

Université de Montréal

**Les rôles distincts des isoformes de la myosine II non-musculaire dans des processus cellulaires impliquant le cytosquelette d'actine**

par

Sara Solinet

Département de pathologie et biologie cellulaire

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de docteur  
en pathologie et biologie cellulaire

Décembre 2008

© Solinet, 2008

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

Les rôles distincts des isoformes de la myosine II non-musculaire dans des processus  
cellulaires impliquant le cytosquelette d'actine

présentée par:  
Sara Solinet

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Dr. Nicole Leclerc,  
Dr. Maria Leiza Vitale,  
Dr. Richard Bertrand,  
Dr. Andréa Le Blanc,  
Dr. Guy Doucet,

président-rapporteur  
directeur de recherche  
membre du jury  
examineur externe  
représentant du doyen de la FES

## Résumé

Le complexe actomyosine, formé de l'association de la myosine II avec les filaments d'actine, stabilise le cytosquelette d'actine et génère la contraction cellulaire nécessaire à plusieurs processus comme la motilité et l'apoptose dans les cellules non-musculaires. La myosine II est un hexamère formé d'une paire de chaînes lourdes (MHCs) et de deux paires de chaînes légères MLC20 et MLC17. La régulation de l'activité de la myosine II, c'est-à-dire son interaction avec les filaments d'actine, est directement liée à l'état de phosphorylation des MLC20, mais il reste beaucoup à découvrir sur l'implication des MHCs. Il existe trois isoformes de MHCs de myosine II, MHCIIA, MHCIIB et MHCIIC qui possèdent des fonctions à la fois communes et distinctes. Notre but est de mettre en évidence les différences de fonction entre les isoformes de myosine II, au niveau structurale, dans la stabilisation du cytosquelette d'actine, et au niveau de leur activité contractile, dans la génération des forces de tension.

Nous nous sommes intéressés au rôle des isoformes des MHCs dans l'activité du complexe actomyosine qui est sollicité durant le processus de contraction cellulaire de l'apoptose. Dans quatre lignées cellulaires différentes, le traitement conjoint au TNF $\alpha$  et à la cycloheximide causait la contraction et le rétrécissement des cellules suivi de leur détachement du support de culture. Par Western blot, nous avons confirmé que la phosphorylation des MLC20 est augmentée suite au clivage de ROCK1 par la caspase-3, permettant ainsi l'interaction entre la myosine II et les filaments d'actine et par conséquent, la contraction des cellules apoptotiques. Cette contraction est bloquée par l'inhibition des caspases et des ROCKs. MHCIIA est dégradée suite à l'activation de la caspase-3 alors que MHCIIB n'est pas affectée. En utilisant une lignée cellulaire déficiente en MHCIIB, ou MHCIIB (-/-), nous avons observé que la contraction et le détachement cellulaires durant l'induction de l'apoptose se produisaient moins rapidement que dans la lignée de type sauvage (Wt) ce qui suggère que l'isoforme B est impliquée dans la contraction des cellules

apoptotiques. Parallèlement, la kinase atypique PKC $\zeta$ , qui phosphoryle MHCIIIB et non MHCIIA, est activée durant l'apoptose. PKC $\zeta$  joue un rôle important puisque son inhibition bloque la contraction des cellules apoptotiques.

Par la suite, nous nous sommes intéressés à la modulation de la morphologie cellulaire par la myosine II. Les fibroblastes MHCIIIB (-/-), présentent un large lamellipode dont la formation semble due uniquement à l'absence de l'isoforme MHCIIIB, alors que les fibroblastes Wt ont une morphologie cellulaire étoilée. La formation du lamellipode dans les fibroblastes MHCIIIB (-/-) est caractérisée par l'association de la cortactine avec la membrane plasmique. La cortactine co-immunoprécipite uniquement avec MHCIIA (et pas avec MHCIIIB) dans les fibroblastes Wt et MHCIIIB (-/-). L'observation en microscopie confocale nous indique que MHCIIA interagit avec la cortactine dans les fibroblastes Wt mais très peu dans les fibroblastes MHCIIIB (-/-). La GTPase Rac1 est activée et relocalisée vers la membrane plasmique seulement dans les fibroblastes MHCIIIB (-/-), ce qui suggère que l'activation de Rac1, induite par l'absence de MHCIIIB, serait à l'origine de la formation du lamellipode dans les fibroblastes MHCIIIB (-/-). Ceci est vérifié par le fait que l'activation de Rac1, la formation des lamellipodes et la localisation membranaire de la cortactine sont a) induits par la blebbistatine et b) bloqués par l'inhibiteur de Rac1. Enfin, le bFGF qui active la voie des MAP kinases dans les fibroblastes Wt et MHCIIIB (-/-), induit des extensions cellulaires aberrantes dans les fibroblastes MHCIIIB (-/-). Nos résultats montrent l'implication de l'isoforme B de la myosine II dans la modulation de la morphologie cellulaire.

L'ensemble de nos résultats participe à distinguer la fonction structurale et contractile des isoformes A et B de myosine II dans la physiologie cellulaire.

**Mots-clés:** cytosquelette d'actine, myosine non-musculaire II, complexe actomyosine, contraction cellulaire, apoptose, cortactine, GTPase Rac1, lamellipode.

## Abstract

We are interested in studying the modulation of the actomyosin complex which is involved in different cellular processes such as cell locomotion and apoptosis. The actomyosin complex is formed by the association of actin filaments and myosin II. The non-muscle myosin II is a hexamer formed by one pair of heavy chains (MHCs) and two pairs of light chain (MLC20 and MLC17). The actomyosin activity is dependant on MLC20 and MHCs phosphorylation. There are three isoforms of MHCs (MHCIIA, MHCIIB and MHCIIC) which have common but also distinctive roles in several cellular processes. Our aim is to clarify the structural and contractile functions of each isoforme of myosin II in different cellular processes, in particular, cell contraction and cell morphology.

First, we studied the implication of myosin II isoforms A and B in cell shrinkage and detachment during apoptosis which are both dependent on actomyosin contractility. We treated four different cell lines with TNF $\alpha$  in combination with cycloheximide (CHX) to trigger apoptosis. We confirmed that TNF $\alpha$  induced caspase-3 activation, ROCK1 cleavage and increased MLC20 phosphorylation. We showed that TNF $\alpha$ /CHX induced the caspase-dependent MHCIIA degradation, whereas MHCIIB levels and association with the actin cytoskeleton remained virtually unchanged. Cell shrinkage and detachment were blocked by caspase and ROCKs inhibitors. Using the MHCIIB (-/-) cell line, we observed that the absence of MHCIIB did not affect cell death rate. However, MHCIIB (-/-) fibroblasts showed more resistance to TNF $\alpha$ -induced actin disassembly, cell shrinkage and detachment than wild type (Wt) fibroblasts, indicating the participation of MHCIIB in these events. PKC $\zeta$ , which only phosphorylates MHCIIB, was cleaved during apoptosis, co-immunoprecipitated preferentially with MHCIIB and, interestedly, PKC $\zeta$  inhibition blocked TNF $\alpha$ -induced shrinkage and detachment. Our results demonstrate that MHCIIB, together with MLC phosphorylation and actin, constitute the actomyosin cytoskeleton that mediates contractility during apoptosis.

Second, we studied the involvement of myosin II isoforms A and B in cell shape modulation. Fibroblasts MHCIIB (-/-) spontaneously formed lamellipodia whereas Wt fibroblasts presented a stellate shape. Cortactin was associated with the leading edge of lamellipodia in MHCIIB (-/-) fibroblasts, but it localised diffusely in the cytoplasm or at the end of fine cellular projections in Wt fibroblasts. The levels of cortactin and cortactin phosphorylated in Tyr421 associated with membrane in MHCIIB (-/-) fibroblasts were higher than in Wt fibroblasts. Cortactin coimmunoprecipitated with MHCIIA but not with MHCIIB. Confocal microscopy showed cortactin/MHCIIA colocalization in wild type but not in MHCIIB (-/-) fibroblasts. Activation and membrane association of the small GTPase Rac1 were higher in MHCIIB (-/-) than in wild type fibroblasts. Lamellipodia formation, and cortactin and Rac1 membrane localization were a) blocked by inhibition of Rac1-GTP exchange factors in MHCIIB (-/-) fibroblasts, and b) induced by inhibition of myosin II ATPase and cross-linking activities in wild type fibroblasts. bFGF which activates Erk1/2 in wild type and MHCIIB (-/-) fibroblasts, induced the formation of aberrant membrane projections in MHCIIB (-/-) fibroblasts. Our results indicate that the absence of MHCIIB is a stimulus for Rac1 activation which induces the recruitment of actin-binding proteins such as cortactin to modulate the shape of the cell.

In conclusion, our results contribute to characterize the structural and contractile role myosin II isoforms A and B in the physiology of the cell.

**Keywords:** actin cytoskeleton, nonmuscle myosin II, actomyosin complex, cell contraction, apoptosis, cortactin, GTPase Rac1, lamellipodia formation.

## Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Table des matières.....	vii
Liste des abréviations.....	x
Liste des figures de l'introduction .....	xiii
Remerciements.....	xv
INTRODUCTION .....	1
I. Le cytosquelette.....	1
I.1 Les filaments intermédiaires.....	2
I.1.1 Les protéines associées aux filaments intermédiaires.....	5
I.2 Les microtubules.....	6
I.2.1 Les protéines associées aux microtubules .....	8
I.2.2 Les moteurs moléculaires et le transport intracellulaire .....	10
I.3 Les microfilaments .....	11
I.3.1 L'actine.....	12
I.3.2 Les filaments d'actine.....	12
I.3.3 La cinétique de polymérisation.....	13
I.3.4 Les protéines de liaison à l'actine.....	14
II. Les myosines .....	22
II.1 La myosine non-musculaire de classe II .....	22
II.1.1 Fonction.....	22
II.1.2 Structure .....	24
II.2 Les chaînes légères de myosine II.....	24
II.3 Les chaînes lourdes de myosine II.....	25
II.3 Les isoformes des chaînes lourdes de myosine II .....	26
II.3.1 Étude de la fonction des isoformes par délétion des gènes .....	30

II.4 Régulation de l'activité de la myosine II.....	33
II.4.1 La régulation de l'activité de la myosine II par les MLC20.....	33
II.4.2 Les kinases impliquées dans la phosphorylation des MLC20.....	33
II.4.3 La phosphatase des MLC20 .....	37
II.4.5 La régulation des chaînes lourdes MHCs par phosphorylation.....	39
II.4.6 Les kinases impliquées dans la phosphorylation des chaînes lourdes.....	42
II.5 Le complexe actomyosine .....	47
III. L'implication du complexe actomyosine dans les changements morphologiques d'une cellule apoptotique .....	49
III.1 La morphologie cellulaire .....	49
III.2 L'apoptose.....	49
III.3 Les changements morphologiques associés à l'apoptose.....	51
III.3.1 Le facteur de nécrose tumorale-alpha .....	53
III.3.2 Les récepteurs au TNF $\alpha$ .....	54
III.3.3 L'apoptose induite par le TNF $\alpha$ .....	54
IV. La myosine II non-musculaire et les lamellipodes .....	63
IV.1 L'implication des Rho GTPases dans la dynamique membranaire .....	63
IV.1.1 Le rôle de Rac dans la formation du lamellipode .....	66
IV.1.2 La famille des protéines WASP.....	69
IV.1.3 Le complexe ARP2/3 .....	70
IV.1.4 La cortactine .....	70
IV.2 La myosine II et la formation des lamellipodes.....	78
IV.2.1 Les relations entre myosine II, cortactine et Rac1 .....	79
V. Les modèles utilisés .....	82
V.1 Les cellules folliculo stellaires de l'hypophyse antérieure et la lignée TtT/GF .....	82
V.2 La lignée de fibroblastes NIH 3T3 .....	84
V.3 La souche de fibroblastes embryonnaires knockout pour MHCIIIB.....	85
VI. Hypothèse de recherche .....	87



RESULTATS .....	89
I. Premier article:.....	89
Isoform B of myosin II heavy chain mediates actomyosin contractility during TNF $\alpha$ -induced apoptosis.....	89
I.1 Summary .....	90
I.2 Introduction.....	91
I.3 Results.....	94
I.4 Discussion.....	102
I.5 Materials and methods.....	107
I.6 Acknowledgments .....	114
I.7 References.....	115
I.8 Figures and legends .....	120
I.9 Supplementary material .....	142
II. Deuxième article:.....	147
Isoform B of myosin II affects the cell shape by interfering with the activation of the small GTPase Rac1 .....	147
II.1 Summary .....	148
II.2 Introduction .....	149
II.3 Results .....	151
II.4 Discussion .....	157
II.5 Materials and methods.....	162
II.6 Acknowledgments .....	168
II.7 References .....	169
II.8 Figures and legends .....	174
II.9 Supplementary data .....	199
DISCUSSION .....	202
Bibliographie.....	215
Annexe 1: Publication en second auteur.....	I

## Liste des abréviations

ADF: actin depolymerizing factor

ADP: adénosine diphosphate

ARP2/3: actin-related proteins 2 and 3

ATP: adénosine triphosphate

CASVM: Server for SVM Prediction of Caspase Substrates Cleavage Sites

CHX: cycloheximide

DAG: di-acylglycérol

Dapi: 4',6-diamidino-2-phenylindole

DISC: death inducing signalling complex

ERK1/2: extracellular signal-regulated kinases 1 and 2

FADD: Fas-associated death domain protein

FERM domain: F pour 4.1 (band 4.1), E pour ezrine, R pour radixine et M pour moesine.

FGF: fibroblastic growth factor

FGFR: fibroblastic growth factor receptor

FIs: filaments intermédiaires

FRAP: fluorescence recovery after photobleaching

GAP: GTPase-activating protein

GEF: GTPase-exchange factor

Grb2: growth factor receptor-bound protein 2

GTP: guanosine triphosphate

HMM: heavy meromyosin

IAP: inhibitor of apoptosis

IFAP: intermediate filaments associated protein

LMM: light meromyosin

MAPK: mitogen-activated protein kinase

MAPs: microtubule-associated proteins

MCAK: mitotic centromere-associated kinesin

MEFs: fibroblastes embryonnaires de souris

MF: microfilament

MHC: chaîne lourde de myosine

MHCIIA: isoforme A des chaînes lourdes de myosine non musculaire II

MHCIIB: isoforme B des chaînes lourdes de myosine non musculaire II

MHCIIC: isoforme C des chaînes lourdes de myosine non musculaire II

MLC: chaîne légère de myosine non-musculaire II, MLC17: chaîne légère essentielle, 17

KDa, MLC20: chaîne légère régulatrice, 20 KDa

MT: microtubule

NPFs: nucleation-promoting factors

PAK: p21-activated kinase

PDGF: platelet-derived growth factor

PIP2: phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate

PMA: phorbol myristate acetate

PRD: proline-rich domain

PS: phosphadidyl-sérine

RBL: rat basophilic leukemia

ROCK: Rho-dependent kinase

SH3: Src homology domain 3

siRNA: small interfering RNA

STOP: stable tubule only protein

TAC: tip attachment complex

TGN: trans-Golgi network

TNF $\alpha$ : tumor necrosis factor-alpha

TNFR: TNF $\alpha$  receptor

TRADD: TNF receptor-associated death domain protein

WASP: Wiskott-Aldrich syndrome protein

Wt: wild type ou de type sauvage

ZO-1: tight junction protein zonula occludens 1

## Liste des figures de l'introduction

**Figure 1:** La régulation de l'activité de la myosine II non-musculaire par phosphorylation des MLC20. Page 38.

**Figure 2:** La molécule de myosine II est organisée en trois formes distinctes in vitro. Page 40.

**Figure 3:** Représentation schématique des changements morphologiques et de la réorganisation du cytosquelette d'actine lors de l'apoptose. Page 52.

**Figure 4:** La forme clivée de ROCK1. Page 60.

**Figure 5:** Représentation schématique du rôle des GTPases Rac et Cdc42 dans la formation des extensions membranaires. Page 65.

**Figure 6:** RhoA et Rac1 régulent la dynamique du cytosquelette d'actine via la cofiline. Page 68.

**Figure 7:** Représentation schématique des domaines de la cortactine et de ses partenaires. Page 73.

**Figure 8:** Modèle proposé de la régulation de la cortactine par phosphorylation en sérine et tyrosine. Page 75.

**Figure 9:** Les rôles distincts de Rho et Rac dans le contrôle de l'activité du complexe actomyosine. Page 81.

*A ma maman.*

## Remerciements

Je remercie ma directrice de recherche, Dr. Maria L. Vitale, de m'avoir permis de faire ma formation de doctorat dans son laboratoire, pour sa rigueur scientifique, son expertise, ses conseils pour la rédaction et sa disponibilité tout au long de mon doctorat.

Je remercie le Dr. Marc R. Pelletier de m'avoir permis d'utiliser le matériel de son laboratoire et pour ses conseils à la rédaction des articles.

Je remercie les Dr. Nicole Leclerc, Dr. Andréa Le Blanc et Dr. Richard Bertrand d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je remercie les Dr. Nicole Leclerc, Dr. Lucian D. Ghitescu et Dr. Richard Bertrand d'avoir participé aux comités de parrainages et examen pré-doctoral et pour leurs conseils sur l'évolution de mon projet de recherche.

Je remercie l'ensemble des personnes avec qui j'ai eu l'occasion de travailler dans le laboratoire: Marie-Ève Fortin, Guifu Zeng et Mélissa Meilleur, Li Chen et plus particulièrement Casimir D. Akpovi, avec qui, j'ai beaucoup apprécié travailler et qui m'a énormément appris.

Je remercie l'ensemble des membres du département de pathologie et de biologie cellulaire qui m'ont apporté leur aide, leur expertise et leur temps: Mr. Christian Charbonneau et Mr. Michel Lauzon pour la microscopie, Mr. Patrick Gendron pour son aide en bioinformatique, Mme. Christiane Rondeau pour le protocole d'isolation des membranes, Mme. Ginette Guay pour le protocole de vidéo-microscopie et Mme Francine Jolicoeur pour l'utilisation du lecteur de microplaque.

Un énorme merci aux Dr. Anaick Lagana, Dr. Sophie Duclos et Mlle. Annie Laplante pour leurs conseils avisés, leurs expertises techniques et leur amitié.

Enfin, je remercie du plus profond du cœur ma maman pour tout l'amour et le réconfort qu'elle m'apporte depuis toujours, ma famille, mon copain pour son soutien malgré la distance et mes amis de France et du Québec.



# INTRODUCTION

## I. Le cytosquelette

Le cytosquelette est composé d'un réseau de fibres protéiques allongées obtenues par la polymérisation d'éléments monomériques. Le cytosquelette n'est pas rigide mais plutôt une structure très dynamique qui se réorganise continuellement au cours des différents événements cellulaires (migration, division, etc.). L'organisation du cytosquelette des eucaryotes est très bien conservée, bien que des différences importantes existent entre les cellules animales et végétales. Par contre, le cytosquelette des procaryotes semble organisé de façon tout à fait différente (Madkour et Mayer, 2007).

Chez les eucaryotes, le cytosquelette est impliqué dans un grand nombre de processus tels que les mouvements cellulaires comme la migration cellulaire, la contraction musculaire et la cytokinèse, les mouvements intracellulaires comme le déplacement des organites, les phénomènes d'endocytose, d'exocytose et de transcytose et le transport des chromosomes. Le cytosquelette est aussi directement lié à la forme cellulaire qui caractérise chaque type cellulaire, procure à la cellule une certaine résistance contre les agressions mécaniques et assure le maintien des structures internes de la cellule tels que les différents compartiments membranaires. Le cytosquelette est aussi impliqué dans l'attachement des cellules entre elles, dans la formation d'extensions membranaires tels les lamellipodes et filopodes mais aussi les extensions membranaires qui permettent la phagocytose.

Bien entendu, la liste des implications du cytosquelette que nous venons de présenter n'est pas exhaustive; les domaines de recherches qui ciblent le cytosquelette sont divers et de nombreux rôles peuvent encore lui être attribués. Durant ce travail de doctorat, nous nous sommes intéressés au rôle du cytosquelette d'actine et du complexe actomyosine dans les changements de la morphologie cellulaire induits par différents stimuli.

Les filaments qui constituent le cytosquelette ont été répertoriés en trois catégories selon leur diamètre au microscope électronique: les microtubules, les filaments intermédiaires et les microfilaments. Ces trois types de filaments sont très différents les uns des autres et sont impliqués dans des processus cellulaires différents mais, ils partagent certaines propriétés communes et sont impliqués dans des processus cellulaires commun. Cependant, leurs fonctions ne sont pas redondantes et la perte d'un des types de filaments ne pourrait pas être compensée par les deux autres. De plus, il existe un grand nombre de protéines de liaison spécifiques à chaque type de filament qui leur confèrent des propriétés spécifiques de stabilisation ou au contraire de déstabilisation, ce qui participe à leur dynamique. Les trois types de filaments ne sont pas indépendants, il existe des ponts protéiques entre eux et la collaboration entre les différents filaments du cytosquelette a lieu dans de nombreux phénomènes tels que la migration cellulaire et le transport intracellulaire.

## **I.1 Les filaments intermédiaires**

Les filaments intermédiaires (FIs) ont été découverts en microscopie électronique et leur nom provient du fait que leur diamètre a une valeur intermédiaire entre celles des microfilaments et des microtubules. Ce sont des polymères stables formés de protéines fibreuses qui s'assemblent en filaments de 8 à 12 nm (Coulombe et Omary, 2002; Coulombe et Wong, 2004). Leur rôle est principalement structural et permet le maintien et la cohésion de l'architecture tissulaire et des adhérences cellulaires (Helfand et coll., 2004). On retrouve ces filaments connectés aux niveaux des desmosomes et hémidesmosomes qui sont des structures impliquées dans l'adhésion cellule-cellule et dans l'adhésion avec la matrice extracellulaire respectivement (Green et Jones, 1996).

Il y a plus de 65 gènes différents codant pour les protéines composants les FIs et leur expression dépend du type cellulaire (Hesse et coll., 2001). On peut donc se servir des FIs pour déterminer un type cellulaire: la vimentine dans les fibroblastes, les neurofilaments dans les neurones, les cytokératines dans les cellules épithéliales. Les FIs

sont les filaments les plus abondants du cytosquelette au niveau de l'axone des neurones et dans les cellules épidermiques. Et bien sûr, tous les types cellulaires contiennent les lamines spécifiques du noyau cellulaire. On distingue 6 grandes classes de protéines composant les filaments intermédiaires classifiées selon des critères structuraux et biochimiques:

Les kératines sont des hétérodimères formés d'une chaîne polypeptidique acide (type I) et d'une autre basique ou neutre (type II). On distingue deux sous-classes, les kératines des tissus épithéliaux cornés qui composent nos poils et ongles et les cytokératines principalement représentées au niveau des épithéliums internes.

Les protéines dites de type III représentées par la vimentine dans les cellules mésenchymateuses comme les fibroblastes, la desmine dans les cellules musculaires, la protéine fibrillaire gliale acide (GFAP) dans les astrocytes et la périphérine dans les neurones.

Les protéines de type IV: Les neurofilaments (NF1, NFm, NFh) et l'internexine alpha sont des hétérotrimères localisés dans les neurones et les cellules du système neuroendocrinien périphérique.

