearer, T. R. Calpain 2 induced insolubilization of lens beta-crystallin polypeptides may induce cataract. *Biochim. Biophys. Acta* **1139**, 210–216 (1992).
143. Kelley, M. J., David, L. L., Iwasaki, N., Wright, J. & Shearer, T. R. alpha-Crystallin chaperone activity is reduced by calpain 2 in vitro and in selenite cataract. *J. Biol. Chem.* **268**, 18844–18849 (1993).
144. Azuma, M., Shearer, T. R., Matsumoto, T., David, L. L. & Murachi, T. Calpain 2 in two in vivo models of sugar cataract. *Exp. Eye Res.* **51**, 393–401 (1990).
145. Azuma, M., David, L. L. & Shearer, T. R. Cysteine protease inhibitor E64 reduces the rate of formation of selenite cataract in the whole animal. *Curr. Eye Res.* **10**, 657–666 (1991).
146. Lynch, G. & Baudry, M. Brain spectrin, calpain and long-term changes in synaptic efficacy. *Brain Res. Bull.* **18**, 809–815 (1987).

147. Ibrahim, M., Upreti, R. K. & Kidwai, A. M. Calpain from rat intestinal epithelial cells: age-dependent dynamics during cell differentiation. *Mol. Cell. Biochem.* **131**, 49–59 (1994).
148. Benuck, M., Banay-Schwartz, M., DeGuzman, T. & Lajtha, A. Changes in brain protease activity in aging. *J. Neurochem.* **67**, 2019–2029 (1996).
149. Manya, H. *et al.* Klotho protein deficiency leads to overactivation of mu-calpain. *J. Biol. Chem.* **277**, 35503–35508 (2002).
150. Aversa, M. *et al.* Age-dependent degradation of calpastatin in kidney of hypertensive rats. *J. Biol. Chem.* **276**, 38426–38432 (2001).
151. Benigni, A. *et al.* Disruption of the Ang 2 type 1 receptor promotes longevity in mice. *J. Clin. Invest.* **119**, 524–530 (2009).
152. Holzenberger, M. *et al.* IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature* **421**, 182–187 (2003).
153. Leloup, L., Daury, L., Mazères, G., Cottin, P. & Brustis, J.-J. Involvement of the ERK/MAP kinase signalling pathway in milli-calpain activation and myogenic cell migration. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**, 1177–1189 (2007).
154. Leloup, L., Mazères, G., Daury, L., Cottin, P. & Brustis, J.-J. Involvement of calpains in growth factor-mediated migration. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **38**, 2049–2063 (2006).
155. Kuro-o, M. Klotho. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* **459**, 333–343 (2010).
156. Bartke, A. Long-lived Klotho mice: new insights into the roles of IGF-1 and insulin in aging. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* **17**, 33–35 (2006).
157. Kurosu, H. *et al.* Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. *Science* **309**, 1829–1833 (2005).
158. Lu, P., Boros, S., Chang, Q., Bindels, R. J. & Hoenderop, J. G. The beta-glucuronidase klotho exclusively activates the epithelial Ca²⁺ channels TRPV5 and TRPV6. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* **23**, 3397–3402 (2008).
159. Kuro-o, M. *et al.* Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* **390**, 45–51 (1997).
160. Nabeshima, Y. *et al.* Calpain 1 inhibitor BDA-410 ameliorates α -klotho-deficiency phenotypes resembling human aging-related syndromes. *Sci. Rep.* **4**, 5847 (2014).
161. Zhang, C. *et al.* Prognostic significance of Capn4 overexpression in intrahepatic cholangiocarcinoma. *PLoS One* **8**, e54619 (2013).
162. Storr, S. J. *et al.* Expression of the calpain system is associated with poor clinical outcome in gastro-oesophageal adenocarcinomas. *J. Gastroenterol.* **48**, 1213–1221 (2013).
163. Storr, S. J. *et al.* Calpain system protein expression in carcinomas of the pancreas, bile duct and ampulla. *BMC Cancer* **12**, 511 (2012).

