

Calpaines, protéine kinase C et développement du tissu musculaire

M. SAVART, M. BELAMRI, Véronique PALLET, A. DUCASTAING

*Laboratoire de Biochimie et Technologie des Aliments,
Université de Bordeaux I, Avenue des Facultés, 33405 Talence Cedex, France.*

Summary. *Calpains, protein kinase C and development of the muscle tissue.*

Calpains are Ca^{2+} -dependent thiol proteases which have been identified in various tissues of eucaryotes, but their physiological function in the cell is uncertain. In the muscle fiber, two types of calpains are present which differ by their calcium sensitivity : calpain 1 and calpain 2, which require for their activity micro and millimolar concentrations of calcium, respectively. These calpains are associated with protein kinase C activities in the differentiated fiber.

The multinucleate myotube is formed by fusion of mononucleated precursor cells, myoblasts. Calpains have been reported to appear in myoblasts at around the time of fusion. Moreover, an apparent synthesis of 1,2 diacylglycerol, an activator of protein kinase C, was observed during fusion of myoblasts. However, more information is required to incriminate totally protein kinase C and calpains in the mechanism of myoblast fusion.

Introduction.

Dans la fibre musculaire, la présence de deux types de Ca^{2+} -protéases thiol dépendantes ou calpaines (E.C 3.4.22.17) a été rapportée. La calpaine 2, active *in vitro* pour des concentrations en calcium de l'ordre de 1 à 2 mM, a été mise en évidence au niveau du muscle squelettique de lapin par Busch *et al.*, (1972). Cette calpaine a été ensuite isolée à partir du tissu musculaire de différentes espèces : porc (Dayton *et al.*, 1976), lapin (Azanza *et al.*, 1979), rat (Murachi *et al.*, 1981), homme (Suzuki *et al.*, 1979). La calpaine 1, qui nécessite pour son activation *in vitro*, des concentrations en calcium comprises entre 10 et 100 μM , a été mise en évidence dans le muscle squelettique par Dayton *et al.* (1981). L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide, en conditions dénaturantes, de ces deux enzymes, révèle pour chacune d'entre elles la présence de deux bandes protéiques de poids moléculaire 80 000 et 30 000 (Penny *et al.*, 1984). L'activité protéolytique est portée par la molécule de 80 000 daltons, mais le rôle de la molécule de 30 000 daltons est à l'heure actuelle totalement inconnu. Les calpaines ont toujours été purifiées à partir du cytosol, mais en 1981 Dayton *et*

al. montrèrent par immunocytochimie la présence de calpaine 2 au niveau de la face interne de la membrane plasmique de la cellule musculaire. Plus récemment, nous avons rapporté que dans le muscle squelettique la calpaine 1 d'origine cytosolique n'était pas une enzyme soluble, mais était liée à des fractions particulières (Savart *et al.*, 1987).

1. Relations entre calpaines et protéine kinase C au niveau de la cellule musculaire différenciée.

La protéine kinase C, mise en évidence en 1977 par Takai *et al.*, a été initialement présentée par ces auteurs comme une proenzyme activée par une protéase calcium dépendante. Cette proenzyme présente un poids moléculaire voisin de 80 000, et après protéolyse calcium dépendante, un fragment de 51 000 apparaît, qui porte l'activité kinase. Cependant, en 1977, seule était connue la calpaine 2, qui permettait d'activer la protéine kinase C pour des concentrations en calcium voisines de la millimole, alors que la concentration intracellulaire en cet ion varie entre 10^{-7} M et 10^{-6} M. Cela conduisit Takai *et al.* (1977) à rechercher un autre mode d'activation de la protéine kinase C. Ces mêmes auteurs rapportèrent ensuite une activation de la protéine kinase C par des phospholipides membranaires pour des concentrations en Ca^{2+} comprises entre 10^{-5} M et 10^{-4} M (Takai *et al.*, 1979a). Sur la base de ces résultats, la protéine kinase C fut alors définie comme une enzyme calcium et phospholipide dépendante. Enfin, il apparut que cette kinase Ca^{2+} et phospholipide dépendante nécessitait l'adjonction supplémentaire de diacylglycérol, estérifié avec des acides gras insaturés, pour fonctionner à des concentrations en Ca^{2+} de l'ordre de la micromole (Takai *et al.*, 1979b). En 1983, Kishimoto *et al.* observèrent que, dans le cerveau, la calpaine 1 copurifiait avec la protéine kinase C et pouvait l'activer. Au niveau de la fibre musculaire adulte, nous avons rapporté une association des calpaines 1 et 2 avec des activités protéine kinase C, et ce jusqu'au stade final de la purification (Savart *et al.*, 1987). Ces résultats laissent donc supposer qu'il existe, *in vivo*, une régulation de la protéine kinase C par les calpaines dans le tissu musculaire adulte.