Les lamines (Type V) se retrouvent uniquement dans le noyau où elles interagissent avec la chromatine et jouent un rôle de soutien de l'enveloppe nucléaire et de dérégulation de la transcription (Weber et coll., 1989; Broers et coll., 2006).

Enfin, le groupe des nestines (Type VI) comprend des protéines exprimées dans les cellules souches neuroépithéliales (Gilyarov, 2008).

Les monomères des filaments intermédiaires possèdent une région centrale hélicoïdale qui permet la dimérisation et deux extrémités globulaires N-terminal et C-terminal qui sont le siège de modifications post-traductionnelles comme les phosphorylations et glycosylations, ce qui participe à moduler l'activité

d'assemblage/désassemblage des FIs (Omary et coll., 1998; Coulombe et Omary, 2002; Green et coll., 2005) (Ku et coll., 1996). Les mécanismes de régulation de la dynamique assemblage/désassemblages des FIs sont peut connus (Helfand et coll., 2003). Certains travaux se sont intéressés à la dynamique des FIs durant la mitose: les FIs sont désassemblés et agrègent pendant la prophase jusqu'à la métaphase et sont concentrés proches des centrosomes puis se réassemblent dans chaque cellule fille (Jones et coll., 1985; Chou et coll., 1990). D'autres données prouvent que les FIs ne sont pas des structures statiques et que la dynamique des FIs est modulée par différents stimuli: le réseau de FIs est rapidement désorganisé et les FIs forment des agrégats en conditions de stress comme un shock thermique (Collier et coll., 1993) ou la déprivation de facteurs de croissance (Djabali et coll., 1997). Le réseau des FIs est réarrangé aussi en fonction de l'activation de certaines kinases comme PKC (Geisler et coll., 1989) ou PAK (Goto et coll., 2002). L'organisation cytoplasmique des FIs est donc flexible et répond à un ensemble de facteurs intra et extracellulaires. En plus, les FIs sont capables de mouvements et leurs propriétés mobiles sont soit intrinsèques soit attribuées à leur liaison avec les autres éléments du cytosquelette qui sont associés avec des moteurs moléculaires (Helfand et coll., 2004).

Les FIs se différencient des autres éléments du cytosquelette, par leurs propriétés biochimiques car ils restent insolubles dans les conditions qui solubilisent les autres éléments du cytosquelette et sont insensibles aux agents de dépolymérisation; mais malgré cela, les FIs ne peuvent pas, à eux seuls, maintenir la forme de la cellule lorsque les autres filaments sont dépolymérisés (Zackroff et Goldman, 1979). Les FIs s'associent en filaments torsadés à partir de sous unités fibreuses  $\alpha$ -hélicoïdales (Herrmann et Aebi, 1998; 2000) qui ne possèdent pas d'activité enzymatique connue (Strelkov et coll., 2003). Contrairement aux autres filaments qui composent le cytosquelette, les FIs ne sont pas associés à des moteurs moléculaires et ne sont pas des filaments polarisés. Contrairement aux microfilaments et aux microtubules, les FIs se différencient par leur grande flexibilité et leur résistance à la cassure. La desmine, les kératines K5/K4 et les neurofilaments peuvent être étirés jusqu'à 200% de leur taille initiale sans se briser alors que les microfilaments et

les microtubules se cassent très facilement lorsqu'ils sont étirés. Cette caractéristique d'étirement s'accompagne de la réduction du diamètre du FI et serait due au fait que les composantes du FI glissent les unes sur les autres. FIs se différencient aussi des microfilaments et des microtubules par leur dynamique d'assemblage: les microfilaments et les microtubules forment des structures fermées et polarisées qui permettent l'échange de sous-unités uniquement aux bouts des polymères, alors que les FIs sont des structures ouvertes permettant l'échange de sous-unités ou d'oligomères tout le long du filament. C'est cet échange latéral qui fait des FIs des polymères très dynamiques du point de vue spatiotemporel en terme d'assemblage/désassemblage.

### **I.1.1 Les protéines associées aux filaments intermédiaires**

Les protéines associées aux filaments intermédiaires (IFAP) modulent l'interaction des filaments entre eux et avec d'autres structures. C'est le cas de la famille des protéines plakines qui forment de longues connexions fibreuses et associent les éléments du cytosquelette entre eux (Sonnenberg et Liem, 2007). C'est le domaine N-terminal des plakines qui détermine l'association spécifique avec un autre élément du cytosquelette et le domaine C-terminal est impliqué dans la liaison au réseau de filaments intermédiaires. Cette famille comprend aussi la périplakine et la plectine qui associent les FIs aux microtubules (Wiche, 1998; Osmanagic-Myers et coll., 2006) et les protéines qui forment les desmosomes et les hémidesmosomes comme les desmoplakines et les plakoglobines qui associent les FIs à la membrane plasmique (Green et coll., 1990). La famille des protéines filaggrine (Steinert et Marekov, 1995) associe les filaments de kératines entre eux dans les cellules épidermiques et les mutations de cette protéine aboutissent à des formes sévères de dessèchement de la peau (Weidinger et coll., 2006). Les filaments de vimentine sont associés à la membrane plasmique et au noyau via l'ankyrine et la spectrine (Georgatos et Marchesi, 1985). Enfin, l'interaction de la lamine A avec les protéines Sun 1/2, protéines de la membrane interne de l'enveloppe nucléaire, et l'interaction des nesprines 1/2, protéines

de la membrane externe de l'enveloppe nucléaire, avec les filaments d'actine, forment un pont entre les lamines A et les microfilaments (Crisp et coll., 2006; Haque et coll., 2006).

## I.2 Les microtubules

Les microtubules (MTs) sont les plus grosses fibres qui constituent le cytosquelette et, contrairement aux autres filaments, les microtubules se présentent sous la forme de tubes creux de 25 nm de diamètre environ, avec une dynamique très rapide. Les MTs sont comparés à des «poutres» qui permettent le maintien et le support de la forme cellulaire. Les MTs ont aussi un rôle dans le transport intracellulaire par leur association avec des moteurs moléculaires: kinésines et dynéïne qui sont impliquées dans le transport des organelles et des chromosomes (Inoue et Salmon, 1995; Hirokawa et coll., 1998).

Les MTs s'assemblent par polymérisation d'hétérodimères de tubuline- $\alpha$  et - $\beta$  très stables. Le monomère de tubuline- $\alpha$  se fixe de façon irréversible à une molécule de GTP alors que le monomère de tubuline- $\beta$  fixe et hydrolyse une molécule de GTP. La polymérisation se réalise en 3 étapes distinctes:

- Les dimères de tubuline- $\alpha$  et - $\beta$  s'apparient et finissent par constituer un protofilament.

- Puis, il y a formation d'un fragment de microtubule via l'association latérale de 10 à 15 protofilaments qui finit par se replier pour former une structure rigide et creuse. Au cours de cette polymérisation, le GTP de la tubuline- $\beta$  de l'avant dernier dimère est hydrolysé en GDP.

- Du fait de la polarité du dimère  $\alpha\beta$ , il en résulte une polarité dans le protofilament puis dans le microtubule. On distingue l'extrémité (+) qui commence par la sous-unité  $\alpha$  et l'extrémité (-) qui se termine par la sous-unité  $\beta$ . L'extrémité (+) polymérise beaucoup plus

rapidement que l'extrémité (-) in vitro, et en règle générale, l'extrémité (-) est ancrée aux centrosomes donc l'élongation du MT se fait au niveau de l'extrémité (+).

Les microtubules ont la propriété de polymériser (de croître) lentement alors qu'ils se dépolymérisent rapidement (événement de catastrophe) (Mitchison et Kirschner, 1984) (Cassimeris et coll., 1987). Ce phénomène connu sous le nom d'instabilité dynamique se traduit par le fait que les MTs d'une même cellule peuvent être à des états différents de polymérisation et de dépolymérisation. Les MTs sont impliqués à la fois dans des structures stables (permanentes) et aussi dans des structures plus dynamiques (transitoires) où les événements de polymérisation/dépolymérisation sont plus nombreux. L'instabilité dynamique du MT est stabilisée par la capture de l'extrémité (+) par différentes protéines comme dans les kinétochores (Hayden et coll., 1990) et les TACs (tip attachment complex) (Waterman-Storer et coll., 1995).

Les microtubules d'une cellule sont, en général, polymérisés à partir d'un même endroit proche du noyau cellulaire: il s'agit du centrosome (Doxsey, 2001) ou centre organisateur de microtubules (MTOC) composé des centrioles entourées de protéines péricentriolaires (Doxsey, 2001). La tubuline- $\gamma$  initie la nucléation en formant un anneau qui sert de modèle de départ pour la croissance d'un nouveau microtubule mais n'entre pas dans la composition des MTs (Meads et Schroer, 1995; Tassin et Bornens, 1999). En règle générale, Le MTOC séquestre toutes les extrémités (-) des microtubules du cytosol, laissant l'extrémité (+) libre de se polymériser ou de se dépolymériser. Il faut noter toutefois, que l'organisation des MTs ne dépend pas toujours du centrosome. Dans les dendrites et les cellules épithéliales, les MTs peuvent aussi s'associer de façon antiparallèle et sont stabilisés par des protéines de liaison aux extrémités.

Les tubulines- $\alpha$  et - $\beta$  sont la cible de modifications post-traductionnelles comme l'acétylation et l'élimination du résidu tyrosine en C-terminal qui sont des signaux pour l'interaction avec les protéines associées aux MTs. Dans la plupart des cellules indifférenciées de mammifères, les MTs ont une dynamique très élevée, par contre, dans les

cellules différenciées ou en migration, qui présentent une polarité cellulaire définie, certains MTs sont très stables et ont une demi-vie de plus de 1 heure (Gundersen et Bulinski, 1986; 1988; Gundersen et coll., 1989). La stabilité de ces MTs est attribuée au fait qu'ils sont d'une part coiffés/stabilisés en leur extrémités (+) et d'autres part, qu'ils sont formés de tubuline modifiée post-traductionnellement. Il s'agit de tubuline- $\alpha$  détyrosinée en C-terminale par la tubuline carboxypeptidase (Westermann et Weber, 2003). On peut, à l'aide d'anticorps, différencier les MTs qui ont incorporé de la tubuline tyrosinée (Tyr-MTs) des MTs plus stables qui ont incorporé de la tubuline détyrosinée (Glu-MTs) (Gundersen et coll., 1984). Certaines kinésines interagissent préférentiellement avec les Glu-MTs in vitro (Kreitzer et coll., 1999) et le recyclage de la transferrine ainsi que l'extension des filaments de vimentine sont dépendant des Glu-MTs (Gurland et Gundersen, 1995).

### **I.2.1 Les protéines associées aux microtubules**

Les protéines qui modulent la dynamique des MTs sont appelées MAPs (microtubule-associated proteins) et sont classées en plusieurs sous-familles incluant les MAPs associées à l'extrémité (+), les MAPs associées à l'extrémité (-) et au centrosome, les MAPs associées tout au long du MT, les MAPs avec une activité enzymatique, comme les moteurs moléculaires, les MAPs de clivage des MTs, et enfin, les MAPs structurales ou de type classique (Schuyler et Pellman, 2001).

Dans la sous-famille des protéines associées à l'extrémité (+), on distingue:

Les protéines MCAKs (mitotic centromere-associated kinesins) qui se lient aux extrémités (+) et provoquent la déstabilisation des MTs, comme les kinésines Kin I (Desai et coll., 1999). La surexpression de MCAKs dans un tissu cellulaire provoque la perte des MTs par une succession d'évènements de «catastrophe» (Maney et coll., 2001).

Les protéines de liaison à l'extrémité (+), +TIPs, semblent être impliquées dans la stabilisation de l'extrémité (+) du MT, comme la famille de protéines CLIP-170 qui



forment un lien entre la membrane des endosomes et les MTs (Perez et coll., 1999). Les expériences de Perez et coll. mettent en évidence que CLIP-170, en plus de stabiliser le MT, se déplace avec l'extrémité (+) suggérant une interaction avec la tubuline nouvellement intégrée par polymérisation (c'est un mécanisme qu'on retrouve dans le fonctionnement des facteurs d'élongation). La famille des protéines CLASP se lie aussi au niveau de l'extrémité (+) (Mimori-Kiyosue et coll., 2005) et recrutent EB1 qui recrute, à son tour, APC (adenomatous polyposis coli) (Mimori-Kiyosue et coll., 2000). EB1, APC et le facteur d'élongation mDia forment ensemble un complexe au niveau de l'extrémité (+) des Glu-MT. Ce complexe est localisé au niveau du lamellipode des cellules en migration et l'expression d'un dominant négatif de EB1 inhibe la migration cellulaire des NIH 3T3 (Wen et coll., 2004).

La famille des MAPs structurales ou «classiques» sont des protéines de stabilisation et de pontage entre 2 éléments: un ou plusieurs domaines liant les MTs et un autre domaine liant soit la membrane plasmique, les filaments intermédiaires, les microfilaments ou encore un autre MT (Togel et coll., 1998; Dehmelt et Halpain, 2005). Cette famille comprend les protéines Tau, MAP2, MAP1A/1B, exprimées de façon prédominante dans les tissus nerveux, la protéine non-neuronale MAP4 et la famille des protéines STOP (stable tubule only protein) (Halpain et Dehmelt, 2006). Ces protéines associent deux MTs avec des propriétés différentes dues à l'espace entre chaque domaine (c'est une caractéristique qu'on retrouvera chez les protéines de liaison aux microfilaments). L'hyperphosphorylation de Tau rend la protéine insoluble, ce qui forme des agrégats au niveau du corps cellulaire des neurones et des dendrites. C'est ce type de phénomène qu'on trouve dans le cerveau des malades atteints de la maladie d'Alzheimer et de démence frontotemporale (Gotz et Ittner, 2008).

Les MAPs ont aussi un rôle de stabilisation des microtubules et peuvent modifier la dynamique d'assemblage ou de démantèlement des microtubules. L'activité de ces MAPs est contrôlée par phosphorylation et les MAP kinases jouent un rôle important.

Il existe aussi des protéines de séquestration de la tubuline qui ont une activité de déstabilisation, comme Op18/stathmine (Gavet et coll., 1998) et aussi des MAPs de clivage des MTs comme la katanine, localisée au niveau du centrosome (Hartman et coll., 1998), et la spastine (Salinas et coll., 2005; Salinas et coll., 2007).

Les protéines qui séquestrent l'extrémité (+), ont un rôle de stabilisation et peuvent aussi se servir de la croissance du microtubule à l'extrémité (+) comme d'une énergie motrice. C'est le cas des kinétochores qui connectent les MTs aux chromosomes et permettent le déplacement de ces derniers pendant la métaphase et l'anaphase de la mitose (Inoue et Salmon, 1995; Rieder et Salmon, 1998). Le complexe TACs lie les extrémités (+) des MTs avec la membrane du réticulum endoplasmique (RE) et permet le déplacement de membrane. D'ailleurs, plusieurs travaux montrent que la position et l'extension de la membrane du RE, comme celle de l'appareil de Golgi, sont directement liées avec la position des MTs (Terasaki et coll., 1986; Lee et coll., 1989). Les microtubules sont donc capables, à eux seuls, de déplacer (pousser ou rétracter) des structures cellulaires ancrées à l'extrémité (+) par le fait seul des événements de polymérisation/dépolymérisation (Howard et Hyman, 2003); on observera d'ailleurs, un cas similaire avec les microfilaments. Il existe aussi des moteurs moléculaires spécifiques du transport intracellulaires dépendants des MTs.

## **I.2.2 Les moteurs moléculaires et le transport intracellulaire**

Les vésicules et particules intracellulaires se déplacent à l'intérieur du cytoplasme à partir des microtubules et d'un type particulier de protéines associées: les moteurs moléculaires (Hirokawa et coll., 1998). Les moteurs moléculaires sont des protéines

capables de transformer l'énergie chimique obtenue par hydrolyse de l'ATP en une énergie mécanique (Vale et Milligan, 2000). Les kinésines forment une grande famille (plus de 45 membres) et sont impliquées dans le transport vectoriel antérograde, c'est-à-dire le transport de particules de l'extrémité (-) vers l'extrémité (+) des microtubules, tel le transport d'organelles, de complexe protéique et d'ARNm (Hirokawa et coll., 1998). D'autres protéines apparentées à la kinésine (KRP) sont impliquées dans le transport vers l'extrémité (-), transport rétrograde, et participent à la séparation des chromosomes durant la mitose et la méiose. La dynéine est un moteur moléculaire dirigé vers le bout (-) du microtubule et impliqué dans l'endocytose, les voies de dégradation lysosomiale, l'oscillation des cils des cellules ciliées et le transport des chromosomes (Vallee et coll., 2004). La dynéine forme un polymère protéique contrôlé par le complexe dynactine qui lie les membranes plasmiques et autres cargo (Hildebrandt et Hoyt, 2000).

On a observé la présence de plusieurs types de moteurs moléculaires liés à la même charge. Soit des moteurs moléculaires spécifiques des microtubules, kinésines et dynéine suggérant à la fois un mouvement antérograde et rétrograde. Soit des moteurs moléculaires spécifiques des microtubules et des microfilaments, kinésines et myosines suggérant une coopération des moteurs moléculaires dans le transport vésiculaires: comme par exemple, lors du transport de vésicules à travers le réseau cortical pauvre en microtubules mais riche en microfilaments. Dans ce dernier cas, on a mis en évidence l'implication de la myosine de type I et de type V (Baines et Korn, 1990; Espreafico et coll., 1992).

### **I.3 Les microfilaments**

Les microfilaments (MFs) sont formés par la polymérisation de l'actine et constituent les filaments de plus petits diamètres du cytosquelette (environ 7 nm de diamètre). Les MFs jouent un rôle cruciale dans un grand nombre de processus cellulaires comme la motilité cellulaire et la cytokinèse, et le réseau formé par MFs contribue à établir la forme cellulaire (Bretscher, 1991; Condeelis, 1993). Il y a une liaison directe entre la

dynamique des microfilaments et celle des microtubules: la perturbation de la polymérisation des microtubules induit une augmentation de la contraction cellulaire par les microfilaments induisant à la fois, la formation de fibres de stress et des adhérences focales (Danowski, 1989).

### **I.3.1 L'actine**

En règle générale, l'actine est la protéine la plus abondante des cellules eucaryotes: 10% de la quantité totale de protéine cellulaire dans les cellules musculaires et de 1 à 5% dans les cellules non-musculaires. On explique cela par le fait que le cytosquelette d'actine n'est pas confiné à un compartiment cellulaire mais s'étend dans toute la cellule. Cependant, la partie de la cellule la plus riche en actine se trouve sous la membrane plasmique où l'actine est associée en réseau, le réseau cortical ou cortex. L'actine est une protéine de taille moyenne de 375 acides aminés ce qui correspond à un poids moléculaire de 43 KDa. Du point de vue structural, l'actine est une protéine globulaire formée de deux lobes séparés par une fente où se trouve un site permettant la liaison à l'ATP/ADP. L'actine possède aussi un site de liaison pour le calcium. L'ATP et le calcium sont les deux ligands qui modulent la cinétique de polymérisation de l'actine. Trois isoformes de l'actine ont été identifiées chez l'homme: l'actine- $\alpha$  spécifique des muscles striés, lisses et cardiaques, l'actine- $\beta$  qu'on retrouve dans les cellules musculaires et non musculaires et l'actine- $\gamma$  qu'on retrouve dans les cellules non musculaires et les cellules musculaires lisses de l'intestin. Les séquences de l'actine- $\beta$  et - $\gamma$  sont très similaires alors que celle de l'actine- $\alpha$  diffère d'une vingtaine de résidus.

### **I.3.2 Les filaments d'actine**

Les microfilaments (MFs) ou filaments d'actine sont des polymères aussi appelés actine-F, formés par l'association en chaîne de molécules d'actine monomérique ou actine-G. La polymérisation des filaments d'actine dépend de la concentration en ion  $Mg^{2+}$  et peut

être reproduite *in vitro* prouvant que cette polymérisation ne dépend ni de protéines auxiliaires ni de l'énergie. La polymérisation de l'actine-G en actine-F s'accompagne de l'hydrolyse d'ATP en ADP. Par esprit de concision, on observe et désigne donc l'actine sous ces quatre états possibles: l'ATP-actine-G, l'ADP-actine-G, l'ATP-actine-F et l'ADP-actine-F. Cependant, l'hydrolyse de l'ATP n'est pas nécessaire à la polymérisation mais influence plutôt la cinétique de polymérisation. En effet, l'actine G associée à l'ADP ou à un homologue non hydrolysable de l'ATP peut tout de même former des filaments. Chaque monomère d'actine s'associe en chapelet exposant la fente et donc le site de liaison à l'ATP du même côté ce qui a comme effet de polariser le filament d'actine. Le filament d'actine apparaît au microscope électronique comme un long filament flexible et torsadé formé de billes. Ce sont des filaments qui s'organisent de façons très diverses suivant leurs fonctions biologiques: en fibres de stress qui confèrent une certaine rigidité à la cellule, en câbles de tension au niveau des adhérences focales, en faisceaux parallèles, spécifiquement représentés au niveau des microvillosités et des filopodes, ou en réseau réticulé au niveau du lamellipode. Les filaments d'actine forment des structures qui vont servir de charpente à la membrane plasmique et de ce fait déterminent la forme de la cellule.

### **I.3.3 La cinétique de polymérisation**

Le cytosquelette d'actine est très dynamique, en perpétuels changements, les filaments d'actine sont soit en voie de polymérisation soit en voie de dépolymérisation et ceci à fin de répondre aux besoins de la cellule. La polymérisation de l'actine commence par l'association de quelques molécules d'actine-G entre elles pour former un oligomère. Chaque bout ou extrémité de l'oligomère se comporte alors comme un noyau de polymérisation, les molécules d'actine-G s'associent et un filament se forme jusqu'au moment où il se crée un équilibre entre l'actine-G et l'actine-F. Cet équilibre correspond à un état stationnaire où chaque molécule d'actine qui dépolymérise est remplacée par une molécule d'actine qui polymérise faisant en sorte que la taille du filament d'actine reste stable. La concentration d'actine-G à cet équilibre est appelée concentration critique. La

polymérisation se fait de la manière suivante: les monomères d'actine-G associés à l'ATP ou ATP-actine-G s'ajoutent aux bouts des filaments. Une fois incorporés au filament, l'ATP s'hydrolyse et donc la plupart des filaments d'actine sont composés d'actine-F associée à de l'ADP ou ADP-actine-F et on ne trouve l'ATP-actine-F seulement au niveau de l'extrémité (+) du filament. Comme on l'a vu précédemment, l'association des molécules d'actine forme un filament polaire qui possède une extrémité positive (+) qui croît 5 à 10 fois plus vite que l'extrémité négative (-). La différence de cinétique de polymérisation entre les deux extrémités a été mise en évidence en recouvrant les filaments d'actine par la méro-myosine lourde (HMM): l'extrémité (+) ou barbelée (barbed end) et l'extrémité (-) ou pointue (pointed end). C'est cette différence de dynamique des deux extrémités qui est à l'origine de l'effet «tapis roulant» bien connu (Pantaloni et coll., 2001). Comme pour les MTs, la polymérisation du filament d'actine peut être utilisée comme une force motrice, indépendante des moteurs moléculaires, pour l'extension du lamellipode mais aussi le déplacement de pathogènes, comme *Listeria*, dans la cellule hôte (Cramer et coll., 1994).