164. Storr, S. J. *et al.* The calpain system is associated with survival of breast cancer patients with large but operable inflammatory and non-inflammatory tumours treated with neoadjuvant chemotherapy. *Oncotarget* (2016). doi:10.18632/oncotarget.10066
165. Braun, C. *et al.* Expression of calpain I messenger RNA in human renal cell carcinoma: correlation with lymph node metastasis and histological type. *Int. J. Cancer* **84**, 6–9 (1999).
166. Kimura, Y. *et al.* The involvement of calpain-dependent proteolysis of the tumor suppressor NF2 (merlin) in schwannomas and meningiomas. *Nat. Med.* **4**, 915–922 (1998).
167. Starska, K. *et al.* Gene/protein expression of CAPN1/2-CAST system members is associated with ERK1/2 kinases activity as well as progression and clinical outcome in human laryngeal cancer. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* (2016). doi:10.1007/s13277-016-5178-8
168. Yoshida, M. *et al.* The calpain inhibitor calpeptin suppresses pancreatic cancer by disrupting cancer-stromal interactions in a mouse xenograft model. *Cancer Sci.* (2016). doi:10.1111/cas.13024
169. Dai, Z. *et al.* Capn4 contributes to tumour growth and metastasis of hepatocellular carcinoma by activation of the FAK-Src signalling pathways. *J. Pathol.* **234**, 316–328 (2014).
170. Gu, J. *et al.* Capn4 promotes non-small cell lung cancer progression via upregulation of matrix metalloproteinase 2. *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* **32**, 51 (2015).
171. Billger, M., Wallin, M. & Karlsson, J. O. Proteolysis of tubulin and microtubule-associated proteins 1 and 2 by calpain I and 2. Difference in sensitivity of assembled and disassembled microtubules. *Cell Calcium* **9**, 33–44 (1988).
172. Potter, D. A. *et al.* Calpain Regulates Actin Remodeling during Cell Spreading. *J. Cell Biol.* **141**, 647–662 (1998).
173. Hoskin, V. *et al.* Ezrin regulates focal adhesion and invadopodia dynamics by altering calpain activity to promote breast cancer cell invasion. *Mol. Biol. Cell* **26**, 3464–3479 (2015).
174. Wang, Q., Wang, Y., Downey, G. P., Plotnikov, S. & McCulloch, C. A. A ternary complex comprising FAK, PTP α and IP3 receptor 1 functionally engages focal adhesions and the endoplasmic reticulum to mediate IL-1-induced Ca²⁺ signalling in fibroblasts. *Biochem. J.* **473**, 397–410 (2016).
175. Franco, S., Perrin, B. & Huttenlocher, A. Isoform specific function of calpain 2 in regulating membrane protrusion. *Exp. Cell Res.* **299**, 179–187 (2004).
176. Postovit, L.-M. *et al.* Calpain is required for MMP-2 and u-PA expression in SV40 large T-antigen-immortalized cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **297**, 294–301 (2002).
177. Petranka, J., Wright, G., Forbes, R. A. & Murphy, E. Elevated calcium in preneoplastic cells activates NF-kappa B and confers resistance to apoptosis. *J. Biol. Chem.* **276**, 37102–37108 (2001).
178. Demarchi, F., Bertoli, C., Greer, P. A. & Schneider, C. Ceramide triggers an NF-kappaB-dependent survival pathway through calpain. *Cell Death Differ.* **12**, 512–522 (2005).
179. Conacci-Sorrell, M., Ngouenet, C., Anderson, S., Brabletz, T. & Eisenman, R. N. Stress-induced cleavage of Myc promotes cancer cell survival. *Genes Dev.* **28**, 689–707 (2014).