2. Calpaines et fusion des myoblastes.

La fibre musculaire totalement différenciée est une cellule multinucléée qui dérive des myotubes, eux-mêmes formés au cours du développement embryonnaire par la fusion de myoblastes mononucléés (Wakelam, 1985). Il apparaît que la fusion de ces myoblastes est un phénomène dépendant du calcium (Shainberg *et al.*, 1969) et qui présente un optimum pour des concentrations en cet ion de l'ordre de la millimole (Wakelam, 1985). La dépendance vis-à-vis du calcium est spécifique, et d'autres ions divalents tels que le magnésium ou le manganèse ne permettent pas cette fusion. Une augmentation de la concentration intracellulaire

de calcium précède la fusion des myoblastes (David *et al.*, 1981) et l'apparition d'une calpaine au moment de cette fusion a été rapportée (Kaur et Sanwal, 1981). Cette relation entre calcium, calpaine et fusion membranaire ne semble d'ailleurs pas limitée aux myoblastes, puisqu'elle a été également mise en évidence avec des érythrocytes (Thomas *et al.*, 1983 ; Blow *et al.*, 1979 ; Ahkong *et al.*, 1980 ; Glaser et Kosower, 1986).

3. Protéine kinase C et fusion des myoblastes.

Au cours de la fusion des myoblastes, un activateur de la protéine kinase C, le 1,2 diacylglycerol (1,2 DG), est formé à partir de phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate (Wakelam, 1983). Le 1,2 DG étant connu comme fusogène dans d'autres systèmes (Quirk *et al.*, 1978), la protéine kinase C apparaît comme un acteur potentiel dans ces processus de fusion. Il faut souligner que les esters de phorbol qui sont également des activateurs de la protéine kinase C (Castagna *et al.*, 1982), inhibent la fusion des myoblastes (Sulakhe *et al.*, 1985). Cependant, des résultats récents ont montré que, d'une part le 1,2 DG et les esters de phorbol n'agissaient pas de manière identique en ce qui concerne la phosphorylation des protéines membranaires (Kiss et Luo, 1986) et que, d'autre part, ces esters de phorbol pouvaient inhiber la protéine kinase C de façon irréversible (Inagaki *et al.*, 1986). Enfin, Prives et Shinitzky (1977) ont montré que les acides oléiques et linoléiques facilitaient la fusion des myoblastes ; or, il est maintenant établi que ces acides gras insaturés sont de puissants activateurs de la protéine kinase C (Murakami *et al.*, 1986).

Conclusion et perspectives.

Ce bref exposé qui avait pour but de mettre en évidence le rôle éventuel des calpaines et de la protéine kinase C au cours du développement du tissu musculaire permet de souligner l'extrême complexité des mécanismes en cause. Nous avons montré qu'il existait au niveau de la fibre musculaire différenciée une association étroite entre calpaines et activité protéine kinase C (Savart *et al.*, 1987). Cependant, la présence de ces complexes calpaines-protéine kinase C au sein des cellules musculaires ne permet pas d'en déduire qu'ils sont directement impliqués dans le maintien de ce type cellulaire à l'état différencié. D'autre part en ce qui concerne les myoblastes, s'il existe une corrélation directe entre le moment de leur fusion et l'apparition d'une activité calpaine, il n'en est pas de même avec la protéine kinase C dont la présence à ce stade de développement cellulaire n'est pour l'instant envisagée que de façon indirecte. Par ailleurs, l'ensemble des mécanismes de différenciation de la fibre musculaire doit être considéré comme une cascade d'évènements cellulaires dont la chronologie et les interrelations correspondent à un schéma préétabli. On peut donc penser que la recherche du mode d'action de facteurs hormonaux ou d'origine neuronale capables de

moduler le développement de la cellule musculaire permettra d'impliquer ou non le système calpaïne-protéine kinase C dans ces processus de différenciation.