### **I.3.4 Les protéines de liaison à l'actine**

La régulation des protéines de liaison à l'actine et aux filaments d'actine permet de moduler l'équilibre polymérisation/dépolymérisation des filaments d'actine donc de moduler la dynamique du cytosquelette d'actine en rapport direct avec la fonction qu'exerce la cellule. Il y a plus de 50 familles de protéines associées directement à l'actine ou aux filaments d'actine ; par souci de concision, nous allons présenter quelques familles de protéines de liaison à l'actine qu'on trouve dans les cellules de type non-musculaire.

#### **I.3.4.1. Les protéines liaison aux monomères d'actine ou de séquestration**

Si l'on considère la concentration élevée d'actine dans la cellule (de 1 à 5% de la quantité totale de protéines de la cellule) et les concentrations en ions, toute l'actine devrait

être organisée en filaments pourtant ce n'est pas le cas. Cela est dû au fait que dans le cytoplasme des cellules, il y a des protéines qui se lient à l'actine-G et empêchent sa polymérisation. Dans ce groupe de protéines, on observe la thymosine  $\beta$ 4, responsable de la séquestration de 70% de l'actine G d'une plaquette (Sanders et coll., 1992) et la profiline (Yarmola et Bubb, 2006). Ces deux protéines lient l'actine-G avec un rapport 1:1. La thymosine  $\beta$ 4 est une protéine cytosolique alors que la profiline a la propriété de se lier au PIP2 (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) et donc d'être recrutée au niveau de la membrane plasmique. La profiline a un rôle capital dans la dynamique du cytosquelette d'actine puisqu'elle catalyse l'échange de l'ADP en ATP et reconstitue un stock de monomères d'ATP-actine-G prêts à être polymérisés (Mockrin et Korn, 1980; Schluter et coll., 1997).

#### **I.3.4.2 Les protéines de pontage ou «cross-linking»**

Que ce soit au niveau des fibres de stress ou du réseau d'actine cortical, le cytosquelette d'actine est maintenu grâce aux protéines de liaison qui forment des ponts entre les filaments d'actine. Ces protéines entrent donc directement en relation avec les propriétés de stabilisation du cytosquelette d'actine. Ce sont en général, des protéines qui se fixent sur les cotés des filaments d'actine et non pas aux extrémités comme d'autres protéines. De plus les protéines de liaison à l'actine ont différentes propriétés de réticulation en fonction de la distance entre les sites de liaison. On distingue donc:

##### **Les protéines de formation de faisceaux (Bundling)**

Il s'agit de petites protéines avec peu d'espace entre les sites de liaison qui vont associer les filaments d'actine de façon parallèle en faisceaux étroits. Les protéines de la famille de la fascine et l'alpha-actinine stabilisent les filaments d'actine en faisceau (Adams, 2004).

### **Les protéines de réticulation (cross-linking)**

Ces protéines possèdent un large segment entre les deux sites de liaison aux filaments d'actine, permettant de lier deux filaments d'actine distants et dirigés vers des directions différentes et sont à l'origine du réseau bi- et tri-dimensionnel de filaments d'actine. C'est le cas de la filamine qui permet la liaison de deux filaments d'actine avec une torsion de 90°.

- Les protéines de réticulation possèdent soit deux sites de liaison comme la villine, une protéine impliquée dans le clivage et la coiffe des filaments d'actine (Friederich et coll., 1999) et la fimbrine (Bretscher, 1981).

- soit elles sont formées d'un dimère ou chaque sous unité possède son site de liaison à l'actine, comme la spectrine qui intervient au niveau du réseau d'actine cortical en associant les filaments d'actine à la membrane plasmique, ABP 120 un dimère localisé au niveau du réseau d'actine des lamellipode (Cox et coll., 1992; Cox et coll., 1995) et la famille des protéines MARCKS (myristoyled alanine-rich C-kinase substrate) qui jouent un rôle important au niveau du cerveau dans la sécrétion et le transport vésiculaire (Trifaro et coll., 2008).

Les filaments d'actine s'associent donc en réseau, lorsque les protéines de réticulations présentent une grande flexibilité relative à leur longueur, ou en faisceaux lorsqu'ils sont forcés d'adopter un arrangement parallèle étroit induit par la liaison avec des protéines de réticulation de petite taille.

De plus, plusieurs de ces protéines portent des domaines similaires à celui de calmoduline, le calcium jouant alors un rôle modulateur qui favorise ou empêche la fixation de ces protéines aux filaments d'actine. Certaines des protéines de réticulation que l'on vient de voir sont aussi impliquées dans l'ancrage des faisceaux d'actine à la membrane plasmique.



### **I.3.4.3 Les protéines d'ancrage à la membrane plasmique**

En général, il s'agit de l'interaction entre des protéines associées au réseau d'actine cortical, qui sous-pèse la membrane plasmique, et une ou plusieurs protéines transmembranaires ou de liaison à la membrane plasmique. Certaines protéines impliquées dans les interactions actine/membrane ont été très étudiées dans le cas de la membrane plasmique de l'érythrocyte (Conboy, 1993). C'est le cas de la spectrine (Dhermy, 1991), une protéine de réticulation qui associe les filaments d'actine à la membrane plasmique par l'interaction avec d'autres protéines (ankyrine, transporteur d'anion). La protéine band 4.1 (EBP41) (Calinisan et coll., 2006) lie les filaments d'actine et le domaine cytoplasmique de la glycophorine, une glycoprotéine de la membrane plasmique des érythrocytes, et la mutation de son gène est associée à une pathologie des globules rouges, l'elliptocytosis (Morton, 1956). Le groupe de protéines qui contient la filamine que l'on a vu précédemment, associe les filaments d'actine avec des récepteurs (TNFR2, récepteur à l'insuline...) et est impliquée dans la signalisation cellulaire (van der Flier et Sonnenberg, 2001).

Dans la famille des protéines d'ancrage, on trouve aussi le complexe ERM pour ezrine, radixine, moésine, trois protéines partageant une grande homologie dans leur séquence protéique et une redondance dans leur fonction chez les mammifères (Bretscher et coll., 2002; Fievet et coll., 2007). Ces protéines présentent une forme fermée, repliée sur elle-même, puis ouverte par l'association au PIP2 membranaire via leur domaine FERM (F pour 4.1, E pour ezrine, R pour radixine et M pour moesine). Le domaine FERM est aussi présent dans la protéine band 4.1 et la taline qui jouent un rôle d'interface entre la membrane plasmique et le cytosquelette d'actine (Calderwood, 2004). La forme ouverte de ces protéines est stabilisée par la phosphorylation de résidus tyrosines et permet l'ancrage des filaments d'actine à la membrane plasmique (Niggli et Rossy, 2008).

Dans la famille des protéines qui jouent un rôle majeur dans l'interface cytosquelette/membrane, on trouve un sous-groupe de protéines qui sont impliquées dans l'adhésion cellule-cellule et l'adhésion à la matrice extracellulaire. Il s'agit de protéines qui sont soit directement soit indirectement en association avec des protéines transmembranaires comme les intégrines, les cadhérines et les ICAMs (intercellulaire cell adhesion molecules) et associent le cytosquelette d'actine à la membrane plasmique au niveau de sites spécifiquement localisés comme les sites d'attachement de la cellule à la matrice extracellulaire, encore nommés adhérences focales ou contacts focaux. Les principales protéines impliquées dans la formation des contacts focaux sont la vinculine (Ziegler et coll., 2006), la tensine, l' $\alpha$ -actinine, la taline et la paxilline (Critchley, 2000). La paxilline est phosphorylée et activée par plusieurs kinases dont FAK (focal adhesion kinase), en réponse à différents stimuli comme la stimulation par les facteurs de croissance et l'adhésion cellulaire via les intégrines (Turner, 1998; 2000; Panetti, 2002). L' $\alpha$ -actinine associe les filaments d'actine en faisceaux parallèles au niveau des contacts focaux, et plus précisément, organise la structure des filaments d'actine en fibres de stress qui sont à l'origine de la transmission des forces de contraction (Rajfur et coll., 2002).

Les adhésions cellule-cellule ont particulièrement bien été caractérisées dans la cellule épithéliale et sont médiées par une grande variété de protéines de surface comme les cadhérines, claudines/occludines et nectines. Les cadhérines forment une super famille de glycoprotéines transmembranaires qui comprend les cadhérines de type classique ou de type I incluant l'E-, la N- et la VE-cadhérine qui sont toutes nommées en fonction du tissu dans lequel elles ont été identifiées pour la première fois (Gumbiner, 2005). Les cadhérines présentent une grande spécificité de séquence au niveau de leur domaine extracellulaire, ce qui permet l'interaction avec une autre cadhérine, du même sous-type, de la cellule adjacente, par exemple N-cadhérine/N-cadhérine. Le  $\text{Ca}^{2+}$  induit le changement de conformation nécessaire à la dimérisation des domaines extracellulaires (Koch et coll., 1999). Le domaine cytoplasmique des cadhérines est, à l'inverse du domaine

extracellulaire, hautement conservé et se lie aux bêta-caténines (Gumbiner, 2000; Huber et Weis, 2001). La bêta-caténine interagit avec l'alpha-caténine qui est, elle-même, une protéine d'interaction avec les filaments d'actine mais aussi d'interactions avec d'autres protéines de liaison aux filaments d'actine (Rimm et coll., 1995). Donc les cadhérines interagissent indirectement avec le cytosquelette d'actine via l'interaction entre l'alpha et la bêta- caténine ; le complexe cadhérine/caténine formé n'est pas statique mais au contraire très dynamique. Les adhésions cellule-cellule sont régulées à la fois par la phosphorylation du complexe cadhérine/caténine, par endocytose des cadhérines et par la régulation des interactions entre l'alpha-caténine et le cytosquelette d'actine (Nelson, 2008).

Comme on vient de le voir, certaines protéines d'ancrage sont impliquées dans l'adhésion cellulaire avec la matrice extracellulaire et dans les adhésions cellule-cellule. Il faut noter à ce sujet, que dans plusieurs tumeurs dérivant de mélanocytes, on a observé la perte de ces protéines d'ancrage menant à un phénotype cellulaire plus invasif (Cunningham et coll., 1992). Dans le cas de la vinculine, les fibroblastes knockout pour cette protéine sont moins adhérents et plus invasifs (Xu et coll., 1998) alors que la surexpression de la vinculine inhibe la migration cellulaire (Rodriguez Fernandez et coll., 1992). Une protéine très bien caractérisée pour son rôle dans la liaison des filaments d'actine à la membrane plasmique est la cortactine, pour «cortical actin binding protein». Nous allons revenir sur l'implication de la cortactine, du complexe ARP2/3 et des protéines de la famille WASP dans la formation des lamellipodes.

#### **I.3.4.4 Les protéines de clivage**

Cette grande famille comprend la gelsoline (Sun et coll., 1999), la villine qu'on a vu précédemment, la supervilline (Pestonjamas et coll., 1997), la séverine (Andre et coll., 1988) et l'adséverine (scindérine) qui clivent les filaments d'actine puis dans certains cas, coiffent l'extrémité néoformée. D'un point de vue structural, il s'agit de protéines formées de domaines répétitifs qui reconnaissent l'actine-F (Evangelista et coll., 2003). La gelsoline

est une protéine de liaison à l'actine avec de multiples fonctions: la gelsoline régule la longueur des filaments d'actin *in vitro* (Suzuki et coll., 1991), en coupant les filaments d'actine et en coiffant l'extrémité (+) mais peut aussi former un complexe avec l'actine-G jouant un rôle dans la cinétique de polymérisation (Janmey et coll., 1985).

La grande famille des protéines ADF/cofiline comprend l'ADF, la cofiline, l'actophorine, la dépackine et la destrine et sont impliquées dans le désassemblage des filaments d'actine (Maciver, 1998; Bamburg et coll., 1999). Les protéines de la famille ADF/cofiline coupent les filaments d'actine créant de nouvelles extrémités (+) susceptibles de polymériser/dépolymériser (Maciver et coll., 1991), séquestrent les monomères d'actine-G au niveau de l'extrémité (-) (Maciver et coll., 1998) et coiffent l'extrémité (+) du filament d'actine diminuant la polymérisation. ADF/cofiline se fixe à l'actine-F tout le long du filament à un ratio de 1:1, modifiant l'architecture du filament d'actine et facilitant sa déstabilisation mais aussi pourrait dissocier les autres protéines de coiffe comme ARP2/3 qui ont une fonction stabilisante (McGough et Chiu, 1999). L'activité d'ADF/cofiline est contrôlée par phosphorylation via la kinase LIM (LIMK) (Bernard, 2007) et par déphosphorylation via deux phosphatases (Huang et coll., 2006). L'activité des kinases LIM est elle-même modulée via les kinases PAKs, les kinases effectrices de Rac (Edwards et coll., 1999) et via les kinases ROCKs, les kinases effectrices de Rho (Maekawa et coll., 1999).

#### **I.3.4.5 Les protéines de coiffe ou «capping»**

Il s'agit d'un groupe de protéines qui lient les extrémités des filaments d'actine, on retrouve aussi dans ce groupe des protéines de clivage comme la gelsoline. Les protéines de coiffe recouvrent les extrémités du filament d'actine et donc selon le bout (+) ou (-) cela aura différentes influences sur la cinétique de polymérisation. Le coiffage peut avoir des effets opposés: le recouvrement de l'extrémité d'un filament peut empêcher la polymérisation ou stimuler la polymérisation dans le cas des facteurs d'élongation. Les

protéines de la famille de la villine et de la tensine coiffent les extrémités (+) et empêchent la polymérisation cependant la tensine peut être inhibée par le PIP2.

### **Les facteurs d'élongation**

Les formines (EF-1a, ABP50, mDia) sont présentes dans toutes les cellules eucaryotes et sont impliquées dans plusieurs processus cellulaires incluant la cytokinèse, l'endocytose, la formation des filopodes (Kovar, 2006; Goode et Eck, 2007). Les formines sont des facteurs d'élongation qui activent la polymérisation des filaments d'actine en ajoutant des monomères d'actine séquestrés par la profiline. Pendant le processus d'extension du filament d'actine, les formines restent toujours associées à l'extrémité (+) néoformée grâce à leurs propriétés structurales. ABP50 associe aussi les filaments d'actine en faisceau et stimule la polymérisation (Edmonds, 1993). Les formines sont des protéines qui présentent des domaines de nucléation de l'actine en C-terminal et un domaine de régulation par les petites GTPases (GBD), Rac et Cdc42.

Pour conclure, les protéines de liaison à l'actine modulent l'activité d'assemblage et de désassemblage des filaments d'actine et contribuent à la régulation spatio-temporelle du cytosquelette d'actine. Cette régulation est particulièrement importante car lors de la migration cellulaire, il se crée un cycle entre les événements de polymérisation en avant de la cellule au niveau du lamellipode, et les événements de dépolymérisation des filaments d'actine en arrière de la cellule (Pollard et Borisy, 2003). De plus, il faut ajouter un type particulier de protéines de liaison à l'actine qui joue un rôle important dans la modulation du cytosquelette d'actine, il s'agit des moteurs moléculaire ou myosines.

## **II. Les myosines**

Les myosines représentent une grande famille de moteurs moléculaires exprimés dans tous les organismes eucaryotes, répertoriés en 25 classes distinctes chez les vertébrés, et représentés dans les cellules musculaires striées, cellules musculaires lisses et dans les cellules non-musculaires. Les myosines sont composées d'une ou deux chaînes lourdes associées à une ou deux chaînes légères. Les chaînes lourdes portent l'activité ATPasique et le site de liaison aux filaments d'actine alors que les chaînes légères sont impliquées dans la régulation de l'activité et dans la stabilisation des chaînes lourdes. Les monomères de myosines peuvent s'organiser en filaments: les myosines musculaires forment, avec les MFs, des sarcomères très stables alors que les myosines de type non-musculaire forment des filaments bipolaires de façon transitoires (Sellers, 2000). De ce fait, les myosines non-musculaires ont une dynamique qui s'accorde avec les changements que subi la cellule comme la motilité (Jennings et coll., 1981; Yumura et Fukui, 1985) et la cytokinèse (Robinson et Spudich, 2000).

On distingue dans la famille des myosines non-musculaires trois grandes classes: les myosines de type I très éclectiques qui se caractérisent par une seule chaîne lourde en association avec une chaîne légère, les myosines de type V qui sont des dimères de chaînes lourdes associées à des chaînes légères de calmoduline et les myosines de type II. Les myosines de type I, II, V et VI sont impliquées dans les interactions microfilaments-membranes et dans la dynamique du transport vésiculaire intracellulaire (Fath, 2005).

### **II.1 La myosine non-musculaire de classe II**

#### **II.1.1 Fonction**

La myosine non musculaire de type II, associée aux filaments d'actine, est impliquée dans plusieurs processus intracellulaires qui sont dépendants de la contraction

cellulaire non musculaire et du transport intracellulaire, comme la motilité cellulaire, la cytokinèse et la motilité des organelles (Warrick et Spudich, 1987; Robinson et Spudich, 2000) (Matsumura, 2005). La cytokinèse est précisément contrôlée dans le temps et l'espace (Matsumura, 2005): la cytokinèse débute à l'anaphase, c'est-à-dire au moment où les chromosomes de chaque cellule fille sont séparés et c'est un processus caractérisé par la formation d'une structure transitoire au niveau de l'équateur de la cellule, l'anneau contractile, qui forme un sillon de clivage entre les deux cellules filles (Mabuchi et Okuno, 1977; De Lozanne et Spudich, 1987). La suppression de l'expression des myosines non-musculaires II (délétion de gène, ARN antisens, injection d'anticorps) abolit la formation de l'anneau contractile et mène à des cellules polynuclées (Matsumura, 2005).

Il est connu que l'organisation et le positionnement du réticulum endoplasmique (RE) et de l'appareil de Golgi sont dépendants des microtubules et des moteurs moléculaires qui leurs sont associés (Allan et coll., 2002). Cependant, les myosines II associées au cytosquelette d'actine jouent aussi un rôle important dans la dynamique des voies endosomiales associées à l'appareil de Golgi (Fath, 2005): plus précisément, dans le transport rétrograde du Golgi vers le RE (Duran et coll., 2003), dans l'association avec le réseau du trans-Golgi (TGN) (Stow et coll., 1998) et dans l'association aux vésicules de coatomères (Simon et coll., 1998).

Des études ont été faites sur un modèle: *Dictyostelium discoideum*, un protozoaire amiboïde, qui a été très utilisé pour étudier l'implication de la myosine II dans les phénomènes dépend des forces de traction comme l'extension et la rétraction qui caractérise la motilité cellulaire (Bosgraaf et van Haastert, 2006). Un des intérêts de ce modèle est que *Dictyostelium discoideum* ne possède qu'une seule isoforme de myosine non-musculaire de classe II. Les mutants de *Dictyostelium discoideum*, déficients pour la myosine II, sont tout de même capables de migrer mais à très faible vitesse (Wessels et coll., 1988; Jay et coll., 1995). Confirmant ces résultats, le traitement de fibroblastes avec

des inhibiteurs de la myosine II induit la relaxation des forces de traction exercées et le blocage de la migration cellulaire (Pelham et Wang, 1999).

La myosine II aussi est impliquée dans l'organisation spatiale des adhérences cellule-cellule: l'inhibition de la myosine II désorganise les adhérences cellule-cellule (Krendel et coll., 1999; Ivanov et coll., 2005; Shewan et coll., 2005). Nous verrons cela en détail un peu plus bas.

### **II.1.2 Structure**

Du point de vue structural, la myosine non-musculaire de classe II est un hexamère composé d'une paire de chaînes lourdes MHC (~200 KDa) (Warrick et coll., 1986) et de deux paires de chaînes légères MLC, une essentielle (MLC17) et l'autre régulatrice (MLC20) (Chisholm et coll., 1988; Tafuri et coll., 1989).

L'activité des myosines non-musculaires est directement liée à l'état de phosphorylation des chaînes légères MLC20 et des chaînes lourdes MHCs (Adelstein et Conti, 1975; Amano et coll., 1996).

## **II.2 Les chaînes légères de myosine II**

Les chaînes légères de myosines non-musculaires MLCs sont de deux types: essentielles ELC (**MLC17**) et régulatrices RLC (**MLC20**). Les MLC17 sont impliquées dans la stabilisation de la structure tridimensionnelle des chaînes lourdes et les MLC20 sont impliquées dans la régulation de l'activité des chaînes lourdes (Sellers, 1991). La fixation du calcium aux MLC20 induit un changement de conformation des têtes globulaires des MHCs permettant leur liaison aux filaments d'actine. C'est au niveau des MLC20 qu'ont lieu les phosphorylations qui induisent l'interaction des MHCs avec les filaments d'actine. En fait, la liaison des MLC20 aux chaînes lourdes inhibe en continu l'interaction myosine-actine et c'est la phosphorylation des MLC20 qui lève l'inhibition et déclenche la



contraction (Sellers, 1991). En plus, *in vitro*, l'hexamère de myosine II est replié sur lui-même et la phosphorylation des MLC20 participe au dépliement structural de la myosine II. Donc l'interaction de la myosine non-musculaire II avec les filaments d'actine est contrôlée par le calcium et par la phosphorylation des MLC20 et donc par les kinases qui phosphorylent MLC20.

### **II.3 Les chaînes lourdes de myosine II**

Les chaînes lourdes (MHCs) sont composées en N-terminal, d'une tête globulaire qui contient le domaine de liaison aux filaments d'actine et le domaine catalytique ATPasique. Le domaine ATPasique est régulé par les MLC20 et est activé par la liaison aux filaments d'actine. Sa fonction est de transformer l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP en énergie motrice. La région du cou contient deux domaines IQ (calmodulin-binding IQ motifs) qui permettent la liaison aux chaînes légères (MLCs). La tige contient les domaines intermédiaires en hélice alpha permettent la dimérisation de deux chaînes lourdes en formant un surenroulement ( $\alpha$ -helical coiled-coil) (Landsverk et Epstein, 2005) et, en C-terminal, la queue non-hélicale. Les domaines intermédiaires des MHCs permettent aussi l'appariement de plusieurs molécules de myosine II en filaments antiparallèles ou bipolaires, par l'interaction de charges positives et négatives transitoirement exposées au niveau du surenroulement en l'hélice-alpha (McLachlan et Karn, 1982; Ikebe et coll., 2001; Nakasawa et coll., 2005). C'est au niveau de la tige qu'on lie les phosphorylations qui modulent l'activité d'assemblage/désassemblage de la myosine II en filament bipolaire, que nous verrons plus tard.

On distingue deux modes d'action pour les hexamères de myosine II: le premier est la stabilisation locale des filaments d'actine par le fait même de la liaison des MHCs avec le filament d'actine. Le second est le rôle de moteur moléculaire, c'est-à-dire le déplacement des têtes globulaires des MHCs sur le filament d'actine, dans lequel la liaison aux filaments d'actine est préalablement requis. Ces deux modes d'action sont demandeurs

d'énergie. En tant que moteur moléculaire, les myosines et plus spécifiquement les MHCs, convertissent l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP en une force ou énergie motrice qui permet le mouvement et la tension, c'est-à-dire le déplacement des myosines sur les filaments d'actine et vice et versa.