180. Gafni, J., Cong, X., Chen, S. F., Gibson, B. W. & Ellerby, L. M. Calpain-1 cleaves and activates caspase-7. *J. Biol. Chem.* **284**, 25441–25449 (2009).
181. Tan, Y. *et al.* Ubiquitous calpains promote caspase-12 and JNK activation during endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **281**, 16016–16024 (2006).
182. Volbracht, C. *et al.* The critical role of calpain versus caspase activation in excitotoxic injury induced by nitric oxide. *J. Neurochem.* **93**, 1280–1292 (2005).
183. Liu, L., Xing, D. & Chen, W. R. Micro-calpain regulates caspase-dependent and apoptosis inducing factor-mediated caspase-independent apoptotic pathways in cisplatin-induced apoptosis. *Int. J. Cancer* **125**, 2757–2766 (2009).
184. Cabon, L. *et al.* BID regulates AIF-mediated caspase-independent necroptosis by promoting BAX activation. *Cell Death Differ.* **19**, 245–256 (2012).
185. Gao, G. & Dou, Q. P. N-terminal cleavage of bax by calpain generates a potent proapoptotic 18-kDa fragment that promotes bcl-2-independent cytochrome C release and apoptotic cell death. *J. Cell. Biochem.* **80**, 53–72 (2000).
186. Mandic, A. *et al.* Calpain-mediated Bid cleavage and calpain-independent Bak modulation: two separate pathways in cisplatin-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 3003–3013 (2002).
187. Atencio, I. A., Ramachandra, M., Shabram, P. & Demers, G. W. Calpain inhibitor 1 activates p53-dependent apoptosis in tumor cell lines. *Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **11**, 247–253 (2000).
188. Benetti, R. *et al.* The death substrate Gas2 binds m-calpain and increases susceptibility to p53-dependent apoptosis. *EMBO J.* **20**, 2702–2714 (2001).
189. Goldsmith, J., Levine, B. & Debnath, J. Autophagy and cancer metabolism. *Methods Enzymol.* **542**, 25–57 (2014).
190. Eisenberg-Lerner, A. & Kimchi, A. The paradox of autophagy and its implication in cancer etiology and therapy. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* **14**, 376–391 (2009).
191. Xia, H.-G. *et al.* Control of basal autophagy by calpain1 mediated cleavage of ATG5. *Autophagy* **6**, 61–66 (2010).
192. Yousefi, S. *et al.* Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat. Cell Biol.* **8**, 1124–1132 (2006).
193. Pagliarini, V. *et al.* Proteolysis of Ambra1 during apoptosis has a role in the inhibition of the autophagic pro-survival response. *Cell Death Differ.* **19**, 1495–1504 (2012).
194. Raimbourg, Q. *et al.* The calpain/calpastatin system has opposing roles in growth and metastatic dissemination of melanoma. *PloS One* **8**, e60469 (2013).
195. Zheng, X. *et al.* Hypoxia-induced and calpain-dependent cleavage of filamin A regulates the hypoxic response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 2560–2565 (2014).

196. Mo, X.-G. *et al.* Suppression of NHE1 by small interfering RNA inhibits HIF-1 α -induced angiogenesis in vitro via modulation of calpain activity. *Microvasc. Res.* **81**, 160–168 (2011).
197. Youn, J.-Y., Wang, T. & Cai, H. An ezrin/calpain/PI3K/AMPK/eNOSs1179 signaling cascade mediating VEGF-dependent endothelial nitric oxide production. *Circ. Res.* **104**, 50–59 (2009).
198. Calpain-2 regulation of VEGF-mediated angiogenesis. - PubMed - NCBI. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16816119>. (Accessed: 29th September 2016)
199. Anuja, K. *et al.* Prolonged inflammatory microenvironment is crucial for pro-neoplastic growth and genome instability: a detailed review. *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc. AI* (2016). doi:10.1007/s00011-016-0985-3
200. Wood, K. & Luke, J. J. Optimal Use of BRAF Targeting Therapy in the Immunotherapy Era. *Curr. Oncol. Rep.* **18**, 67 (2016).
201. Leach, D. R., Krummel, M. F. & Allison, J. P. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* **271**, 1734–1736 (1996).
202. Simpson, T. R. *et al.* Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma. *J. Exp. Med.* **210**, 1695–1710 (2013).
203. Freeman, G. J. *et al.* Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J. Exp. Med.* **192**, 1027–1034 (2000).
204. Lee, L., Gupta, M. & Sahasranaman, S. Immune Checkpoint inhibitors: An introduction to the next-generation cancer immunotherapy. *J. Clin. Pharmacol.* **56**, 157–169 (2016).
205. Pagès, F. *et al.* In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **27**, 5944–5951 (2009).
206. Kim, H.-J. & Cantor, H. CD4 T-cell Subsets and Tumor Immunity: The Helpful and the Not-so-Helpful. *Cancer Immunol. Res.* **2**, 91–98 (2014).
207. Schüler, T., Qin, Z., Ibe, S., Noben-Trauth, N. & Blankenstein, T. T helper cell type 1-associated and cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunity is impaired in interleukin 4-deficient mice. *J. Exp. Med.* **189**, 803–810 (1999).
208. Qin, Z. & Blankenstein, T. CD4+ T cell--mediated tumor rejection involves inhibition of angiogenesis that is dependent on IFN gamma receptor expression by nonhematopoietic cells. *Immunity* **12**, 677–686 (2000).
209. Nishimura, T. *et al.* Distinct role of antigen-specific T helper type 1 (Th1) and Th2 cells in tumor eradication in vivo. *J. Exp. Med.* **190**, 617–627 (1999).
210. Tepper, R. I., Coffman, R. L. & Leder, P. An eosinophil-dependent mechanism for the antitumor effect of interleukin-4. *Science* **257**, 548–551 (1992).
211. Ochi, A. *et al.* MyD88 inhibition amplifies dendritic cell capacity to promote pancreatic carcinogenesis via Th2 cells. *J. Exp. Med.* **209**, 1671–1687 (2012).