*13^e Réunion du groupe Développement
INRA Cap. d'Agde, 25-27 mai 1987.*

References

- AHKONG F., BOTHAM G. M., WOODWARD A. W., LUCY J. A., 1980. Calcium-activated thiol-proteinase activity in the fusion of rat erythrocytes induced by benzyl alcohol. *Biochem. J.*, **192**, 829-836.
- AZANZA J. L., RAYMOND J., ROBIN J. M., COTTIN P., DUCASTAING A., 1979. Purification and some physico-chemical enzymic properties of a calcium-ion activated neutral proteinase from rabbit skeletal muscle. *Biochem. J.*, **183**, 339-347.
- BLOW A. M. J., BOTHAM G. M., LUCY J. A., 1979. Calcium ions and cell fusion. *Biochem. J.*, **182**, 555-563.
- BUSCH W. A., STROMER M. H., GOLL D. E., SUZUKI A., 1972. Calcium specific removal of Z-lines from rabbit skeletal muscle. *J. Cell Biol.*, **52**, 367-381.
- CASTAGNA M., TAKAI Y., KAIBUCHI K., SANO K., KIKKAWA V., NISHIZUKA Y., 1982. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J. Biol. Chem.*, **257**, 7847-7851.
- DAVID J. D., SEC W. M., HIGGINBOTHAM C. A., 1981. Fusion of chick embryo skeletal myoblasts: role of calcium influx preceding membrane union. *Dev. Biol.*, **82**, 297-307.
- DAYTON W. R., GOLL D. E., ZEECE M. G., ROBSON R. M., REVILLE W. J., 1976. A calcium activated protease possibly involved in myofibrillar turn-over. Purification from porcine muscle. *Biochemistry*, **15**, 2150-2158.
- DAYTON W. R., SCHOLLMAYER J. V., 1981. Immunocytochemical localization of a calcium-activated protease in skeletal muscle. *Exp. Cell Res.*, **136**, 423-443.
- GLASER T., KOSOWER N. S., 1986. Fusion of rat erythrocytes by membrane mobility agent A₂C depends on membrane-proteolysis by a cytoplasmic calpain. *Eur. J. Biochem.*, **159**, 387-392.
- INAGAKI M., MAGIWARA M., SAITOH M., HIDAKA M., 1986. Protein kinase C negatively modulated by phorbol ester. *FEBS Lett.*, **202**, 277-281.
- KAUR M., SANWAL B. D., 1981. Regulation of the activity of a calcium-activated neutral protease during differentiation of skeletal myoblasts. *Can. J. Biochem.*, **59**, 743-747.
- KISHIMOTO A., KAJIKAWA N., SHIOTA M., NISHIZUKA Y., 1983. Proteolytic activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by calcium-dependent neutral protease. *J. Biol. Chem.*, **258**, 1156-1164.
- KISS Z., LUO Y., 1986. Phorbol esters and 1,2-diolein are not fully equivalent activators of protein kinase C in respect to phosphorylation of membrane proteins in vitro. *FEBS Lett.*, **198**, 203-207.
- MURACHI T., TANAKA K., HATANAKA M., MURAKAMI T., 1981. Intracellular calcium-dependent protease (calpain) and its molecular-weight endogenous inhibitor (calpastatin), **19**, 407-424. In WEBER G., *Advances in enzyme regulation*, Pergamon Press, New York.
- MURAKAMI K., CHAN S. Y., ROUTTENBERG A., 1986. Protein kinase C activation by *cis*-fatty acid in the absence of Ca²⁺ and phospholipids. *J. Biol. Chem.*, **261**, 15424-15429.
- PENNY I. F., TAYLOR M. A. J., HARRIS A. G., ETHERINGTON D. J., 1984. Purification and immunological characterisation of two calcium-activated neutral proteinases from rabbit skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta*, **829**, 244-252.
- PRIVES J., SHINITZKY M., 1977. Increased membrane fluidity precedes fusion of muscle cells. *Nature*, **268**, 761-763.

- QUIRK S. J., AHKONG Q. F., BOTHAM G. M., KOS J., LUCY J. A., 1978. Membrane proteins in human erythrocytes during cell fusion induced by oleoylglycerol. *Biochem. J.*, **176**, 159-167.
- SAVART M., BELAMRI M., PALLET V., DUCASTAING A., 1987. Association of calpains 1 et 2 with protein kinase C activities. *FEBS Lett.*, **216**, 22-26.
- SHAINBERG A., YAGIL G., YAFFE D., 1969. Control of myogenesis in vitro by Ca^{2+} concentration in nutritional medium. *Exp. Cell Res.*, **58**, 163-167.
- SULAKE P. V., JONSHON D. D., PHAN N. T., WILCOX R., 1985. Phorbol esters inhibits myoblast fusion and activates β -adrenergic receptor coupled adenylate cyclase. *FEBS Lett.*, **186**, 281-285.
- SUZUKI K., ISHIURA S., KATAMOTO T., SUGITA M., INAHORI K., 1979. Calcium-activated neutral protease from human skeletal muscle. *FEBS Lett.*, **104**, 355-358.
- TAKAI Y., KISHIMOTO A., INOUE M., NISHIZUKA Y., 1977. Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. *J. biol. Chem.*, **252**, 7603-7609.
- TAKAI Y., KISHIMOTO A., IWASAY Y., KAWAHARA Y., MORI T., NISHIZUKA Y., 1979a. Calcium dependent activation of a multifunctional protein kinase by membrane phospholipids. *J. biol. Chem.*, **254**, 3692-3695.
- TAKAI Y., KISHIMOTO A., KIKKAWA V., MORI T., NISHIZUKA Y., 1979b. Unsaturated diacylglycerol as a possible messenger for the activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase system. *Biochem. biophys. Res. Comm.*, **91**, 1218-1224.
- THOMAS P., LIMBRICK A. R., ALLAN D., 1983. Limited breakdown of cytoskeletal proteins by an endogenous protease controls Ca^{2+} -induced membrane fusion events in chicken erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, **730**, 351-358.
- WAKELAM M. J. O., 1983. Inositol phospholipid metabolism and myoblast fusion. *Biochem. J.*, **214**, 77-82.
- WAKELAM M. J. O., 1985. The fusion of myoblasts. *Biochem. J.*, **228**, 1-12.