Un inhibiteur spécifique de la myosine II a été identifié par «high-throughput screening assay» (Straight et coll., 2003): il s'agit de la blebbistatine qui inhibe l'activité ATPasique des MHCs et donc l'activité de moteur moléculaire. La blebbistatine est nommée ainsi pour son effet de blocage du «blebbing» cellulaire et aussi de la migration cellulaire dirigée. Le blebbing cellulaire regroupe tous les processus cellulaire où il est observé des renflements de la membrane plasmique comme durant la motilité cellulaire (Fackler et Grosse, 2008) ou durant l'apoptose (Hagmann et coll., 1999). La cytokinèse est aussi bloquée par la blebbistatine puisqu'elle empêche la formation de l'anneau contractile (Straight et coll., 2003). La blebbistatine cible les têtes globulaires des MHCs qui portent l'activité ATPasique, donc cet inhibiteur agit autant sur les formes phosphorylées et non-phosphorylées des MHCs (Wang et coll., 2008a).

### **II.3 Les isoformes des chaînes lourdes de myosine II**

Chez les vertébrés, il existe au moins trois isoformes différentes de myosine non-musculaires de classe II communément nommées MHCIIA, MHCIIIB et MHCIIIC (Katsuragawa et coll., 1989; Kawamoto et Adelstein, 1991; Bresnick, 1999) codées par trois gènes différents (*Myh9*, *Myh10* et *Myh14*) (Simons et coll., 1991; Krendel et Mooseker, 2005).

Les isoformes MHCIIA et MHCIIIB ont bien été étudiées contrairement à l'isoforme C qui a été découverte plus tard (Golomb et coll., 2004). La plupart des travaux, jusqu'à présent, n'impliquent que MHCIIA et MHCIIIB. Après l'identification de MHCIIIC, il a été montré que cette isoforme jouait un rôle dans la cytokinèse comme cela avait été montré

pour les deux autres isoformes (Jana et coll., 2006). MHCIIC serait aussi impliquée, (avec la participation de MHCIIA et de MHCIIB) dans l'adhésion et l'extension des neurites des cellules Neuro-2A (Wylie et Chantler, 2008).

Au niveau protéique, les isoformes MHCIIA et MHCIIB présentent 85% d'homologie au niveau de leur séquence en acide aminés: 87% d'homologie dans la région de la tête et 72% dans la tige (Takahashi et coll., 1992). Il existe une forme unique de l'isoforme MHCIIA alors que quatre formes de MHCIIB issues de l'épissage alternatif ont été décrites dans les neurones de souris (Takahashi et coll., 1992; Itoh et Adelstein, 1995).

L'expression des isoformes MHCIIA et MHCIIB de la myosine II varie selon:

- le stade de développement: l'expression des isoformes de MHCIIB issues de l'épissage alternatif change pendant le développement embryonnaire du cerveau de souris et les concentrations de MHCIIA et de MHCIIB changent pendant le développement embryonnaire des tissus musculaires (muscles squelettique et cardiaque) et non-musculaires (cerveau, thymus et foie) (Murakami et coll., 1993). Les cellules embryonnaires n'expriment pas MHCIIC juste MHCIIA et MHCIIB. Les cardiomyocytes embryonnaires de poulet (Rhee et coll., 1994; Conrad et coll., 1995) et de souris (Murakami et coll., 1993) n'expriment que MHCIIB.

- le type cellulaire (Saez et coll., 1990; Kawamoto et Adelstein, 1991), MHCIIB est fortement exprimée au niveau du cerveau (Cheng et coll., 1992; Murakami et Elzinga, 1992) alors que MHCIIA est enrichie dans les macrophages, les cellules endothéliales de l'aorte, les leucocytes, les plaquettes, les neutrophiles, les cellules épithéliales de l'intestin et les cellules de la rate (Murakami et coll., 1991; Toothaker et coll., 1991) et enfin MHCIIC serait exprimée dans les cellules d'origine hématopoïétique et les neurones (Buxton et coll., 2003).

- Au niveau des lignées cellulaires, les lignées RBL (rat basophil leukemic) et Hela expriment seulement MHCIIA (Choi et coll., 1996; Wei et Adelstein, 2000), les cellules COS-7 (monkey kidney epithelial) expriment seulement MHCIIIB et la lignée NIH 3T3 expriment les deux isoformes.

Les isoformes MHCIIA et MHCIIIB partagent des fonctions communes comme celle de moteur moléculaire et sont impliquées toutes deux dans la formation des fibres de stress (Wei et Adelstein, 2000; Bao et coll., 2005). D'ailleurs, les deux isoformes peuvent être associées au même filament d'actine suggérant une activité commune. Une des fonctions commune aux trois isoformes est leur rôle dans la cytocinèse: par exemple, le fait de diminuer l'expression de MHCIIIB dans les cellules COS-7, qui n'expriment que MHCIIIB, induit une altération de l'anneau contractile et aboutit à des cellules polynucléées. La cytocinèse est restaurée par l'expression d'une des deux autres isoformes MHCIIA ou MHCIIIC, suggérant une redondance dans la fonction des isoformes durant la cytocinèse (Bao et coll., 2005). Dans les cellules neuronales, les trois isoformes MHCIIA et MHCIIIB et MHCIIIC jouent un rôle capital dans la formation des neurites des cellules Neuro-2A (Wylie et Chantler, 2001). L'isoforme MHCIIIB serait impliquée dans l'extension des neurites alors que MHCIIA serait impliquée dans leur rétraction et le maintien de l'adhésion cellulaire des neurites (Chantler et Wylie, 2003; Wylie et Chantler, 2003).

Malgré leur séquences très similaires, les deux isoformes A et B ont des activités catalytiques (Kelley et coll., 1996) et des propriétés d'attachement et de motilité aux filaments d'actine différentes (Kovacs et coll., 2003; Rosenfeld et coll., 2003). Kelley et coll. (1996) ont montré que les mouvements de MHCIIA sur les filaments d'actine sont plus de trois fois plus rapide (3,3 x) que ceux de MHCIIIB et que l'activité enzymatique de MHCIIA est de 2,6 fois supérieure à celle de MHCIIIB.

Plusieurs équipes ont montré que la localisation subcellulaire des deux isoformes MHCIIA et MHCIIIB est différente (Borrione et coll., 1990; Cheng et coll., 1992; Miller et

coll., 1992; Maupin et coll., 1994; Rochlin et coll., 1995)}(Kelley et coll., 1996; Kolega, 1998). Cependant, aucun modèle précis de localisation subcellulaire n'a émergé et il faut noter que la localisation des isoformes est différente en fonction du type cellulaire étudié. Toutefois, la localisation des isoformes MHCIIA et MHCIIB n'étant pas identique dans plusieurs types cellulaires, cela suggère que chaque isoforme a une fonction spécifique. Plus précisément, il a été démontré que MHCIIA est localisée dans le cytoplasme et beaucoup plus associée aux fibres de stress que MHCIIB: MHCIIA est arrangée sous forme de filaments avec une périodicité que certains ont comparé à des sarcomères ce qui rappelle l'organisation de la myosine musculaire. Inversement, MHCIIB serait distribuée au niveau cortical, proche de la membrane plasmique, en périphérie de la cellule et faiblement au niveau cytoplasmique (Kelley et coll., 1996; Kolega, 1998). Les isoformes MHCIIA et MHCIIB sont toutes deux exclues du bord périphérique du lamellipode (Kolega, 1998; Vicente-Manzanares et coll., 2007). MHCIIB est impliquée dans les phénomènes rapides d'extension et de rétraction cellulaire liés à la motilité cellulaire (Kelley et coll., 1996). Comme nous le verrons plus tard, MHCIIB est aussi impliquée dans la stabilité de la polarité cellulaire et la migration cellulaire (Lo et coll., 2004). MHCIIA serait l'isoforme à l'origine des forces de traction nécessaires au mouvement rétrograde des filaments d'actine lors de la rétraction des extensions cellulaires (Cai et coll., 2006). Enfin, comme nous l'avons vu plus haut, les myosines II sont associées à l'appareil de Golgi et l'association des myosines II aux membranes se fait via la tête globulaire. La distribution distinctes des isoformes ainsi que les différences des séquences dans la tête globulaire entre chaque isoforme pourraient être à l'origine de l'association spécifique avec différentes vésicules de l'appareil de Golgi (Fath, 2005).

Les myosines non musculaires de classes II sont impliquées dans divers processus cellulaires (Conti et Adelstein, 2008) mais en général, les études ont porté une plus grande attention à la régulation de l'activité de la myosine II via la phosphorylation des MLC2. Cependant, des études récentes ont été faites pour comprendre spécifiquement le rôle des chaînes lourdes et/ou pour distinguer le rôle de chacune des isoformes.

### **II.3.1 Étude de la fonction des isoformes par délétion des gènes**

A fin de déterminer la contribution de chaque isoforme dans divers processus cellulaires, certaines équipes ont utilisé l'ADN antisens et l'ARN d'interférence puis l'ablation des gènes spécifiques de chaque isoformes.

Togo et coll. ont utilisé l'ADN antisens et mis en évidence que lorsque l'expression de MHCIIIB est diminuée, l'exocytose associée à la réparation de la membrane plasmique est supprimée (Togo et Steinhardt, 2004).

L'équipe du Dr. Adelstein a généré des souris knockout pour chacune des isoformes A et B (Tullio et coll., 1997; Conti et coll., 2004). Les ablations du gène de chacune des isoformes sont létales et les embryons de souris meurent respectivement au quatorzième jour de gestation en ce qui concerne l'isoforme B et au septième jour pour l'isoforme A. Les embryons MHCIIIB (-/-) présentent des malformations lors du développement du cœur et du cerveau alors que les embryons MHCIIA (-/-) présentent des malformations de l'endoderme. Les embryons de souris n'expriment pas l'isoforme C à ce stade de développement, ce qui est un avantage pour étudier spécifiquement la fonction des isoformes A et B.

#### **II.3.1.1 Ablation du gène de MHCIIIB**

L'équipe du Dr. Adelstein a observé que les embryons de souris B-/B- souffraient de graves malformations du cœur alors que peu d'anomalies ont été observées chez les individus B+/B-. Les malformations du cœur semblent être dues au fait que les cardiomyocytes sont incapables de migrer pour former les différents compartiments du cœur (Tullio et coll., 1997). Pour confirmer cette hypothèse, Lo et coll. étudient la migration des fibroblastes isolés des embryons de souris. En vidéo microscopie, comparativement aux fibroblastes de type sauvage (Wt) ou MHCIIIB (+/+), les fibroblastes MHCIIIB (-/-) montrent de rapides changements de forme cellulaire, de larges lamellipodes, une polarité

cellulaire instable et par conséquent, une incapacité à maintenir une direction de migration (Lo et coll., 2004). Les caractéristiques morphologiques et motiles des fibroblastes Wt (polarité cellulaire stable et maintenance d'une direction de migration) sont récupérés lorsque MHCIIIB est ré-exprimée dans les fibroblastes MHCIIIB (-/-). Puis, la migration cellulaire des fibroblastes MHCIIIB (-/-) est stimulée par lésion (Wound-induced migration) et observée en chambre de Boyden (haptotaxie). Les résultats montrent que la migration des fibroblastes MHCIIIB (-/-) est altérée par rapport à celle des fibroblastes Wt, confirmant le rôle de MHCIIIB dans la polarité et la migration cellulaire.

Confortant ces résultats, Vincente-Manzanares et coll. utilisent des vecteurs qui inhibent l'expression (75-95%) de MHCIIA et MHCIIIB dans deux lignées cellulaires CHO.K1 (épithéliales) et Rat2 (fibroblastes embryonnaires) afin d'étudier la ségrégation des isoformes lors de la migration cellulaire. Les cellules déficientes en MHCIIA présentent de très larges lamellipodes et des difficultés à rétracter le train arrière. Ces travaux sont intéressants car le phénotype des cellules déficientes en MHCIIIB est similaire à celui obtenu chez les fibroblastes MHCIIIB (-/-), c'est-à-dire la formation de larges lamellipodes et une incapacité à stabiliser une direction de migration. De plus, les cellules, traitées avec les vecteurs, présentent une rotation anormale du noyau ainsi que du centrosome et de l'appareil de Golgi, confirmant l'instabilité de polarité cellulaire. Ces observations suggèrent que les deux isoformes MHCIIA et MHCIIIB sont impliquées dans la régulation de la polarité cellulaire. Les auteurs montrent aussi que la polarité non définie des cellules déficientes en MHCIIA et MHCIIIB est accompagnée par une inhibition de la maturation des adhérences focales. En effet, c'est la polarité cellulaire qui définit l'axe de migration et donc la direction dans laquelle les adhérences focales vont se former (Svitkina et coll., 1997; Small et Kaverina, 2003).

En plus des malformations du cœur des souris MHCIIIB (-/-), Tullio et coll. ont aussi rapporté des malformations pendant le développement du système nerveux qui pourraient être associées à une réduction du taux de migration cellulaire (Tullio et coll., 1997). Chez la

souris, les cellules de la moelle épinière expriment seulement MHCIIB et dans ces cellules, MHCIIB co-localise avec la N-cadhérine et la  $\beta$ -caténine au niveau des contacts cellule-cellule. L'ablation du gène codant pour MHCIIB, ainsi que la mutation du domaine moteur de MHCIIB (Arg709Cys), aboutissent à des malformations de la moelle épinière au cours du développement qui seraient liées à une perte des adhésions cellule-cellule. L'altération des adhésions cellule-cellule dans le cerveau, causerait l'encéphalite observée chez les souris MHCIIB (-/-) (Ma et coll., 2007). La formation de la moelle épinière peut être rétablie par l'expression de MHCIIB mais aussi par l'expression de MHCIIA qui peut donc restaurer les adhésions cellule-cellule à la place de MHCIIB, suggérant une redondance de la fonction des deux isoformes dans les adhésions cellule-cellule (Bao et coll., 2007).

### **II.3.1.2 Ablation du gène de MHCIIA**

Des travaux ont montrés que les MHCs jouent un rôle important dans la localisation des protéines impliquées dans les jonctions adhérentes et les jonctions serrées (Goodwin et Yap, 2004). Conti et coll. montrent que l'ablation du gène codant pour MHCIIA entraîne une baisse de la localisation de la  $\beta$ -caténine et de l'E-cadhérine au niveau des contacts cellule-cellule ce qui provoque les malformations de l'endoderme des embryons de souris A-/A- (Conti et coll., 2004). Les auteurs ajoutent que le niveau d'expression de ces protéines n'est pas modifié mais que leur distribution intracellulaire devient diffuse dans le cytoplasme, suggérant l'implication de MHCIIA dans le maintien de la localisation des protéines des jonctions adhérentes. Ces résultats sont confirmés par des expériences de siRNA ciblant l'expression de MHCIIA. Les deux isoformes MHCIIA et MHCIIB co-localisent avec l'E-cadhérine (Shewan et coll., 2005). Cependant, en utilisant la technique d'ARN d'interférence, Ivanov et coll. montrent que seule la diminution de l'expression de MHCIIA inhibe les adhésions cellule-cellule des cellules épithéliales et pas celle de MHCIIB (Ivanov et coll., 2005; Ivanov et coll., 2007).



## II.4 Régulation de l'activité de la myosine II

La régulation de l'activité de la myosine II se fait autant au niveau des chaînes légères MLC20 que des chaînes lourdes MHCs (Tan et coll., 1992; Moussavi et coll., 1993).

### II.4.1 La régulation de l'activité de la myosine II par les MLC20

La phosphorylation de MLC20 est essentielle à l'activité de la myosine II et donc à tout les processus cellulaires dépendants de la contraction non-musculaire, comme la cytokinèse, la motilité et l'apoptose (Matsumura et coll., 2001). Comme pour beaucoup de protéines phosphorylées, l'activité des MLC20 dépend d'un équilibre entre l'activité des phosphatases et celle des kinases (cf. **figure 1, page 38**). Les kinases et phosphatases peuvent avoir une activité et/ou une localisation différente et moduler différemment l'activité de la myosine II. De plus certaines kinases sont des effecteurs des petites protéines G qui contrôlent spatialement et temporellement l'activité de ces kinases.

### II.4.2 Les kinases impliquées dans la phosphorylation des MLC20

#### II.4.2.1 La kinase MLCK

La kinase MLCK ( $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin-dependent MLC20 kinase) est une sérine/thréonine kinase dont l'activité est régulée par le complexe calcium/calmoduline et qui phosphoryle MLC20 en **sérine-19** (Pearson et coll., 1984) et **thréonine-18** (Ikebe et coll., 1986). MLCK est localisée et agit en périphérie de la cellule, alors que les kinases de la famille ROCK, que nous allons voir, agissent au centre de la cellule (Totsukawa et coll., 2000; Totsukawa et coll., 2004). De plus, Les kinases ROCKs semblent phosphoryler préférentiellement les MLC20 associées à MHCIIA que les MLC20 associées à MHCIIIB, ce qui n'est pas le cas de MLCK (Sandquist et coll., 2006).

### II.4.2.2 Les kinases ROCKS

Il est connu que les petites protéines G, dont les Rho GTPases, sont des acteurs importants de la régulation du cytosquelette d'actine (Hall, 1998; Burridge et Wennerberg, 2004), et on les nomme communément «interrupteurs biologiques» puisque ces protéines se présentent sous deux formes: une forme active, liée au GTP qui transmet le signal à des effecteurs et une forme inactive liée au GDP. L'échange de GDP pour le GTP est assuré par les facteurs d'échange GEFs et l'hydrolyse de GTP en GDP est catalysée par les GAPs. Nous verrons en détail les différents rôles des Rho GTPases, plus loin.

La GTPase Rho contrôle l'activité du complexe d'actomyosine en induisant la formation des fibres de stress et en contrôlant la formation des contacts focaux. Parmi les effecteurs de Rho, on trouve deux isoformes de sérine/thréonine kinases effectrices, soit ROCK1 et ROCK2 (Rho-associated kinases 1 et 2) (Ishizaki et coll., 1996; Leung et coll., 1996; Matsui et coll., 1996). Au niveau structural, les kinases ROCKs se présentent sous une forme auto-inhibée par le repliement du domaine kinase en N-terminal, sur le domaine C-terminal. Proche de l'extrémité C-terminale, se trouve le domaine de liaison aux RhoGTPases qui permet le dépliement et active les kinases ROCKs. ROCK1 et 2 présentent 65% d'homologie dans leur séquence en acides aminés dont 92% d'homologie dans le domaine kinase (Ishizaki et coll., 1996; Leung et coll., 1996).

L'activation des kinases ROCK1 et 2 par Rho-GTP augmente l'état de phosphorylation des MLC20:

- directement, en phosphorylant les MLC20 (Amano et coll., 1996; Kureishi et coll., 1997; Maekawa et coll., 1999).
- indirectement par phosphorylation/inactivation de la phosphatase MYPT1 des MLC20 (Kimura et coll., 1996; Kawano et coll., 1999; Koyama et coll., 2000).

L'augmentation du niveau de phosphorylation des MLC20 a comme effet d'augmenter l'activité ATPasique des chaînes lourdes de myosine et de ce fait, d'induire la stabilisation des filaments d'actines. La transfection avec un dominant constitutivement actif de ROCK1 tout comme la surexpression de RhoA, induisent en plus de l'augmentation de la phosphorylation de MLC20 ce qui se traduit morphologiquement par une altération de la polarité cellulaire (Gutjahr et coll., 2005). Comme on l'a vu précédemment, les kinases ROCKs semblent phosphoryler préférentiellement les MLC20 associées à MHCIIA, suggérant que l'activité de MHCIIA est soumise au contrôle de Rho (Sandquist et coll., 2006). De plus, les kinases ROCKs sont surtout localisées au centre de la cellule et ceci est concordant avec le fait que MHCIIA serait plus fortement localisée au centre qu'en périphérie de la cellule dans plusieurs types cellulaires.

Mais ROCK1 et 2 ont aussi des fonctions et des distributions subcellulaires différentes (Yoneda et coll., 2005): ROCK2 est plus abondant que ROCK1 dans les fibroblastes, mais, par contre, son activité est plus faible que celle de ROCK1. La suppression de ROCK1 par siRNA, mène à une perte des fibres de stress et des contacts focaux et sa fonction n'est pas récupérée par ROCK2. A l'inverse, la baisse de l'expression de ROCK2 induit une augmentation des filaments d'actine et une inhibition de la phagocytose, non récupérée par ROCK1. Enfin, ROCK1 et ROCK2 portent des domaines PH (pleckstrin homology) avec une affinité pour des lipides différents, suggérant une localisation dans des sous-compartiments cellulaires différents.

Comme la distribution cellulaire des kinases MLCK, ROCK1 et ROCK2 est différente cela suggère une régulation spatiale de la phosphorylation des MLC20 et donc de l'activité de la myosine II. L'inhibition directe de l'activité de la myosine II (blebbistatine) ou indirecte par l'inhibition des kinases MLCK (ML-7) ou des kinases ROCKs (Y-27632) induit une altération du complexe d'actomyosine et des forces de contraction qui lui sont associées, modifie la forme cellulaire et désorganise les adhésions cellule-cellule (Shewan et coll., 2005).

Récemment, il a été rapporté que **l'AMP kinase** dont l'activité répond aux faibles concentrations en ATP, pouvait phosphoryler les MLC20 (Lee et coll., 2007), impliquant de ce fait la myosine II comme un effecteur des voies métaboliques.

#### II.4.2.3 Les autres kinases

D'autres kinases peuvent phosphoryler les MLC20 mais sur des sites différents des sites sérine-19 et thréonine-18. C'est le cas de la protéine kinase C (**PKC**) qui peut phosphoryler les MLC20, in vitro et in vivo (Kamm et Stull, 1989): les sites phosphorylés, in vitro et in vivo, sont la sérine-1 et la sérine-2, ce qui a été démontré en traitant des plaquettes humaines avec des esters de phorbol qui est un activateur des PKC de type conventionnelle et de type nouvelle (Kawamoto et coll., 1989). Le site phosphorylé, seulement in vitro, est la thréonine-9. Ces phosphorylations de MLC20 par PKC auraient pour effet de diminuer l'affinité de la kinase MLCK pour les MLC20, donc de diminuer la phosphorylation des MLC20 et par conséquent, l'activité contractile de la myosine II (Ikebe et Reardon, 1990).