212. Tatsumi, T. *et al.* Disease-associated bias in T helper type 1 (Th1)/Th2 CD4(+) T cell responses against MAGE-6 in HLA-DRB10401(+) patients with renal cell carcinoma or melanoma. *J. Exp. Med.* **196**, 619–628 (2002).
213. Miyahara, Y. *et al.* Generation and regulation of human CD4+ IL-17-producing T cells in ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 15505–15510 (2008).
214. Zhang, B. *et al.* The prevalence of Th17 cells in patients with gastric cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **374**, 533–537 (2008).
215. Numasaki, M. *et al.* IL-17 enhances the net angiogenic activity and in vivo growth of human non-small cell lung cancer in SCID mice through promoting CXCR-2-dependent angiogenesis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **175**, 6177–6189 (2005).
216. Young, M. R. I. Th17 Cells in Protection from Tumor or Promotion of Tumor Progression. *J. Clin. Cell. Immunol.* **7**, 431 (2016).
217. Kryczek, I., Wei, S., Szeliga, W., Vatan, L. & Zou, W. Endogenous IL-17 contributes to reduced tumor growth and metastasis. *Blood* **114**, 357–359 (2009).
218. Kryczek, I. *et al.* Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood* **114**, 1141–1149 (2009).
219. Martin-Orozco, N. *et al.* T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity. *Immunity* **31**, 787–798 (2009).
220. Muranski, P. *et al.* Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. *Blood* **112**, 362–373 (2008).
221. Quezada, S. A. *et al.* Tumor-reactive CD4(+) T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts. *J. Exp. Med.* **207**, 637–650 (2010).
222. Curran, M. A. *et al.* Systemic 4-1BB activation induces a novel T cell phenotype driven by high expression of Eomesodermin. *J. Exp. Med.* **210**, 743–755 (2013).
223. Coppola, D. *et al.* Unique ectopic lymph node-like structures present in human primary colorectal carcinoma are identified by immune gene array profiling. *Am. J. Pathol.* **179**, 37–45 (2011).
224. Gu-Trantien, C. *et al.* CD4⁺ follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *J. Clin. Invest.* **123**, 2873–2892 (2013).
225. Preston, C. C. *et al.* The ratios of CD8⁺ T cells to CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ and FOXP3⁻ T cells correlate with poor clinical outcome in human serous ovarian cancer. *PLoS One* **8**, e80063 (2013).
226. Martin-Orozco, N. *et al.* Melanoma cells express ICOS ligand to promote the activation and expansion of T-regulatory cells. *Cancer Res.* **70**, 9581–9590 (2010).
227. Shamel, A. *et al.* IL-2 promotes the function of memory-like autoregulatory CD8⁺ T cells but suppresses their development via FoxP3⁺ Treg cells. *Eur. J. Immunol.* **43**, 394–403 (2013).
228. Curiel, T. J. *et al.* Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat. Med.* **10**, 942–949 (2004).