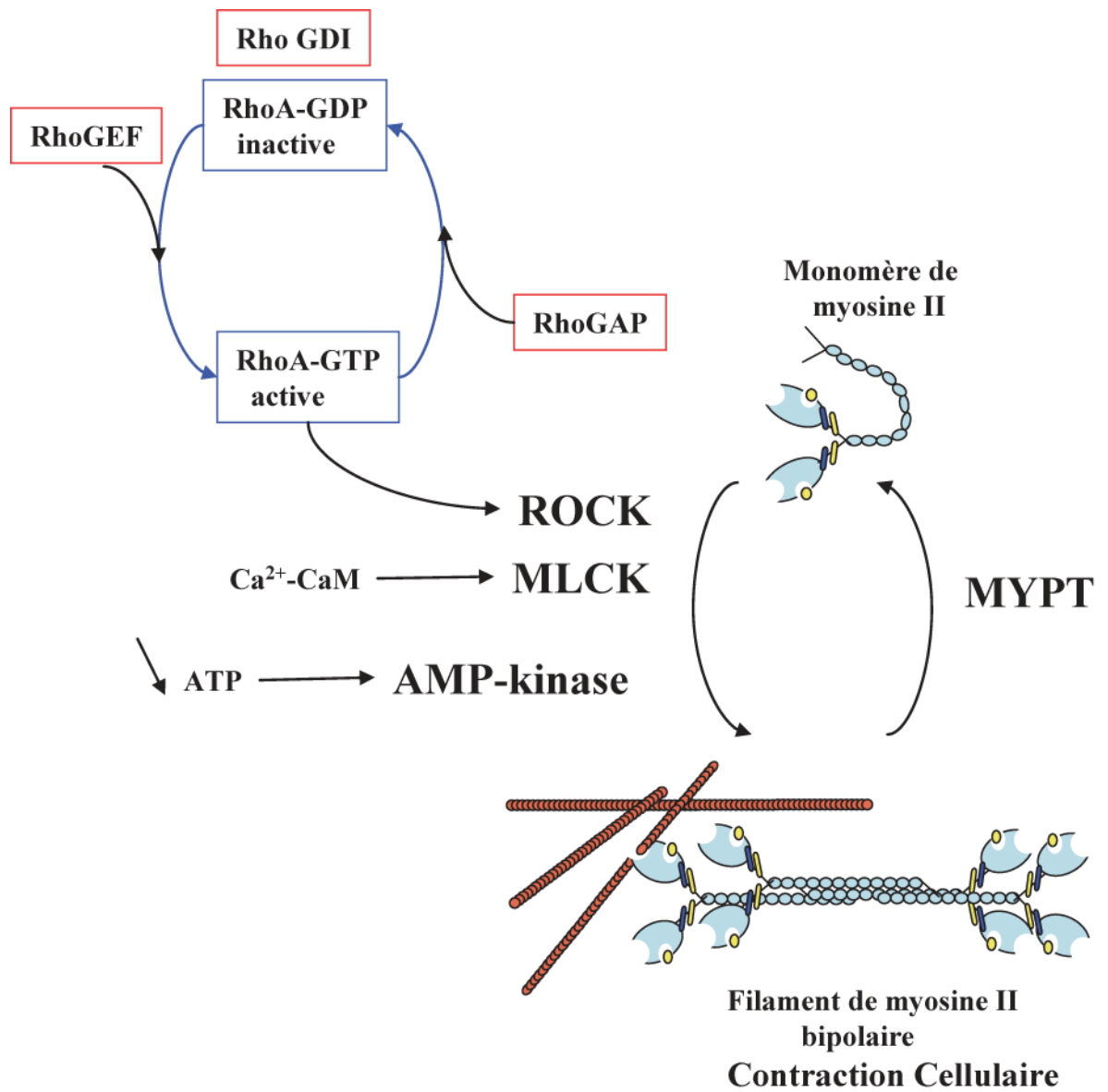
Les kinases de la famille **PAK (p21 activated kinases)** sont des kinases effectrices de Rac et de Cdc42 et pourraient aussi être impliquées dans la phosphorylation des MLC20 mais seulement en sérine-19. C'est le cas de PAK1 (Chew et coll., 1998) et PAK2 (Goeckeler et coll., 2000) mais les effets de cette phosphorylation sont encore mal connus. Il a aussi été démontré que PAK1 phosphoryle et diminue l'activité de la kinase MLCK donc contribuant indirectement à diminuer l'état de phosphorylation des MLC20 (Sanders et coll., 1999).

Il faut noter à ce sujet, que les MLC20 isolées sont de très bons substrats pour un grand nombre de kinases testées mais que ces kinases ne sont pas capables de phosphoryler MLC20 lorsque MLC20 est lié aux MHCs. Comme les MLC20 seules n'ont pas de

fonctions physiologiques connues, ces phosphorylations ne sont pas considérées comme pertinentes.

### **II.4.3 La phosphatase des MLC20**

La phosphatase des MLC20 (**MYPT1**) est la seule phosphatase connue jusqu'à aujourd'hui, pour déphosphoryler les MLC20 (Hartshorne et coll., 1998) et donc diminuer l'interaction de la myosine II avec les filaments d'actine (Lontay et coll., 2005). Il s'agit d'un hétérotrimère composé d'une sous-unité de liaison aux MLC20 (MBS), d'une sous-unité catalytique appelée PP1c $\delta$  et enfin d'une petite sous-unité de fonction inconnue (Alessi et coll., 1992; Shimizu et coll., 1994; Shirazi et coll., 1994). La sous-unité MBS a un rôle très important car elle fait la liaison entre l'unité catalytique PP1c $\delta$  et son substrat, les MLC20. Le site MBS est d'ailleurs le site privilégié pour la phosphorylation/inactivation de la phosphatase MYPT1, par les kinases ROCKs (Ito et coll., 2004).



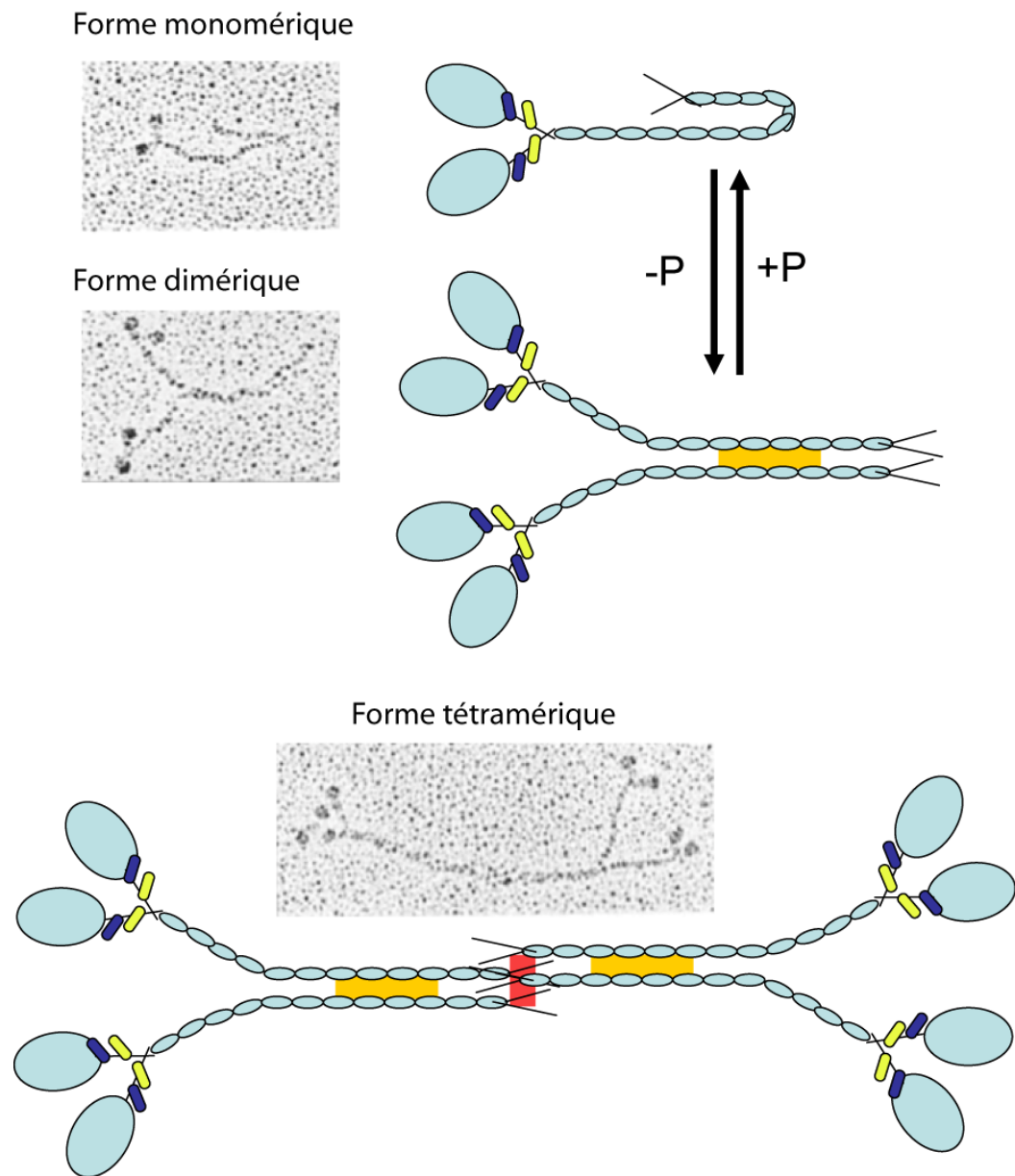
**Figure 1.** La régulation de l'activité de la myosine II non-musculaire par phosphorylation des MLC20. Figure modifiée à partir de (Conti et Adelstein, 2008).

## II.4.5 La régulation des chaînes lourdes MHCs par phosphorylation

L'activité de la myosine non-musculaire II est contrôlée aussi par la phosphorylation des chaînes lourdes MHCs (Moussavi et coll., 1993). On l'a vu précédemment, la phosphorylation des MLC20 induit la fixation de la myosine aux filaments d'actine. La phosphorylation des MHCs jouent un rôle tout aussi important puisque c'est la phosphorylation des MHCs qui contrôle la dynamique d'association entre les molécules de myosine II entre elles (Tan et coll., 1992; Brzeska et Korn, 1996; Redowicz, 2001). La structure secondaire des tiges des MHCs permet la dimérisation des MHCs mais permet aussi l'interaction entre plusieurs hexamères de myosine II antiparallèles formant des filaments de myosine II bipolaires fonctionnels pour générer les forces de traction. L'état de phosphorylation des MHCs pourrait jouer un rôle important dans l'activité d'assemblage/désassemblage de la myosine II. La phosphorylation des MHCs a toujours lieu au niveau de la tige, proche de l'extrémité C-terminal, sur deux à trois acides aminés (sérine ou thréonine) dépendamment des kinases (Tan et coll., 1992). Pasternak et coll. montrent par microscopie électronique que la molécule de myosine II est organisée en au moins trois formes distinctes in vitro (Pasternak et coll., 1989)(cf. **figure 2, page 40**): - Une forme monomérique: le monomère de myosine II est en conformation fermé, la tige est pliée sur elle-même. Cette forme est stabilisée par **la phosphorylation des MHCs**.

- Une forme dimérique: le dimère est formé par l'association de deux monomères de myosine II dépliés et parallèles, par l'interaction de séquences protéiques situées au milieu la tige de chaque monomère. Cette forme est stabilisée par **la déphosphorylation des MHCs**.

- Une forme trétramérique est formée par l'association de deux dimères antiparallèles par l'interaction de séquences au bout de la tige de chaque monomère.



**Figure 2.** La molécule de myosine II est organisée en trois formes distinctes in vitro. Figure modifiée à partir de (Pasternak et coll., 1989).



Dans tous les modèles étudiés (*Drosophila*, *Dictyostelium*, mammifères), l'état de phosphorylation des MHCs régule l'assemblage de la myosine II en filaments bipolaires mais chez l'amibe *Acanthamoeba*, la phosphorylation des MHCs contrôle, en plus, l'activité ATPasique des têtes globulaires des MHCs. Il faut ajouter que dans le cas de *Acanthamoeba*, il n'y a pas de chaînes légères associées, de type MLC20, connues (Brzeska et Korn, 1996).

Chez l'amibe *Dictyostelium discoideum*, qui n'exprime qu'une seule isoforme de myosine II, la phosphorylation des MHCs a lieu au niveau de la tige sur trois résidus thréonines 1823, 1833 et 2029 et régule l'association de la myosine II en filaments bipolaires (Egelhoff et coll., 1993). L'activité ATPasique des MHCs est augmentée de 80% lorsque les MHCs sont déphosphorylées et cet effet est réversible. A l'inverse, la formation de filaments de myosine II, par l'association des tiges de MHCs, est inhibée par la phosphorylation des MHCs (Kuczmarski et Spudich, 1980). Toujours chez *Dictyostelium discoideum*, les filaments bipolaires de myosines II peuvent être composés de 10 à 20 hexamères de myosine II (Yumura et Kitanishi-Yumura, 1990). Les séquences protéiques impliquées dans les interactions de la tige des MHCs ont été identifiées: il s'agit d'un segment interne de la tige des MHCs de 34 KDa, N-LMM-34, qui a été reconnu comme étant le segment permettant la formation des dimères de myosine II (O'Halloran et coll., 1990).

La phosphorylation des MHCs régule aussi la localisation cellulaire de la myosine II chez l'amibe *Dictyostelium* (Egelhoff et coll., 1993): Egelhoff et coll. ont muté les sites de phosphorylation (Thr1823, 1833 et 2029) en alanine pour éliminer la phosphorylation et en aspartate pour, au contraire, mimer un état constamment phosphorylé. La mutation en alanine, induit l'assemblage de la myosine II en filaments bipolaires in vitro et augmente l'activité contractile in vivo, la myosine II est alors localisée sur les filaments d'actine. A l'inverse, la substitution des résidus thréonine en résidus aspartate élimine la formation de

filament bipolaire de myosine II *in vitro* et bloque l'activité contractile *in vivo*, la myosine II est alors localisée de façon diffuse dans le cytoplasme.

Chez les mammifères, la phosphorylation des différentes isoformes de myosine II contrôle aussi l'état d'assemblage et la localisation cellulaire de la myosine II (Straussman et coll., 2001): tout d'abord, Straussman et coll. montrent que l'état de phosphorylation de MHCIIA et MHCIIB est augmenté lorsque les cellules TSU-pr1 sont stimulées avec de l'EGF. L'augmentation de la phosphorylation des deux isoformes est concomitante avec la translocation des isoformes de myosine II du cytoplasme vers le cortex cellulaire. Toutefois, la cinétique de translocation des deux isoformes est différente: en effet, tout de suite après la stimulation avec l'EGF, les deux isoformes sont fortement localisées au niveau du cortex cellulaire, puis après 6 minutes de traitement, seule MHCIIA reste associée au cortex alors que MHCIIB est relocalisée dans le cytoplasme, suggérant que les mécanismes qui contrôlent la phosphorylation et la translocation sont différents en fonction des isoformes.

## **II.4.6 Les kinases impliquées dans la phosphorylation des chaînes lourdes**

### **II.4.6.1 La protéine kinase C (PKC)**

Les kinases potentiellement susceptibles de phosphoryler les MHCs ont d'abord été étudiées chez *Dictyostelium discoideum*. Une seule kinase spécifique des MHCs est connue chez l'amibe: il s'agit de MHCK (myosin heavy chain kinase), une kinase qui a été identifiée, par homologie de séquence, comme faisant partie de la famille des sérine/thréonine PKC (Ravid et Spudich, 1989; 1992). L'activité de cette PKC est stimulée par l'AMP cyclique (Abu-Elneel et coll., 1996) et la stimulation par l'AMPc induit une translocation de PKC du cytosol vers la membrane plasmique (Dembinsky et coll., 1996). La protéine 14-3-3 interagit avec PKC et inhibe sa fonction dans le cytosol (Matto-Yelin et coll., 1997). Les cellules de la lignée JH10 issue de *Dictyostelium*, déficientes en PKC

présentent un taux élevé de molécules de myosine II assemblées et une polarité cellulaire aberrante. A l'inverse, les cellules qui sur-expriment PKC présentent un haut taux de phosphorylation des MHCs, une localisation diffuse de la myosine II et une absence de polarité cellulaire (Abu-Elneel et coll., 1996).

Chez les mammifères, la protéine kinase C (PKC) phosphoryle les chaînes lourdes MHCs au niveau de la tige en C-terminal: PKC phosphoryle MHCIIA en sérine 1917 (Moussavi et coll., 1993) et MHCIIB en thréonine 1917 (Takahashi et coll., 1992; Moussavi et coll., 1993). La phosphorylation des MHCs est d'ailleurs bloquée par l'utilisation de calphostin C, un inhibiteur de PKC. La phosphorylation de MHCIIA et MHCIIB par PKC inhibe l'assemblage des filaments de myosine II (Murakami et coll., 1998). Des études ont démontré que la phosphorylation de MHCIIA avait lieu *in vitro* et *in vivo* dans les cellules RBL et dans les cellules plaquettaires humaines (Adelstein et coll., 1989). Malgré une grande homologie de séquences protéiques, au niveau de la tige, avec la myosine II non-musculaire, les MHCs issues des muscles lisses ne sont pas phosphorylées par PKC, les acides aminés en position 1917 sont des alanines. *In vitro*, le domaine C-terminal non-hélicoïdale des MHCs peut se lier à la phosphatidyl-sérine ancrée dans des liposomes, ce qui pourrait expliquer la proximité entre les MHCs et PKC (Murakami et coll., 1994). La phosphorylation de MHCIIA et MHCIIB liées à la phosphatidyl-sérine par PKC, dans ce modèle *in vitro*, inhibe aussi l'assemblage des filaments de myosine II (Murakami et coll., 1995).

La famille des kinases PKC compte plusieurs isoformes: les PKC conventionnelles (cPKC) de types  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II et  $\gamma$  requièrent la phosphatidyl-sérine (PS), le calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) et le di-acylglycérole (DAG) pour être activées. Les nouvelles PKC (nPKC) de type  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ , et  $\theta$  requièrent seulement PS et DAG pour être activées. Et finalement, les PKC atypiques (aPKC) dont PKC $\lambda$ / $\iota$  et PKC $\zeta$  qui requièrent seulement la PS pour être activées (Hirai et Chida, 2003).

En utilisant le fragment c-terminal de MHCIIB, Murakami et coll. ont montré que plusieurs isoformes de PKC phosphorylent spécifiquement MHCIIB en sérine in vitro dont PKC $\gamma$  et PKC $\zeta$  (Murakami et coll., 1995; Murakami et coll., 1998; Murakami et coll., 2000). PKC $\gamma$  phosphoryle préférentiellement MHCIIB et cette phosphorylation influence la localisation cellulaire et l'activité d'assemblage en filament de MHCIIB (Rosenberg et Ravid, 2006). La kinase PKC $\zeta$  est composée de quatre domaines incluant le domaine PB1 en N-terminal, la séquence PS (pseudosubstrat) impliquée dans l'auto-inhibition de la kinase, le domaine C1 (Cys-rich zinc-finger motif) et le domaine kinase en C-terminal. En règle générale, l'activation de PKC $\zeta$  se fait en deux temps, par liaison aux phospholipides membranaires (PS) puis par autophosphorylation. Une autre étude confirme que PKC $\zeta$  phosphoryle seulement MHCIIB et pas MHCIIA, suggérant une régulation différentielle des deux isoformes (Even-Faitelson et Ravid, 2006).

#### **II.4.6.2 Les kinases de la famille PAK**

La famille des kinases PAKs (p21-activated kinase) est composée de sérine/thréonine kinases et comprend six membres qui sont des effecteurs des petites GTPases Rho, Rac et Cdc42. La kinase PAK 1 est activée par Rac, une GTPase impliquée dans la dynamique de la membrane plasmique qui est activée, entre autres, par les facteurs de croissance comme l'EGF. Even-Faitelson et coll. ont utilisé un dominant négatif (PAK1<sup>DN</sup>) et un mutant constitutivement actif (PAK1<sup>CA</sup>) de PAK 1 pour étudier le rôle de PAK 1 à la fois sur la phosphorylation des chaînes légères MLC20 et des chaînes lourdes MHCs de myosine II (Even-Faitelson et coll., 2005). Dans un premier temps, ils confirment que PAK 1 inhibe la phosphorylation des MLC20 puisque PAK1<sup>DN</sup> augmente et que PAK1<sup>CA</sup> diminue la phosphorylation des MLC20. PAK1<sup>DN</sup> diminue aussi la phosphorylation de MHCIIB et augmente l'assemblage des filaments de myosine.

Une des principales évidences de l'implication de Rac dans la régulation du complexe actomyosine est que dans les cellules neuronales, Rac agit sur la phosphorylation

des MHCs et joue un rôle antagoniste à celui de Rho (van Leeuwen et coll., 1999). Cet article est très intéressant et nous y reviendrons plus tard.

#### **II.4.6.3 La caséine kinase II**

La caséine kinase II (CK II) est une sérine/thréonine kinase (Litchfield et Luscher, 1993) qui phosphoryle les MHCs au niveau d'un seul acide aminé, une sérine située au bout du domaine C-terminal, au niveau de la queue non-hélicoïdale (Murakami et coll., 1984; Kelley et Adelstein, 1990; Murakami et coll., 1990). Il a été montré que la caséine kinase II (CKII) phosphoryle les deux isoformes A et B de la même façon (Murakami et coll., 1990).

Contrairement à PKC, la CK II ne phosphoryle pas les MLC20 mais phosphoryle les MHCs des muscles lisses (Moussavi et coll., 1993). De plus la phosphorylation des MHCs par CK II n'a pas de rôle connu dans l'activité d'assemblage de la myosine II. Par contre, la phosphorylation des MHCs par la CK II inhibe la liaison de la tête des MHCs aux membranes Golgienne in vitro, suggérant le rôle de CKII dans le trafic vésiculaire (Fath, 2005).

#### **II.4.6.4 Autres kinases**

**La CaM kinase II** (Ca<sup>2+</sup>/calmodulin dependent protein kinase) et **la kinase cdc-2** ont aussi été identifiées comme des kinases potentielles des MHCs in vitro (Kelley et Adelstein, 1990; Moussavi et coll., 1993) mais pour l'instant leurs effets sont encore mal connus.

#### **II.4.6.5 La protéine phosphatase A2**

Enfin, la protéine phosphatase A2 (PPA2) est une sérine/thréonine phosphatase, responsable de la déphosphorylation des MHCs et de l'assemblage des filaments de myosine II. Il s'agit de la seule phosphatase connue pour déphosphoryler les MHCs pourtant son rôle a été très peu étudié. Chez *Dictyostelium discoideum*, PPA2 est composée

de trois sous-unités: la sous-unité C catalytique de 37 KDa, la sous-unité A régulatrice de 65 KDa et la sous-unité B de 55 KDa (Murphy et Egelhoff, 1999). Il s'agit d'une phosphatase qui déphosphoryle les résidus sérine et thréonine des MHCs et induit l'association de MHCs en filaments bipolaires in vitro, ce qui est caractérisé par une insolubilité de la myosine II in vivo (Murphy et coll., 1999). Des résultats similaires ont été trouvés chez la drosophile (Mayer-Jaekel et coll., 1994).

#### **II.4.6.6 La phosphorylation des MHCs varie selon les isoformes**

Le contrôle de la phosphorylation des MHCs varie selon les isoformes MHCIIA MHCIIIB. En effet, il y a quelques différences qui sont rapportées: PKC phosphoryle MHCIIA en sérine alors que MHCIIIB est phosphorylée en thréonine (Conti et coll., 1991; Murakami et coll., 1998). On a vu aussi que certaines isoformes de PKC, comme PKC $\zeta$  et PKC $\gamma$  ne phosphorylent que MHCIIIB et pas MHCIIA. Toutes les études s'entendent sur le fait que la phosphorylation de MHCIIIB inhibe son assemblage en filaments mais pas en ce qui concerne MHCIIA, dont l'activité d'assemblage ne serait pas seulement régulée par phosphorylation (Murakami et coll., 1995; Murakami et coll., 1998). En effet, une protéine de liaison au MHCs a été identifiée, la metastatine 1 (Mts1): il existe quelques protéines de la famille des télusine ou KRPs (kinase-related protein), qui présentent en C-terminal une séquence protéique similaire à celle de la kinase MLCK et qui se lient sur les MHCs des myosines des muscles lisses (Niezanski et Sobieszek, 1997; Sobieszek et coll., 1997). Dans les cellules non-musculaires, Mts1 est une petite protéine de 9 KDa qui appartient à la sous-famille des protéines de liaison au Ca<sup>2+</sup>, S100. Il s'agit d'une protéine qui joue un rôle dans les métastases et sa transfection dans des cellules issues de carcinomes mammaires augmente la motilité cellulaire (Ford et coll., 1997). Mts1 interagit avec les MHCs de la myosine II avec une stœchiométrie de trois molécules Mts1 par molécule de MHC. Les molécules de Mts1 se fixent sur environ 16 acides aminés présents au niveau des tiges de MHCs, déstabilisent les filaments de myosine II ce qui a été visualisé par microscopie électronique et inhibe l'activité ATPasique des MHCs en présence de Ca<sup>2+</sup> in vitro. Mts1

empêche à la fois l'assemblage des monomères de myosine II et déstabilise les filaments de myosine II. En 2003, Li et coll. montrent que l'activité de Mts1 varie selon l'isoforme MHCIIA et MHCIIB (Li et coll., 2003). Biochimiquement, Mts1 a beaucoup plus d'affinité pour MHCIIA que pour MHCIIB: cela étant dû aux différences de séquence qui sont présentes dans la tige de chaque isoformes et cela a pour conséquence que Mts1 n'affecte que faiblement la dynamique d'assemblage de MHCIIB. Mts1 se fixe préférentiellement sur MHCIIA, et de plus, au niveau des acides aminés 1909-1924, région qui comprend le site de phosphorylation de PKC (Ser1917) et qui est adjacente au site de phosphorylation de CKII (Ser1944). La liaison de Mts1 à MHCIIA pourrait entrer en compétition directe avec PKC et CKII et empêcher la phosphorylation (Kriajevskaja et coll., 1998; Kriajevskaja et coll., 2000).

D'où le modèle proposé par Murakami et coll. de deux mécanismes distincts de régulation de l'assemblage en filaments, selon les isoformes de MHCs: l'assemblage de MHCIIB en filament serait contrôlée par phosphorylation, via PKC et CKII alors que l'assemblage de MHCIIA serait soumis, en plus, à la liaison de Mts1 (Murakami et coll., 2000).

## **II.5 Le complexe actomyosine**

Le complexe actomyosine est formé par l'association de la myosine II avec les filaments d'actine. Tout comme on l'a vu précédemment, les chaînes légères de myosine II seules n'ont pas de fonction connue et donc leur activité est indissociable de celle des chaînes lourde de myosine. Il en va de même pour la myosine, la myosine seule n'a pas de fonction connue, sa fonction est directement liée à son interaction avec les filaments d'actine. Donc lorsqu'on parle des fonctions de la myosine, il va de soit qu'il s'agit du complexe actomyosine.

Dans les cellules non-musculaires, la myosine de type II s'associe le long des filaments d'actine et forme le complexe actomyosine qui est impliqué dans tout les processus cellulaires qui nécessitent la génération d'une force motrice ou de traction comme la locomotion cellulaire (Lauffenburger et Horwitz, 1996), la cytokinèse mais aussi le support de la membrane plasmique et les changements de morphologie cellulaire que peut subir une cellule en réponse à différents stimuli. Le complexe actomyosine est aussi impliqué dans des structures cellulaires transitoires comme les adhésions focales ou établies comme les jonctions cellulaires (Beningo et coll., 2001). L'endocytose, l'exocytose et le transport intracellulaire des vésicules sont assurés par les microtubules et par le complexe actomyosine. Et enfin le complexe actomyosine est impliqué dans la contraction cellulaire durant la phase tardive de l'apoptose comme nous allons le voir plus tard en détail.

J'espère avoir fait le tour de ce qui est connu concernant l'activité de la myosine II et de vous avoir convaincu de sa complexité !!! On retiendra que l'activité de la myosine II est contrôlée à la fois par la phosphorylation des chaînes légères MLC20 et des chaînes lourdes MHCs. L'activité de la myosine II est donc contrôlée par un équilibre minutieux entre les différentes kinases et phosphatases et les différents facteurs qui peuvent influencer leur activité.



### **III. L'implication du complexe actomyosine dans les changements morphologiques d'une cellule apoptotique**

#### **III.1 La morphologie cellulaire**

Le cytosquelette d'actine est directement responsable de la forme que va prendre la cellule. Bien que la forme de la cellule dépend du type cellulaire (exemple: fibroblastes, neurones, astrocytes, cellules épithéliales...), la forme de la cellule est aussi affectée par l'activité de la cellule. Dans ce projet de thèse, nous nous sommes intéressés à étudier l'implication du complexe actomyosine dans la morphologie cellulaire et pour commencer, par les changements morphologiques d'une cellule apoptotique.

#### **III.2 L'apoptose**

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est un mécanisme cellulaire complexe dont le nom d'origine grecque fait référence à la chute programmée des feuilles à l'automne: «apo» pour éloignement, «ptose» pour chute. C'est un mécanisme qui est particulièrement bien conservé chez les organismes pluricellulaires. L'apoptose est impliquée dans le développement, le maintien de l'homéostasie tissulaire, la mise en place du système nerveux central et la réponse immunitaire. C'est un phénomène physiologique dont le dérèglement conduit à différentes pathologies.

Au cours de l'embryogenèse, les organes sont formés par la prolifération de cellules; des cellules sont alors produites en grande quantité mais ne sont pas toutes conservées en fonction de critères particuliers requis. Par exemple dans le système immunitaire, l'apoptose est responsable de la délétion des cellules T auto-réactives (Bala et Moudgil, 2006). Dans le tissu normal, il existe un équilibre entre prolifération cellulaire et apoptose. La croissance et la survie des cellules nécessitent en permanence un apport en

facteurs de croissance. Les cancers sont en quelque sorte liés à un dérèglement du processus apoptotiques puisqu'il y a un excès de cellules. De plus, les cellules cancéreuses sont souvent caractérisées par des anomalies de l'ADN (mutations) qui devraient déclencher l'apoptose mais, au contraire, ces cellules prolifèrent et souvent, une des premières étapes de «cancérisation» d'une cellule est de s'affranchir des messages d'apoptose en plus de déréguler les voies de prolifération (Hersey et Zhang, 2003). D'autres maladies, notamment les maladies neuro-dégénératives comme la maladie d'Alzheimer, la sclérose latérale amyotrophique, la maladie de Parkinson, mais aussi certaines thyroïdites, les maladies auto-immunes ou encore l'hépatite fulminante pourraient être en rapport avec un dysfonctionnement de l'apoptose (Jellinger, 2001; Jellinger et Stadelmann, 2001). On distingue très nettement l'apoptose de la nécrose comme deux processus morphologiques distincts (Jellinger, 2001). L'apoptose est caractérisée, entre autres, par la mort de cellules isolées qui conservent l'intégrité de leur membrane plasmique. La cellule apoptotique forme des corps apoptotiques qui sont ensuite phagocytés prévenant la réponse inflammatoire.

De nombreux facteurs ou stimuli peuvent induire l'apoptose comme le stress (le manque d'oxygène, par exemple), le traitement par des substances cytotoxiques ou des corticoïdes, l'atteinte de l'ADN (par des radiations, par exemple), la transmission d'un signal de mort (récepteur Fas des lymphocytes cytotoxiques, des natural killer cells, du facteur de nécrose TNF $\alpha$ ) et la privation de facteurs de croissance.

On distingue 2 voies principales d'activation du processus apoptotique:

Brièvement, la première est **la voie intrinsèque** activée par une anomalie (un brr ou une mutation) de l'ADN et qui est reconnu par un complexe de protéines dont p53 fait partie. L'activation de p53 induit l'activation du facteur pro-apoptotique Bax qui forme des canaux dans l'enveloppe lipidique de la mitochondrie et induit le relarguage du cytochrome C qui entre dans la composition de l'apoptosome (Riedl et Salvesen, 2007).

La deuxième voie est **la voie extrinsèque** qui est activée via des récepteurs spécifiques à la surface de la cellule dont les récepteurs de mort, et réagissent à différents stimuli comme la déprivation en facteurs de croissance, le facteur Fas-ligand et le  $TNF\alpha$ .

### **III.3 Les changements morphologiques associés à l'apoptose**

L'apoptose est un processus caractérisé morphologiquement par la condensation et la fragmentation de l'ADN, la perte du volume cellulaire (cell shrinkage), la contraction cellulaire, la dilatation du réticulum endoplasmique, le blebbing puis la fragmentation de la cellule en vésicules scellées ou corps apoptotique (Wyllie et coll., 1980; Mills et coll., 1999)(cf. **figure 3, page 52**). Cette phase de changements morphologiques est appelée phase d'exécution et succède directement à l'activation du programme de mort.

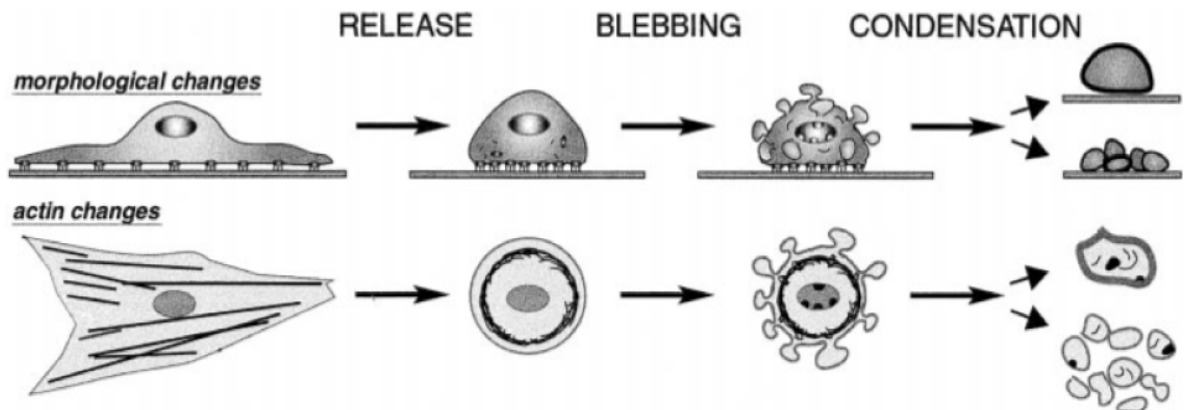
Morphologiquement, la cellule subit des changements majeurs qui peuvent être modélisés en trois étapes décrites par Mills et coll. (Mills et coll., 1999):

La phase précoce est caractérisée par la réorganisation des adhérences focales, la perte de l'attachement à la matrice extracellulaire, la dépolymérisation des microtubules et une diminution des fibres de stress en faveur du réseau d'actine corticale, la cellule adoptant alors une forme ronde. Cette phase est morphologiquement bien caractérisée pour des cellules épithéliales, endothéliales et les fibroblastes qui sont fortement attachés à la matrice extracellulaire et de ce fait beaucoup moins visible pour des cellules circulantes comme les lymphocytes. On observe aussi un type d'apoptose très particulier, qui est induit par la perte de l'attachement à la matrice extracellulaire: l'anoïkis, où la voie de signalisation de la protéine kinase FAK (focal adhesions kinase) est perturbée (Frisch et coll., 1996).

La deuxième phase ou «blebbing phase» est caractérisée par la contraction cellulaire induite par l'interaction des myosines de classes II avec le réseau d'actine corticale qui est à l'origine des projections et des rétractions de la membrane plasmique. On note toutefois

que le blebbing ne se produit pas dans tout les types cellulaires (Janicke et coll., 1998; Zheng et coll., 1998). La phase de contraction cellulaire et de blebbing sont directement liés à l'activité de la myosine II et l'inhibiteur spécifique de la myosine II, la blebbistatine (Kovacs et coll., 2004) détient son nom du fait, il bloque le blebbing pendant l'apoptose (Croft et coll., 2005).

Et finalement, la phase de condensation est caractérisée par la condensation de la cellule en un ou plusieurs corps apoptotiques selon le type cellulaire ce qui permet de faciliter la phagocytose. C'est la phase finale, la cellule s'est contractée au maximum tout en gardant son intégrité membranaire, ce qui n'endommage pas les cellules avoisinantes et ne provoque pas de réponse immunitaire. Au niveau membranaire, la cellule apoptotique émet des signaux, elle expose sur le feuillet externe la phosphatidylsérine, un phospholipide spécifique du feuillet interne qui est alors reconnu par les cellules du système immunitaire et stimule la phagocytose (Kobayashi et coll., 2007).



**Figure 3.** Représentation schématique des changements morphologiques et de la réorganisation du cytosquelette d'actine lors de l'apoptose (Mills et coll., 1999).

### III.3.1 Le facteur de nécrose tumorale-alpha

A l'origine le facteur de nécrose tumorale-alpha (TNF $\alpha$ ) a été décrit pour ses propriétés antitumorales: en 1893, le Dr. Coley observa que chez des patients atteints de cancer qui présentaient en plus des maladies infectieuses graves, les tumeurs régressaient (Coley, 1893). Il a donc essayé de reproduire l'infection avec des extraits bactériens (Coley's toxins) ce qui a vite été abandonné car il y avait trop d'effets secondaires. C'est en 1970, que Carswell et coll (Carswell et coll., 1975) découvrent un facteur protéique dans le sérum de souris infectées par un virus qui induit la nécrose hémorragique des tumeurs. Ce facteur est alors appelé facteur de nécrose tumorale-alpha (TNF $\alpha$ ) et sera utilisé en thérapie anticancéreuse mais avec beaucoup de prudence car il s'avère que le TNF $\alpha$  a une forte toxicité systémique. En effet, le TNF $\alpha$  est une cytokine pro inflammatoire et multifonctionnelle qui est impliquée dans diverses activités biologiques et cible plusieurs types cellulaires. Le TNF $\alpha$  est sécrété par les monocytes, les macrophages, les lymphocytes, les kératinocytes et les fibroblastes en réponse à l'inflammation, l'infection, aux blessures et autres modifications de l'environnement cellulaire. Les lipopolysaccharides (LPS) des bactéries Gram- stimulent la sécrétion de TNF $\alpha$ .

Le TNF $\alpha$  est une cytokine qui favorise l'expression des molécules d'adhésion et induit le recrutement local de leucocytes au cours de maladies inflammatoires mais aussi augmente l'inflammation par l'activation de facteurs de transcription (NF- $\kappa$ B, AP-1) qui ciblent des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire. Le TNF $\alpha$  est impliqué dans différents processus cellulaires tels que l'activation et la migration des lymphocytes et des leucocytes, la prolifération cellulaire, la différenciation cellulaire, la survie cellulaire et l'apoptose (Tracey et Cerami, 1993). Pour résumer, le TNF $\alpha$  peut enclencher l'expression de protéines impliquées dans la réponse inflammatoire aiguë ou chronique (Barnes et Karin, 1997; Karin et coll., 1997) et stimuler la survie et la prolifération cellulaire mais aussi enclencher la voie d'activation des caspases qui mène à l'apoptose (Chang et Yang,

2000). Certaines protéines exprimées suppriment la voie apoptotique, expliquant pourquoi le TNF $\alpha$  est souvent associé à des inhibiteurs de transcription ou de traduction des protéines, pour induire définitivement la voie apoptotique.

### **III.3.2 Les récepteurs au TNF $\alpha$**

Les récepteurs au TNF $\alpha$  sont au nombre de deux. Le premier de type I (B) ou TNFR1 a un poids moléculaire de 55 KDa et le second de type II (A) ou TNFR2 a un poids moléculaire de 75 KDa (Vandenabeele et coll., 1995). Contrairement à ce qui est observé pour d'autres récepteurs aux cytokines comme IL-2, les récepteurs au TNF $\alpha$  peuvent être exprimés différemment en fonction du type cellulaire: les cellules myéloïdes expriment les 2 récepteurs, les cellules épithéliales expriment seulement le TNFR1 et les lymphocytes B et T expriment plus fortement le TNFR2. Au niveau de l'activité de chaque récepteur, le TNFR1 serait impliqué dans la signalisation aux stimuli antiviraux et cytotoxiques alors que le TNFR2 serait plutôt impliqué dans les signaux de prolifération et de différenciation (Thoma et coll., 1990). En fait, la principale différence entre les deux récepteurs se trouve au niveau des protéines de recrutements qui se lient aux récepteurs et induisent des cascades de signalisations différentes: le TNFR2 recrute la protéine TRAF2 (TNF-receptor-associated factor) (Rothe et coll., 1995) activant la voie des MAP kinases alors que le TNFR1 recrute aussi d'autres protéines comme nous allons le voir.

### **III.3.3 L'apoptose induite par le TNF $\alpha$**

C'est la liaison de trois molécules de TNF $\alpha$  qui induit la trimérisation du TNFR1 et le changement de conformation nécessaire à l'exposition des domaines de mort DD (Death Domain) du côté cytoplasmique qui initie la voie extrinsèque de l'apoptose. Dans la cascade de réaction induite par le TNF $\alpha$ , l'interaction entre domaines de mort est cruciale car elle permet le recrutement et l'activation de protéines par le TNFR1. La première protéine recrutée est TRADD (TNF receptor-associated death domain protein) (Hsu et coll.,

1996b; Ashkenazi et Dixit, 1998) qui recrute à son tour la protéine FADD (Fas-associated death domain protein) et forment ensemble, le complexe DISC (death inducing signalling complex) (Tartaglia et Goeddel, 1992; Itoh et Nagata, 1993; Tartaglia et coll., 1993; Hsu et coll., 1996a; Varfolomeev et coll., 2005). Le complexe DISC amorce alors l'activation de la voie des caspases. Comme nous l'avons vu précédemment, le TNF1 recrute aussi TRAF2, induisant la voie IKK et l'activation de NF- $\kappa$ B, et RIP1 (receptor-interacting protein 1) induisant la voie des MAP kinases (JNK, p38) et l'activation de AP-1 (Baud et Karin, 2001).

### III.3.3.1 Le rôle des caspases

Les caspases (Cystein ASPartic acid proteASE) forment une grande famille de protéases spécifiques de l'apoptose et de l'inflammation (Martin et Green, 1995; Alnemri et coll., 1996; Kumar, 1999). Ce sont des protéases à cystéine, dont le site actif est de type QACXG (ou le résidu X peut être R, Q ou G) et qui clivent un grand nombre de protéines au niveau de sites consensus spécifiques. Les caspases sont des protéines cytoplasmiques présentes sous forme de zymogènes ou pro-caspases inactives. On distingue les caspases initiatrices auto-clivées/activées précocement, comme la caspase-8, et les caspases effectrices comme les caspases-3 et -9 clivées/activées par les caspases initiatrices (Shi, 2002; 2004). Les caspases sont aussi différenciées en fonction leur domaine de liaison avec d'autres protéines: les caspases-1,-2,-4,-5,-9,-11 et -12 portent le domaine CARD (CAspase Recruitment Domain) et les caspases-8 et -10, le domaine DED (Death Effector Domain). L'inhibition des caspases par des inhibiteurs de types Z-VAD-fmk, empêche le clivage des protéines cibles mais aussi bloque les changements morphologiques spécifiques de l'apoptose tel que le blebbing. Les calpaïnes sont des protéases qui participent aussi aux clivages des protéines pendant l'apoptose comme l' $\alpha$ -actinine, la spectrine et la taline (Knepper-Nicolai et coll., 1998; Wang et coll., 1998). Les calpaïnes sont des protéases inhibées par des inhibiteurs spécifiques de la famille de la calpastatine mais, durant

l'apoptose, la caspase-3 clive la calpastatine, lève l'inhibition et active de ce fait, les calpaïnes (Kato et coll., 2000).

Suite à l'activation du TNFR1, l'assemblage du complexe DISC (TRADD+FADD) induit le recrutement et l'auto-clivage/activation de la pro-caspase-8 qui la rend fonctionnelle (Kischkel et coll., 1995; Carrington et coll., 2006). Les fibroblastes isolés de souris FADD(-/-) (Yeh et coll., 1998) ou caspase 8(-/-) (Varfolomeev et coll., 1998) sont résistants à l'apoptose induite par le TNF $\alpha$ . La caspase-8 clive/active des effecteurs (Earnshaw et coll., 1999) dont la caspase-3 effectrice qui a un grand nombre de cibles (Thornberry et Lazebnik, 1998; Rath et Aggarwal, 1999): entre autres, des protéines structurales de liaison au cytosquelette d'actine comme la spectrine (Janicke et coll., 1998) et des kinases comme ROCK1 que nous verrons plus tard (Coleman et coll., 2001). Le TNF $\alpha$  est une cytokine multifonctionnelle qui active à la fois la voie apoptotique et la voie proliférative. Il faut donc noter que le facteur de transcription NF- $\kappa$ B, activé dans la voie proliférative, induit l'expression des IAPs qui sont des inhibiteurs de caspases bloquant la voie apoptotique (Deveraux et Reed, 1999). Nous verrons après que la voie apoptotique peut justement être favorisée, *in vitro*, par l'utilisation d'un inhibiteur de la synthèse protéique.

Cependant, il existe d'autres rôles attribués aux caspases qui ne sont pas reliés à l'apoptose: les caspases seraient impliquées dans la survie, la prolifération et la différenciation cellulaire (Lamkanfi et coll., 2007) comme par exemple, dans le contrôle de la prolifération et du cycle cellulaire des lymphocytes T (Los et coll., 2001). Pourquoi des protéases seraient impliquées dans le control du cycle cellulaire? L'hypothèse est que les caspases formeraient un «check point» additionnel du cycle cellulaire qui permettrait seulement aux cellules saines de proliférer. Les caspases pourraient donc agir au niveau du cycle cellulaire et au niveau de l'apoptose. L'hypothèse est que les caspases sont des protéines associées à d'autres protéines d'échafaudage ce qui permet une certaine compartimentation de leur fonction et une accessibilité restreinte à leur substrat, ce qui



expliquerait que durant le cycle cellulaire, il n'y a pas de clivage d'autres protéines impliquées dans l'apoptose. Plusieurs observations sur des souris déficientes en caspase 8 montrent des anomalies au niveau du développement et de la prolifération cellulaire (Varfolomeev et coll., 1998).

Une autre voie spécifique des cellules immunitaires (Natural killer cells et lymphocytes T cytotoxiques) est indépendante de l'activation des caspases et est médiée par la granzyme qui catalyse le clivage de ROCK2, comme nous le verrons plus tard.