229. Shields, J. D., Kourtis, I. C., Tomei, A. A., Roberts, J. M. & Swartz, M. A. Induction of lymphoidlike stroma and immune escape by tumors that express the chemokine CCL21. *Science* **328**, 749–752 (2010).
230. Morse, M. A. *et al.* Depletion of human regulatory T cells specifically enhances antigen-specific immune responses to cancer vaccines. *Blood* **112**, 610–618 (2008).
231. Powell, D. J. *et al.* Administration of a CD25-directed immunotoxin, LMB-2, to patients with metastatic melanoma induces a selective partial reduction in regulatory T cells in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **179**, 4919–4928 (2007).
232. Quezada, S. A. *et al.* Limited tumor infiltration by activated T effector cells restricts the therapeutic activity of regulatory T cell depletion against established melanoma. *J. Exp. Med.* **205**, 2125–2138 (2008).
233. Feig, C. *et al.* Targeting CXCL12 from FAP-expressing carcinoma-associated fibroblasts synergizes with anti-PD-L1 immunotherapy in pancreatic cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 20212–20217 (2013).
234. Sato, E. *et al.* Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 18538–18543 (2005).
235. Naito, Y. *et al.* CD8+ T Cells Infiltrated within Cancer Cell Nests as a Prognostic Factor in Human Colorectal Cancer. *Cancer Res.* **58**, 3491–3494 (1998).
236. Li, B. *et al.* Comprehensive analyses of tumor immunity: implications for cancer immunotherapy. *Genome Biol.* **17**, 174 (2016).
237. Mani, N. L. *et al.* Quantitative assessment of the spatial heterogeneity of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *Breast Cancer Res. BCR* **18**, 78 (2016).
238. Joyce, J. A. & Fearon, D. T. T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. *Science* **348**, 74–80 (2015).
239. Ngiow, S. F. *et al.* A Threshold Level of Intratumor CD8+ T-cell PD1 Expression Dictates Therapeutic Response to Anti-PD1. *Cancer Res.* **75**, 3800–3811 (2015).
240. Ganesan, A.-P. *et al.* Tumor-infiltrating regulatory T cells inhibit endogenous cytotoxic T cell responses to lung adenocarcinoma. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **191**, 2009–2017 (2013).
241. Amatschek, S. *et al.* CXCL9 induces chemotaxis, chemorepulsion and endothelial barrier disruption through CXCR3-mediated activation of melanoma cells. *Br. J. Cancer* **104**, 469–479 (2011).
242. Hopkins, P. A. & Sriskandan, S. Mammalian Toll-like receptors: to immunity and beyond. *Clin. Exp. Immunol.* **140**, 395–407 (2005).
243. Beg, A. A. Endogenous ligands of Toll-like receptors: implications for regulating inflammatory and immune responses. *Trends Immunol.* **23**, 509–512 (2002).
244. Dajon, M., Iribarren, K. & Cremer, I. Toll-like receptor stimulation in cancer: A pro- and anti-tumor double-edged sword. *Immunobiology* (2016). doi:10.1016/j.imbio.2016.06.009
245. Zhang, Y. *et al.* TLR1/TLR2 agonist induces tumor regression by reciprocal modulation of effector and regulatory T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **186**, 1963–1969 (2011).