L'apoptose peut aussi avoir lieu sans l'intervention des caspases, il s'agit de la mort cellulaire de type III (Bras et coll., 2007). Cette voie ne présente pas les changements morphologiques spécifiques de l'apoptose comme la contraction cellulaire ou le blebbing: Brièvement, un agent cancérigène comme le MNNG (n-méthyl-n-nitro-n-nitrosoguanidine) peut induire des dommages au niveau de l'ADN d'une cellule qui sont alors reconnus par la protéine PARP-1 (poly-ADP-ribose polymérase 1). PARP-1 active les calpaïnes qui sont des protéases à cystéines, non-lysosomiales et dont l'activité, de type papaïne, est dépendante du calcium. La calpaïne active à son tour, le facteur pro apoptotique Bax qui s'insère dans la membrane plasmique externe de la mitochondrie et facilite le relargage du facteur AIF (apoptosis-inducing factor) (Moubarak et coll., 2007). De plus la calpaïne clive la forme membranaire du facteur AIF en une forme soluble (tAIF). Une fois libéré dans le cytosol, le facteur tAIF se transfère au noyau où il induit des bris dans l'ADN et la condensation de la chromatine.

### **III.3.3.2 L'implication des microfilaments dans l'apoptose**

En 1992, Cotter et coll. démontrent que l'utilisation de l'agent fongique, la cytochalasine B, qui cause la dépolymérisation des filaments d'actine bloque la fragmentation cellulaire et la formation de corps apoptotiques sans affecter la fragmentation nucléaire, suggérant que les filaments d'actine sont nécessaires au processus apoptotique (Cotter et coll., 1992; Huot et coll., 1998). D'autres études confirment que la cytochalasine

bloque la contraction cellulaire et le blebbing durant l'apoptose (Mills et coll., 1998; Song et coll., 2002) alors que l'utilisation d'un agent de dépolymérisation des microtubules comme le nocodazol n'a aucun effet (Croft et coll., 2005). En 2002, une des études qui avait démontré le rôle des filaments d'actine, prouvait aussi que l'expression d'une forme constitutivement active de ADF/cofiline, une protéine de clivage des filaments d'actine, bloquait la contraction cellulaire et le blebbing durant l'apoptose (Song et coll., 2002).

Le processus de contraction cellulaire et de blebbing décrit lors de l'apoptose, serait donc associé aux filaments d'actine.

### **III.3.3.3 Le complexe actomyosine dans l'apoptose**

Comme on vient de le voir, l'apoptose est un processus qui nécessite l'intervention des filaments d'actine. Une des caractéristiques majeures de l'apoptose est la contraction cellulaire (shrinkage) qui réduit la taille de la cellule apoptotique suivi du blebbing où on observe des invaginations de la membrane plasmique. Des études ont prouvé que c'est le complexe actomyosine, c'est-à-dire l'association des myosines aux filaments d'actine qui est à l'origine de cette contraction cellulaire lors de l'apoptose (Mills et coll., 1998; Coleman et coll., 2001). Nous allons voir comment l'activité du complexe actomyosine est sollicitée lors de l'apoptose.

### **III.3.3.4 Le rôle de ROCK1 durant l'apoptose**

Lors de l'apoptose, la caspase-3 clive un grand nombre de protéines dont la kinase ROCK1 qui perd son domaine de régulation par Rho et devient constitutivement active (Coleman et coll., 2001) (cf. **figure 4, page 60**). La forme tronquée de ROCK1:

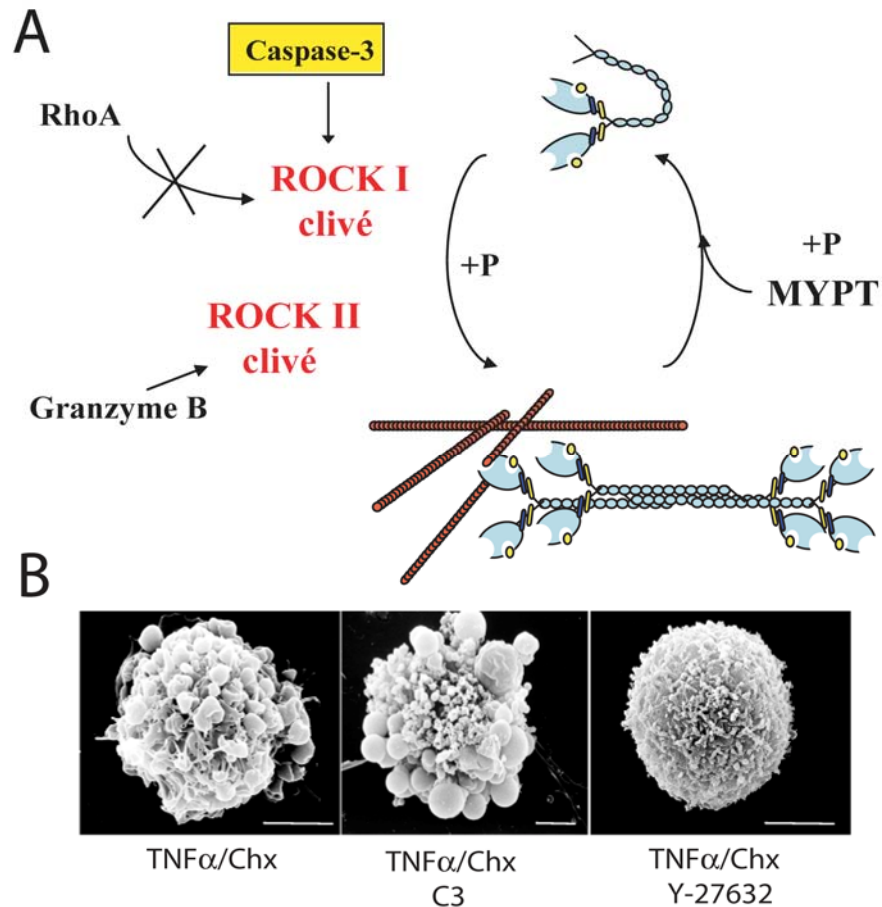
- phosphoryle directement les chaînes légères régulatrices de myosines (MLC20).
- phosphoryle et inhibe la phosphatase MYPT1 responsable de la déphosphorylation des MLC20 (Zhao et Manser, 2005).

Les deux activités de la forme tronquée de ROCK1 ont pour conséquence d'augmenter la phosphorylation des MLC20 de myosines et donc d'augmenter la capacité de la myosine II à fixer les filaments d'actine et à générer la force motrice nécessaire au rétrécissement de la cellule et au blebbing. D'ailleurs, le blebbing cellulaire est stimulé par la transfection d'un dominant constitutivement actif de ROCK1 et par la surexpression de RhoA (Gutjahr et coll., 2005). De plus, l'activation de ROCK1 induit un recrutement du complexe actine-myosine au niveau de la membrane plasmique (Coleman et coll., 2001). Et il faut ajouter à ce sujet que, lors de la phase tardive de l'apoptose, les fibres de stress sont désassemblées au profit du réseau d'actine corticale qui est lié à la membrane plasmique (Matsui et coll., 1998). En effet, des travaux dans notre laboratoire montrent que le désassemblage du cytosquelette cytoplasmique est concomitant à l'assemblage du cytosquelette cortical (Nguyen et coll., 1999; Vitale et Carbajal, 2004).

La kinase PAK2 (p21-activated kinase 2) est aussi clivée par la caspase-3 durant l'apoptose et devient alors constitutivement active. Le fait que PAK2 participe au blebbing est indéniable puisque lorsqu'on bloque son activité, le blebbing ne se produit pas. Par contre, le mécanisme par lequel la forme clivée de PAK2 induit le blebbing reste inconnu et il n'a pas été démontré que PAK2 pouvait phosphoryler MLC20 (Rudel et Bokoch, 1997; Leverrier et Ridley, 2001).

Il faut noter qu'il existe une voie apoptotique qui aboutit aux mêmes changements morphologiques (contraction cellulaire et blebbing) qui passe par le clivage de ROCK2 et qui est indépendante de l'activation des caspases. Il s'agit du cas très précis des cellules cytotoxiques qui peuvent déclencher l'apoptose de cellules infectées, par l'exocytose de granules cytotoxiques et cela sans que l'activation des caspases ait lieu. Il s'agit d'une voie spécifique des cellules NK (natural killer) et des lymphocytes cytotoxiques mais qui peuvent néanmoins, stimuler l'apoptose des cellules cibles par la voie plus conventionnelle des récepteurs de mort cellulaire. Dans cette voie, la granzyme B, une sérine protéase, présente dans les granules cytotoxiques est internalisée par les cellules cibles puis libérée

des endosomes par l'action des perforines des granules cytotoxique (Davis et coll., 2001; Waterhouse et coll., 2005). La granzyme B clive ROCK2 et la kinase se comporte alors comme son homologue ROCK1 et stimule la contraction cellulaire nécessaire au blebbing (Sebbagh et coll., 2005).



**Figure 4. A.** La forme clivée de ROCK1 phosphoryle les MLC20, phosphoryle et désactive la phosphatase MYPT, ce qui augmente le taux de MLC20 phosphorylée et participe à augmenter l'activité du complexe actomyosine. **B.** Le blebbing est induit par TNF $\alpha$ /CHX ; la toxine C3 ne bloque pas le blebbing ; Y27632 bloque le blebbing (Coleman et coll., 2001).

### III.3.3.5 Le rôle des chaînes lourdes de myosines

Toutes les études réalisées sur le blebbing et la phase tardive de l'apoptose montrent clairement l'implication de la phosphorylation des chaînes légères de myosines régulatrices MLC20 (Mills et coll., 1998; Coleman et coll., 2001; Sebbagh et coll., 2001; Croft et coll., 2005), mais peu d'études se sont penchées sur le rôle des chaînes lourdes de myosines MHCs qui sont pourtant responsables de l'attachement et la traction le long des filaments d'actine. C'est pour cela que dans ce travail de doctorat, nous nous sommes intéressés à l'implication des chaînes lourdes de myosines et plus particulièrement aux rôles différentiels des isoformes des chaînes lourdes de myosines durant le processus de contraction cellulaire de la phase tardive de l'apoptose.

Plusieurs études ont montré que l'isoforme MHCIIA était clivée durant l'apoptose: Suarez-Huerta et coll. montrent, pour la première fois, que MHCIIA est clivé dans les cellules endothéliales de l'aorte dont l'apoptose a été induite par le TNF $\alpha$  ou par l'acide okadaïque (Suarez-Huerta et coll., 2000a). Les auteurs identifient, avec un anticorps spécifique de l'isoforme MHCIIA, un fragment de 97 KDa comme étant le résultat du clivage par les protéases durant l'apoptose.

Puis en 2004, la même équipe qui avait montré que la caspase-3 clive l'inhibiteur des calpaïnes, la calpastatine (Kato et coll., 2000), montre que MHCIIA est clivée spécifiquement par la caspase-3 au niveau de deux résidus, D1153 et D1948, en utilisant un anticorps spécifique du site de clivage de la calpastatine par la caspase-3 (Kato et coll., 2005). En 2007, une équipe qui étudiait le rôle d'un agent apoptotique, le VAA\_I (viscum album agglutinin-I), sur une lignée cellulaire issue d'une leucémie, PLB-985, confirme que MHCIIA est bien clivée par un des membres de la famille des caspases car ce clivage est inhibé par Z-VAD-fmk (Lavastre et coll., 2007).

### III.3.3.6 Le rôle de PKC $\zeta$ durant l'apoptose

Comme on l'a vu précédemment, l'activité des chaînes lourdes de myosines est régulée par différentes kinases. Il existe plusieurs kinases susceptibles de phosphoryler les chaînes lourdes des myosines (CKII et PKC) mais PKC $\zeta$  ne phosphoryle que MHCIIIB et pas MHCIIA ce qui pourrait jouer un rôle important dans le contrôle différentiel de l'activité des deux isoformes (Even-Faitelson et Ravid, 2006).

La protéine kinase C atypique, PKC $\zeta$ , est clivée durant l'apoptose. Les caspases-3 et -7 pourraient cliver PKC $\zeta$  au niveau de trois sites de clivage situés entre le domaine régulateur et le domaine catalytique de PKC $\zeta$  (Smith et coll., 2000). Le clivage induit la perte du domaine d'auto-inhibition et génère ainsi une forme tronquée de PKC $\zeta$  dont l'activité est augmentée et qui est, par la suite, dégradée via la voie du protéasome. Cette étude ne donne pas d'explication du rôle de la forme clivée de PKC $\zeta$  dans l'apoptose mais ajoute que cette forme clivée est plus rapidement dégradée que la protéine totale (Smith et coll., 2003).

## **IV. La myosine II non-musculaire et les lamellipodes**

### **IV.1 L'implication des Rho GTPases dans la dynamique membranaire**

La dynamique des extensions membranaires comme les filopodes et les lamellipodes, est contrôlée par les petites GTPases de la famille de Rho. Les petites GTPases de la famille de Rho agissent comme les clefs du contrôle de la réorganisation du cytosquelette d'actine en réponse, entre autres, aux facteurs de croissance. Les GTPases de la famille de Rho sont aussi impliquées dans le trafic membranaire, dans la régulation de la transcription et l'expression des gènes, dans le contrôle du cycle cellulaire, dans l'adhésion, la migration et la polarité cellulaire (Zigmond, 1996; Tapon et Hall, 1997; Hall, 1998; Schwartz et Shattil, 2000). La famille des Rho GTPases est divisée en sous-familles selon leur similarité de séquences protéiques. On y trouve la sous-famille des GTPases classiques qui comprend les groupes: RhoA, RhoB, RhoC ; RhoD et RIF (RhoF) ; Rac1, Rac2, Rac3 et RhoG ; Cdc42, TC10 (RhoQ), TLC (RhoJ) et la sous famille des GTPases atypiques qui comprend les groupes: CHP (RhoV) et WRCH1(RhoU) ; RhoH ; RhoBTB1 et RhoBTB2 et enfin RND1, RND2 et RND3 (RhoE).

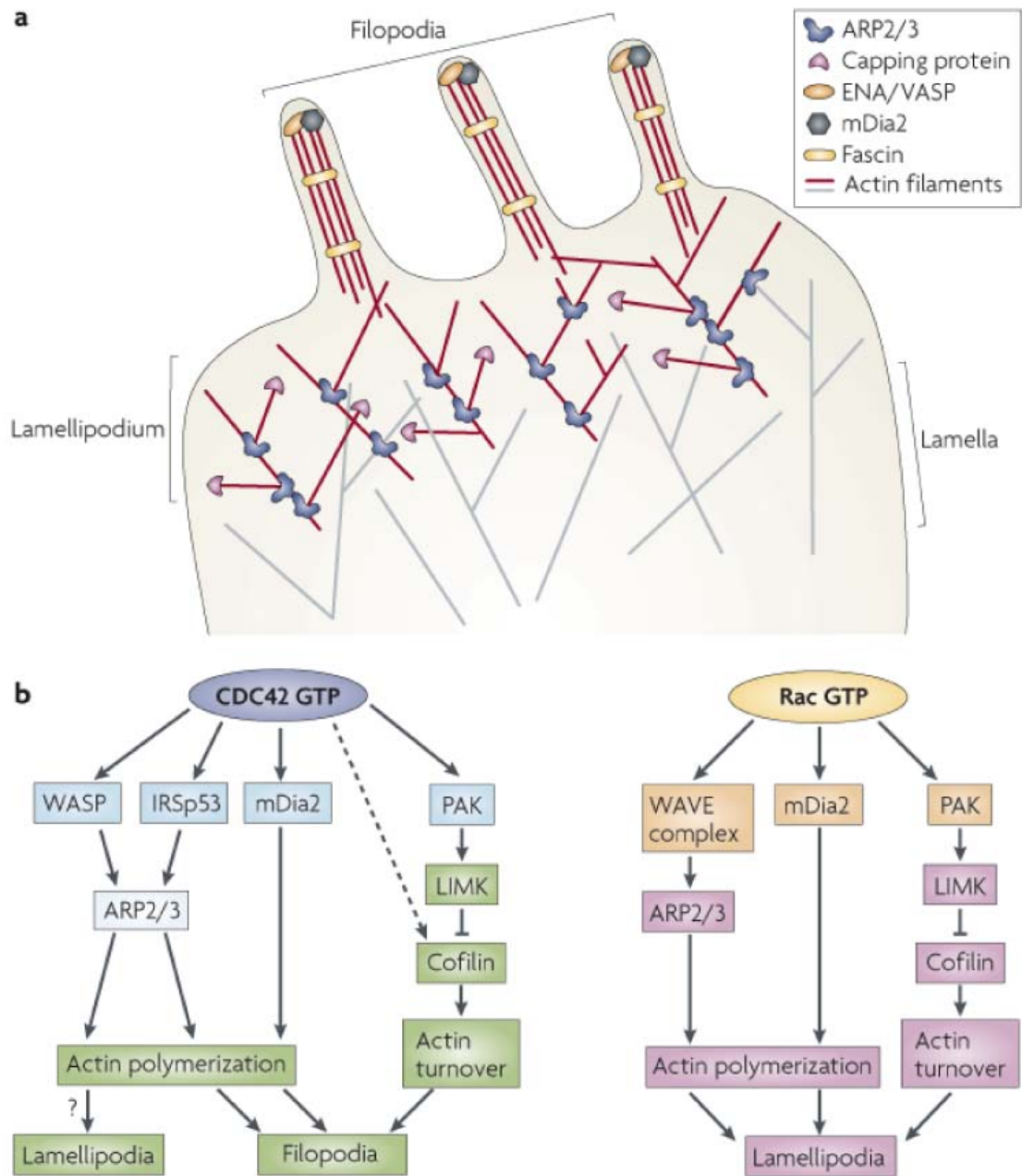
La plupart des Rho GTPases sont associées aux membranes via une ancre lipidique, c'est à dire que les GTPases ont subis des modifications post-traductionnelles comme l'ajout de groupement farnesyle ou geranyle-geranyle et dans quelques cas l'ajout d'acide palmitique et en C-terminal, permettant à la fois l'interaction avec les membranes et aussi la localisation à un compartiment membranaire spécifique comme l'endosome ou le Golgi. Les RhoGDIs (Rho guanine nucleotide dissociation inhibitors) se lient d'ailleurs, au niveau des groupements lipidiques, empêchant la liaison des Rho GTPases avec les membranes.

Certaines Rho GTPases contiennent en plus un domaine poly-basique en C-terminal qui participerait à l'interaction avec les membranes.

L'utilisation de dominants négatifs et de mutants actifs a permis de déterminer la participation de chacune de ces GTPases dans l'organisation du cytosquelette d'actine. Brièvement, l'activation de Rho induit l'activation du complexe d'actomyosine via les kinases ROCK, comme on l'a vu précédemment, augmente de ce fait la contraction cellulaire et mène morphologiquement à l'assemblage des fibres de stress et des adhésions focales (Ridley et Hall, 1992). L'activation de Cdc42 mène à la formation de structures fines en faisceaux de filaments d'actine comme les filopodes et les microspikes (Nobes et Hall, 1995). Le filopode est une structure membranaire étroite et longue qui peut contenir entre 15 et 20 filaments d'actine parallèles, étroitement liés en faisceaux par les protéines de la famille de la fascine. L'organisation du filopode est très différente de celle du lamellipode et les protéines de liaisons aux filaments d'actine impliquées sont bien différentes. Les filaments d'actine sont coiffés à l'extrémité (+) par des facteurs d'élongation de la famille des formines mDia activées par des protéines de la famille WASP, ENA/VASP (Heasman et Ridley, 2008)(cf. **figure 5, page 65**). La dynamique de polymérisation des filaments d'actine détermine l'extension ou la rétraction du filopode (Evangelista et coll., 2003; Wallar et Alberts, 2003).

Finalement, l'activation de Rac contrôle la dynamique de la membrane plasmique via le cytosquelette d'actine et mène à la formation des extensions membranaires appelées lamellipodes (Ridley et coll., 1992). En effet, l'injection de monomères d'actine couplés à des fluorochromes a permis de visualiser la polymérisation de filaments d'actine au niveau des extensions membranaires, suggérant que la polymérisation de filaments d'actine génère la force nécessaire au remodelage de la membrane induit par Rac (Machesky and Hall, 1997) (cf. **figure 5, page 65**). Nous allons voir en détail le rôle de Rac dans la formation du lamellipode.





**Figure 5.** Représentation schématique du rôle des GTPases Rac et Cdc42 dans la formation des extensions membranaires (Heasman et Ridley, 2008).

### IV.1.1 Le rôle de Rac dans la formation du lamellipode

Le lamellipode est une structure membranaire très mince et étalée qui initie la première étape du mouvement cellulaire et détermine sa direction. Au niveau structural, la formation du lamellipode est le résultat de la polymérisation d'un réseau réticulé de filaments d'actine qui poussent la membrane plasmique (Pollard et Borisy, 2003). La GTPase Rac contrôle la réorganisation du cytosquelette d'actine qui soutient la membrane plasmique et induit la formation des lamellipodes. La sous-famille Rac (Ras-related C3 botulinum toxin substrat) est représentée par quatre petites GTPase de 21 KDa qui présentent une grande similarité dans leur séquence: **Rac1** est ubiquitaire, c'est le membre de cette famille qui a été le plus étudié et c'est aussi la seule GTPase de la famille Rac dont le knockout est létal au stade embryonnaire. **Rac2** est exprimé uniquement dans les cellules d'origine hématopoïétique (Reibel et coll., 1991), **Rac3** est exprimé abondamment dans le cerveau (Haataja et coll., 1997) et enfin, **RhoG** est exprimé avec des taux variables dans plusieurs types cellulaires (Ras homology Growth-related). Nous nous sommes donc intéressés plus particulièrement à Rac1.

L'utilisation de dominants négatifs de Rac1 inhibe la formation des lamellipodes dans plusieurs types cellulaires: les macrophages, les cellules T, les cellules épithéliales et les fibroblastes (Ridley et coll., 1992). Dans les fibroblastes embryonnaires et dans les macrophages issus de souris knockout pour Rac1, il n'y a plus de lamellipode et cela s'accompagne de défaillances dans la migration cellulaire (Wells et coll., 2004; Vidali et coll., 2006). Il faut noter que Rac1 ne contrôle pas que la formation des lamellipodes mais aussi la dynamique membranaire lors de processus cellulaires comme la phagocytose (Kitamura et coll., 2003). Même si l'activité de Rac1 est clairement associée à la dynamique de la membrane plasmique, le mécanisme de régulation par lequel Rac1 induit la réorganisation du cytosquelette d'actine cortical reste encore indéfini.

Rac1 réagit à divers stimuli dont les forces de tension exercée sur la membrane plasmique: le stress mécanique subi par des fibroblastes exposés à des forces de tension, peut induire une inhibition de Rac1 et une rétraction des lamellipodes (Katsumi et coll., 2002). Le stress osmotique ou hyper-osmolarité, par contre, active Rac1 et se traduit morphologiquement par une hypertension de la membrane plasmique et une réorganisation du cytosquelette d'actine cortical (Di Ciano et coll., 2002).

Parmi les effecteurs de Rac1, on trouve les membres de la famille de sérine/thréonine kinases PAKs (Sells et Chernoff, 1997) qui ont été rapportés comme étant des activateurs des voies de signalisation des MAP kinases et de p38 MAP kinase (Coso et coll., 1995). Rac1 agit sur PAK via un domaine effecteur. Différentes mutations de ce domaine effecteur diminuent l'activation de PAK et de la voie des MAP kinases mais n'ont aucun effet sur les extensions membranaires, suggérant que Rac1 agit directement sur le contrôle de la dynamique membranaire sans passer par l'activité de PAK (Westwick et coll., 1997).