246. Joseph, A. M., Srivastava, R., Zabaleta, J. & Davila, E. Cross-talk between 4-1BB and TLR1-TLR2 Signaling in CD8+ T Cells Regulates TLR2's Costimulatory Effects. *Cancer Immunol. Res.* **4**, 708–716 (2016).
247. Wu, C.-C., Liu, S.-J., Chen, H.-W., Shen, K.-Y. & Leng, C.-H. A toll-like receptor 2 agonist-fused antigen enhanced antitumor immunity by increasing antigen presentation and the CD8 memory T cells population. *Oncotarget* (2016). doi:10.18632/oncotarget.9001
248. Mauldin, I. S. *et al.* TLR2/6 agonists and interferon-gamma induce human melanoma cells to produce CXCL10. *Int. J. Cancer* **137**, 1386–1396 (2015).
249. Lowe, E. L. *et al.* Toll-like receptor 2 signaling protects mice from tumor development in a mouse model of colitis-induced cancer. *PLoS One* **5**, e13027 (2010).
250. Peltier, J. *et al.* Calpain activation and secretion promote glomerular injury in experimental glomerulonephritis: evidence from calpastatin-transgenic mice. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **17**, 3415–3423 (2006).
251. Zafrani, L. *et al.* Calpastatin controls polymicrobial sepsis by limiting procoagulant microparticle release. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **185**, 744–755 (2012).
252. Saito, K., Elce, J. S., Hamos, J. E. & Nixon, R. A. 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.* **90**, 2628–2632 (1993).
253. Trinchese, F. *et al.* Inhibition of calpains improves memory and synaptic transmission in a mouse model of Alzheimer disease. *J. Clin. Invest.* **118**, 2796–2807 (2008).
254. Rao, M. V. *et al.* Specific calpain inhibition by calpastatin prevents tauopathy and neurodegeneration and restores normal lifespan in tau P301L mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **34**, 9222–9234 (2014).
255. Scalia, R. *et al.* A novel role for calpain in the endothelial dysfunction induced by activation of angiotensin 2 type 1 receptor signaling. *Circ. Res.* **108**, 1102–1111 (2011).
256. Kamo, T., Akazawa, H. & Komuro, I. Pleiotropic Effects of Angiotensin 2 Receptor Signaling in Cardiovascular Homeostasis and Aging. *Int. Heart. J.* **56**, 249–254 (2015).
257. Basso, N. *et al.* Protective effect of long-term angiotensin 2 inhibition. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **293**, H1351–1358 (2007).
258. Ferder, L., Inserra, F., Romano, L., Ercole, L. & Pszeny, V. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on mitochondrial number in the aging mouse. *Am. J. Physiol.* **265**, C15–18 (1993).
259. Iyer, S. S. *et al.* Mitochondrial cardiolipin is required for Nlrp3 inflammasome activation. *Immunity* **39**, 311–323 (2013).
260. Young, A. R. J. & Narita, M. SASP reflects senescence. *EMBO Rep.* **10**, 228–230 (2009).
261. Davalos, A. R., Coppe, J.-P., Campisi, J. & Desprez, P.-Y. Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.* **29**, 273–283 (2010).

262. Freund, A., Patil, C. K. & Campisi, J. p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. *EMBO J.* **30**, 1536–1548 (2011).
263. Salminen, A., Kauppinen, A. & Kaarniranta, K. Emerging role of NF- κ B signaling in the induction of senescence-associated secretory phenotype (SASP). *Cell. Signal.* **24**, 835–845 (2012).
264. Adler, A. S. *et al.* Motif module map reveals enforcement of aging by continual NF-kappaB activity. *Genes Dev.* **21**, 3244–3257 (2007).
265. Zhang, G. *et al.* Hypothalamic programming of systemic ageing involving IKK- β , NF- κ B and GnRH. *Nature* **497**, 211–216 (2013).
266. Wiemer, A. J., Lokuta, M. A., Surfus, J. C., Wernimont, S. A. & Huttenlocher, A. Calpain inhibition impairs TNF-alpha-mediated neutrophil adhesion, arrest and oxidative burst. *Mol. Immunol.* **47**, 894–902 (2010).
267. Hussain, A. M., Zhang, Q.-X. & Murray, A. G. Endothelial cell calpain activity facilitates lymphocyte diapedesis. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **5**, 2640–2648 (2005).
268. Perez, J. *et al.* Calpains Released by T Lymphocytes Cleave TLR2 To Control IL-17 Expression. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **196**, 168–181 (2016).
269. Hardeland, R. Melatonin and circadian oscillators in aging--a dynamic approach to the multiply connected players. *Interdiscip. Top. Gerontol.* **40**, 128–140 (2015).
270. Jenwitheesuk, A., Nopparat, C., Mukda, S., Wongchitrat, P. & Govitrapong, P. Melatonin regulates aging and neurodegeneration through energy metabolism, epigenetics, autophagy and circadian rhythm pathways. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 16848–16884 (2014).
271. Froy, O. Circadian aspects of energy metabolism and aging. *Ageing Res. Rev.* **12**, 931–940 (2013).
272. Demarchi, F. *et al.* Calpain is required for macroautophagy in mammalian cells. *J. Cell Biol.* **175**, 595–605 (2006).
273. Menzies, F. M. *et al.* Calpain inhibition mediates autophagy-dependent protection against polyglutamine toxicity. *Cell Death Differ.* **22**, 433–444 (2015).
274. Lenoir, O., Tharaux, P.-L. & Huber, T. B. Autophagy in kidney disease and aging: lessons from rodent models. *Kidney Int.* (2016). doi:10.1016/j.kint.2016.04.014

Résumé/Abstract

Les calpaïnes 1 et 2 sont des protéases à cystéine ubiquitaires et la calpastatine est leur inhibiteur naturel, également ubiquitaire. Les calpaïnes sont impliquées dans le développement de la réponse inflammatoire via l'activation par protéolyse partielle de plusieurs substrats (activation de NF- κ B par le clivage de I- κ B α , remodelage du cytosquelette des cellules inflammatoires, clivage de la protéine chaperonne HSP 90...).

Il a été précédemment démontré que les calpaïnes favorisent le vieillissement neuronal. Nous avons pu montrer dans un modèle murin que l'inhibition in vivo des calpaïnes par la surexpression de calpastatine limite le vieillissement notamment rénal et vasculaire. L'inflammation liée au vieillissement ou « inflammaging » est considérablement réduite par l'inhibition spécifique des calpaïnes. Ceci est dû, au moins en partie, à l'effet des calpaïnes sur la production de cytokines pro-inflammatoires et sur la maturation de l'interleukine-1 α .

Si les calpaïnes intracellulaires exercent un rôle pro-inflammatoire, les calpaïnes externalisées ont un effet anti-inflammatoire via le clivage de TLR2. Les calpaïnes peuvent en effet être excrétées hors des cellules via les transporteurs ABCA1. Dans le cadre d'un modèle murin de mélanome, nous avons pu montrer que l'inhibition des seules calpaïnes extracellulaires par la surexpression de calpastatine extracellulaire préserve TLR2 et limite ainsi la progression de la tumeur.

Les calpaïnes intra- et extracellulaires sont des médiateurs majeurs de la réponse inflammatoire et modulent « l'inflammaging » ainsi que la réponse immune anti-tumorale.

Calpain 1 and 2 are cysteine proteases and calpastatin is their natural inhibitor. Calpains and calpastatin are ubiquitous. Calpains are involved in inflammatory response development via activation by partial proteolysis of several substrates (NF-kappaB activation by I-kappaBalpha cleavage, remodeling of inflammatory cells cytoskeleton, cleavage of chaperone protein HSP90 ...).

It has been previously shown that calpains promote neuronal aging. We have shown in a mouse model that inhibition of calpain by calpastatin overexpression limits renal and vascular aging. The inflammation associated with aging or "inflammaging" is considerably reduced by specific inhibition of calpain. This is due, at least in part, to calpain effect on production of pro-inflammatory cytokines and in maturation of interleukin-1 alpha.

If intracellular calpains are pro-inflammatory, secreted calpains have an anti-inflammatory effect via cleavage of TLR2. Calpains can indeed be excreted out of the cells via the transporter ABCA1. In the context of a mouse model of melanoma, we have shown that inhibition of extracellular calpain by only extracellular calpastatin overexpression preserves TLR2 and thus limit the progression of the tumor.

Calpains intra- and extracellular are major mediators of inflammatory response and modulate the "inflammaging" and the anti-tumor immune response.