Rac1 contrôle la dynamique du lamellipode en activant des protéines de liaison à l'actine recrutées au niveau de la membrane plasmique et spécialisées dans la réticulation du réseau d'actine cortical:

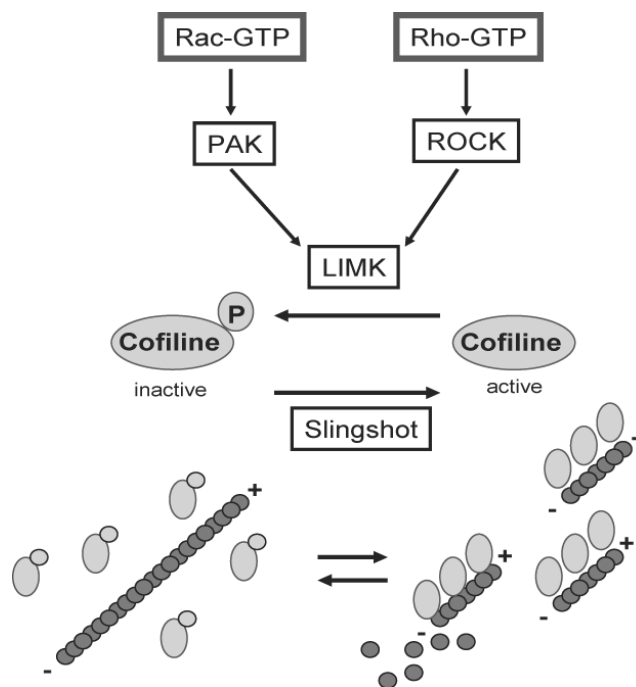
Lors de la formation du lamellipode, Rac1 induit l'activation des protéines de la famille WASP (**W**iskott-**A**ldrich **S**yndrome **P**rotein) qui contribue à activer le complexe ARP2/3, impliqué dans la polymérisation branchée de nouveaux filaments d'actine.

Rac1 induit aussi l'activation des facteurs d'élongation de la famille mDia et augmente la polymérisation (Ridley, 2006).

Rac1 induit l'activation des PI-4 et PI-5 kinases, qui sont impliquées dans la synthèse du PIP2 (Hartwig et coll., 1995). Certaines protéines de liaison à l'actine qui coiffent les extrémités (+) des filaments d'actine et empêchent la polymérisation sont

sensibles au PIP2. Le PIP2 inactive ces protéines de coiffe comme la tensine et de ce fait, contribue à la polymérisation des nouveaux filaments d'actine branchés induit par ARP2/3.

Et finalement, Rac1 contribue à stimuler la polymérisation des filaments d'actine via PAK1, qui active la kinase LIMK1. Les kinases de la famille LIMK, LIMK1 et LIMK2 sont impliquées dans la phosphorylation et l'inactivation du facteur de dépolymérisation cofiline/ADF. Le facteur cofiline/ADF joue un rôle capital dans la dynamique du cytosquelette d'actine: c'est une protéine qui coupe, déstabilise les filaments d'actine et crée des nouvelles extrémités (+). L'inactivation du facteur cofiline/ADF contribue à stabiliser les nouveaux filaments d'actine formés dans le lamellipode. Il faut noter que les kinases ROCKs peuvent aussi activer la kinase LIMK2, donc Rac1 partage le contrôle de la polymérisation des filaments d'actine avec la sous-famille RhoA (Wang et coll., 2007) (cf. **figure 6, page 68**).



**Figure 6.** RhoA et Rac1 régulent la dynamique du cytosquelette d'actine via la cofiline. Figure adaptée de (Huang et coll., 2006).

### IV.1.2 La famille des protéines WASP

La famille des protéines WASP (Derry et coll., 1994) contient 5 membres, WASP, N-WASP (neural-WASP), WAVE1-3 qui sont toutes des protéines activées par la famille des petites GTPases comme Cdc42 et Rac et sont donc de ce fait, associées à la formation des lamellipodes et des filopodes. Au niveau structural, les protéines N-WASP contiennent en C-terminal, un domaine VCA (verproline-homology, cofilin-homology, acidic), une région riche en proline (P-rich) et une région basique en N-terminal. Les protéines WASP présentent une conformation fermée où le domaine VCA acide est masqué par son interaction avec le domaine N-terminal basique. Les protéines de type N-WASP peuvent être activées de deux façons:

N-WASP possède un domaine CRIB (Cdc42/Rac1 interactive binding) qui, lorsqu'il interagit avec Cdc42 ou Rac, permet un changement de conformation de la protéine et dévoile le domaine VCA. Les protéines de la famille Nck peuvent aussi interagir avec la région riche en proline, empêchant la liaison du domaine VCA avec le domaine basique (Kempiak et coll., 2005). L'interaction des protéines N-WASP avec le PIP2 membranaire contribue aussi à ouvrir la protéine. Le domaine VCA libéré, lie et active le complexe ARP2/3 qui en retour, catalyse la nucléation de nouveaux filaments d'actine branchés, comme nous allons le voir plus loin (Higgs et coll., 1999; Marchand et coll., 2001; Millard et coll., 2004).

Les protéines de type WAVE (WAVE1, WAVE2 et WAVE3) n'ont pas de domaine CRIB et l'interaction avec Rac1 est donc indirecte. Cependant, il est évident que WAVE1 est activé par Rac1: WAVE1 est clairement relocalisé à la membrane plasmique suite à l'activation de Rac1 et l'expression d'un dominant-négatif de WAVE1 supprime la formation des lamellipodes induite par Rac1 (Miki et coll., 1998). De plus, contrairement à N-WASP, qui présente une structure repliée auto-inhibée, la protéine WAVE1 est constitutivement active et ce sont les protéines qui lui sont associées qui régulent son activité

(Ibarra et coll., 2005). WAVE1 interagit et forme un complexe avec trois protéines identifiées par spectrométrie de masse, et dans ce complexe WAVE1 est inactif (Eden et coll., 2002). L'interaction avec Rac1 désorganise le complexe et WAVE1 peut alors interagir avec ARP2/3. Le complexe Arp2/3 est activé, entre autres, par WAVE1 et WAVE2 (Higgs et Pollard, 2001; Marchand et coll., 2001; Suetsugu et coll., 2003).

### **IV.1.3 Le complexe ARP2/3**

Le complexe Arp2/3 est composé de 7 sous-unités et joue un rôle majeur dans la régulation du cytosquelette d'actine. Au sein de ce complexe, deux sous-unités ARP2 et ARP3 (**actin-related protein**) présentent une structure tridimensionnelle qui mime un monomère d'actine et sert de site de nucléation (Machesky et coll., 1994; Mullins et coll., 1998). Le complexe Arp2/3 se lie latéralement à un filament d'actine préexistant et initie la polymérisation d'un nouveau filament d'actine qui forme un angle de 70° avec le brin préexistant. On observe donc une réticulation des filaments d'actine, c'est-à-dire la formation d'un réseau plus ou moins dense de filaments d'actine qui polymérisent dans plusieurs directions et ne sont pas parallèles (ce qui complètement différent de l'organisation du filopode). L'activation du complexe ARP2/3 répond à divers stimuli incluant les facteurs de croissance, la famille des kinases Src et l'activation des Rho GTPases, et est médiée par des facteurs de nucléation (NPFs) comme la cortactine et la famille des protéines WASP (Higgs et coll., 1999; Weaver et coll., 2001; Millard et coll., 2004). La cortactine active le complexe Arp2/3 via le site DDW présent dans son domaine acide N-terminal (Weed et coll., 2000).

### **IV.1.4 La cortactine**

Comme on l'a vu précédemment la dynamique d'assemblage du cytosquelette d'actine joue un rôle important dans plusieurs processus cellulaire. La cortactine est une protéine de liaison aux filaments d'actine et contient plusieurs domaines dont les propriétés

lui confèrent un rôle clef dans la signalisation cellulaire et la modulation du cytosquelette d'actine comme la formation du réseau cortical, l'endocytose, la formation des jonctions serrées et adhérentes et la migration cellulaire. Ce rôle clef lui a d'ailleurs valu le surnom d'éminence grise du cytosquelette (Weed et Parsons, 2001; Daly, 2004).

#### **IV.1.4.1 Structure et fonction de la cortactine**

En N-terminal, la cortactine possède un domaine acide (NTA) qui inclut le site DDW responsable de la liaison et de l'activation du complexe ARP2/3 (Urano et coll., 2001; Weaver et coll., 2001). Après le domaine N-terminal, suit une région qui contient des motifs répétitifs et qui lie les filaments d'actine ce qui est à l'origine de la co-localisation de la cortactine avec le réseau d'actine cortical (Weed et coll., 2000). La structure de la cortactine contient ensuite, une hélice alpha qui précède un domaine riche en proline (P-rich) considéré comme le domaine de régulation de la cortactine. Les sites de phosphorylation de la cortactine sont tous situés dans cette région riche en proline. En C-terminal, le domaine SH3 de la cortactine permet la liaison avec un très grand nombre de partenaires et de ce fait, implique la cortactine dans divers processus cellulaires (Daly, 2004)(cf. **figure 7, page 73**):

La cortactine interagit avec les protéines de la famille WASP donc active directement et indirectement ARP2/3 (Weed et coll., 2000).

La cortactine interagit indirectement avec les membranes et lie, entre autres, ZO-1, une protéine impliquée dans les jonctions intercellulaires (Katsube et coll., 1998; Daly, 2004) et lie le domaine PRD de la dynamine, une protéine associée à la membrane plasmique, à la membrane de l'appareil de Golgi et aux vésicules de clathrine (McNiven et coll., 2000). Mais la cortactine peut aussi interagir directement avec les membranes en liant le PIP2 par un motif en N-terminal. La cortactine interagit avec Shank3 au niveau des synapses, avec la protéine de densité post-synaptique (PSD) SAP1 et s'associe avec l' $\delta$ -caténine (Martinez et coll., 2003) dans les cellules neuronales.

En ce qui concerne les protéines d'adhésion cellulaire, la cortactine forme un complexe avec la cadhérine-E de type classique, une protéine clef de l'adhésion cellule-cellule et l'inhibition de la cortactine réduit considérablement les contacts entre cadhérines, limite la zone de jonction cellulaire et finalement perturbe la morphologie cellulaire des cellules épithéliales polarisées (Helwani et coll., 2004). La cortactine est aussi impliquée dans la formation du complexe qui associe la sélectine-E (CD62E) avec ICAM-1 (inter-cellular adhesion molecule 1), deux protéines d'adhésion des cellules endothéliales (Tilghman et Hoover, 2002). Au niveau du lamellipode, la cortactine coopère avec la caténine p120, une protéine de la famille Armadillo qui se fixe aux cadhérines de type classique, (Boguslavsky et coll., 2007). Dans les lymphocytes T et les cellules NK (natural killer), la cortactine s'associe avec CD2AP, un partenaire de la protéine d'adhésion CD2 (Lynch et coll., 2003).

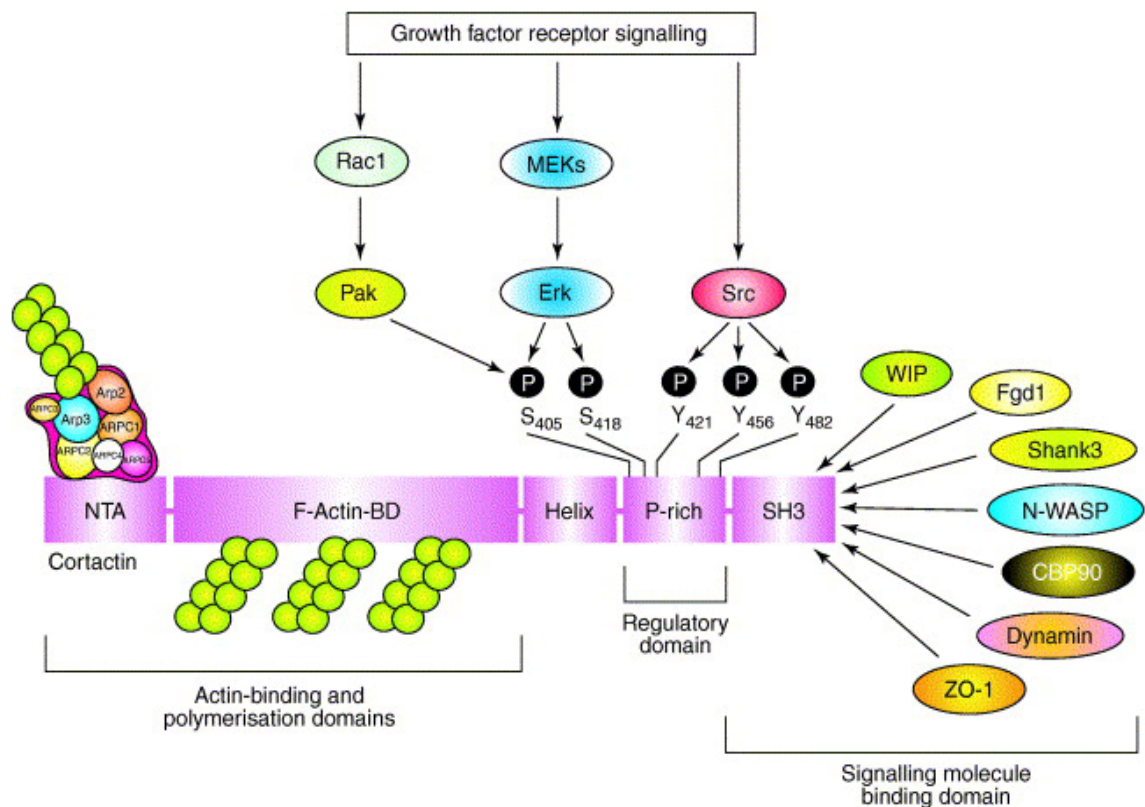
La cortactine et plus précisément sa forme phosphorylée, est très fortement associée avec les centrosomes et semble impliquée dans le processus de séparation des centrosomes durant la mitose, un processus qui est dépendant de la polymérisation des filaments d'actine (Wang et coll., 2008b).

Au niveau du complexe actomyosine, la cortactine se lie aux filaments d'actine. Il faut noter à ce sujet, que certains travaux ont mis en évidence que la cortactine entre en compétition avec la myosine II pour le site de liaison aux filaments d'actine (Ohoka et Takai, 1998) et aussi avec la phalloïdine dont on se sert en immunofluorescence. La cortactine co-immunoprécipite et forme un complexe avec MLCK, la kinase spécifique des chaînes légères MLC20 de myosine II (Garcia et coll., 1999). Il a été montré que lors de la spermatogénèse, la cortactine interagit avec la myosine de classe VI, un type de myosine impliquée surtout dans la dynamique de la membrane plasmique (Rogat et Miller, 2002).

Finalement, la cortactine interagit avec un grand nombre de kinases qui contrôlent son activité.



Dans notre laboratoire, nous avons montré que la cortactine est localisée à la membrane plasmique et que cette localisation dépend de la confluence (densité) des cellules en culture: lorsque les cellules sont isolées les unes des autres, la cortactine est surtout localisée au niveau des lamellipodes et lorsque les cellules forment des amas cellulaires, la cortactine est surtout localisée au niveau des jonctions cellule-cellule (Zheng et coll., 2006)(Cf Annexe 1). D'autres travaux montrent que la cortactine est localisée au niveau des lamellipodes mais aussi des endosomes et podosomes (Daly, 2004).



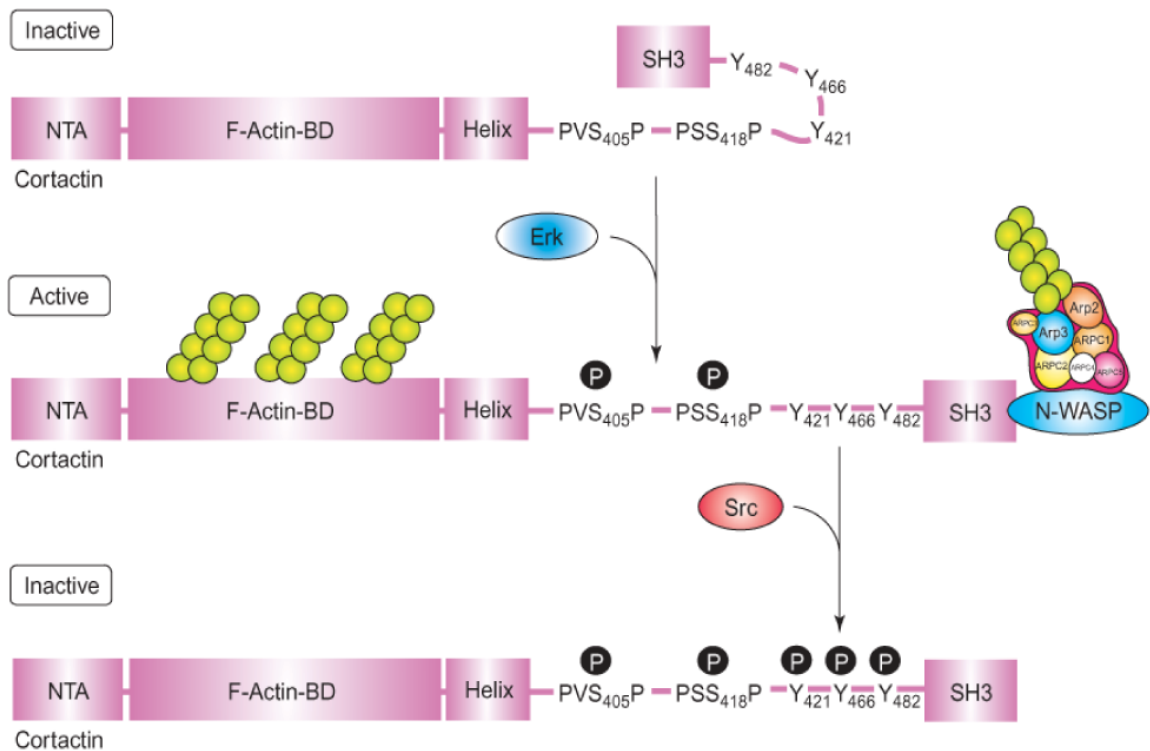
**Figure 7.** Représentation schématique des domaines de la cortactine et de ses partenaires (Selbach et Backert, 2005).

#### IV.1.4.2 La régulation de l'activité de la cortactine

La phosphorylation de la cortactine semble jouer un rôle important dans la régulation de son activité et de sa localisation cellulaire. Initialement, la cortactine a été identifiée comme un substrat de la kinase Src (Kanner et coll., 1990; Wu et coll., 1991). La cortactine peut être phosphorylée en tyrosine 421, 456 et 482 et en sérine 405 et 418. Tous ces résidus se situent dans la région riche en proline (P-rich).

Les kinases connues pour phosphoryler la cortactine en tyrosine sont les kinases de la famille Src (Gallet et coll., 1999): la kinase FER (Kim et Wong, 1998) et la kinase c-Met (Crostella et coll., 2001), alors que les kinases qui phosphorylent en sérine sont la kinase ERK (Campbell et coll., 1999) et PAK1 (Weed et coll., 1998 ; Vidal et coll., 2002). Il a été rapporté que la phosphorylation de la cortactine en tyrosine 421 induite par l'activation de Src, était augmentée dans les cellules pancréatiques stimulées parallèlement à la relocalisation de la cortactine au niveau des extensions membranaires (Singh et McNiven, 2008).

Cependant, il faut noter que pour l'instant, on ne connaît pas l'implication exacte des phosphorylations sur la fonction de la cortactine. Martinez-Quiles et coll. proposent que le domaine SH3 de la cortactine soit masqué dans la forme native de la protéine et démasqué par la phosphorylation, suggérant une forme fermée où le domaine SH3 interagirait avec des sous-domaines SH3 (PxxP) de la région P-rich. Comme les résidus tyrosines et sérines sont également dans la région P-rich, leurs phosphorylations empêcheraient l'interaction des domaines SH3 et induiraient une forme ouverte ou dépliée (Martinez-Quiles et coll., 2004). Plus spécifiquement, la phosphorylation en sérine augmente la liaison et l'activation de N-WASP par la cortactine alors que la phosphorylation en tyrosine réduit l'activation de N-WASP d'où le modèle proposé où Src et Erk joueraient un rôle d'interrupteur de la cortactine (cf. **figure 8, page 75**).



**Figure 8.** Modèle proposé de la régulation de la cortactine par phosphorylation en sérine et tyrosine (Selbach et Backert, 2005).

Parallèlement, des travaux ont montré que la phosphorylation de la cortactine en tyrosine ou sérine n'est pas nécessaire à la translocation de la cortactine à la membrane plasmique (Illes et coll., 2006) et que la phosphorylation de la cortactine en tyrosine 421 se produirait à la condition que la cortactine soit déjà localisée à la membrane plasmique (Head et coll., 2003). Ceci est confirmé par le fait que certains pathogènes recrutent la cortactine sous sa forme déphosphorylée afin de détourner sa fonction à leur avantage. La fonction de la cortactine est spécifiquement ciblée et déviée par certaines bactéries

(*Escherichia coli*, *shigella*, *helicobacter*) et virus (*vaccinia virus* de la famille des poxvirus) afin d'utiliser la polymérisation des filaments d'actine comme force mécanique pour progresser à l'intérieur de la cellule hôte (Plastino et Sykes, 2005; Selbach et Backert, 2005).

#### **IV.1.4.3 La fonction de la cortactine dans la formation du lamellipode**

Comme on l'a vu précédemment, la cortactine et WAVE1 en réponse à l'activation de Rac1, sont donc deux acteurs principaux de l'activation du complexe Arp2/3. L'ensemble des interactions entre la cortactine, Arp2/3 et les filaments d'actine se situe au niveau du réseau cortical et jouent un rôle principal dans l'extension du front cellulaire qui caractérise le lamellipode (Weed et coll., 2000; Bryce et coll., 2005). La cortactine stabilise le complexe ARP2/3 au niveau du filament d'actine empêchant le détachement du complexe et augmente l'activité des protéines WASP (Urano et coll., 2001). En fixant préférentiellement l'extrémité (+) des filaments d'actine (Bryce et coll., 2005), la cortactine permet le recrutement de ARP2/3 et des protéines WASP spécifiquement au bord de la membrane plasmique et c'est la formation de nouveau filaments d'actine branchés qui génère la force mécanique nécessaire pour pousser la membrane en avant.

En 2005, Bryce et coll. utilisent des siRNA pour diminuer l'expression de la cortactine, ce qui induit des lamellipodes très instables et rapidement rétractés, en plus de diminuer la motilité cellulaire et le phénotype invasif de la lignée cellulaire HT1080 issue de fibrosarcome (Bryce et coll., 2005). La cortactine serait donc impliquée dans l'extension et la persistance des lamellipodes initiant la formation de nouvelles adhésions au niveau du lamellipode en s'associant avec la N-cadhérine et la paxilline (El Sayegh et coll., 2004; Bryce et coll., 2005). Le turnover de la cortactine, qui est dégradée par la calpaïne, serait d'ailleurs, un facteur déterminant dans la maturation des adhésions cellulaires (Perrin et coll., 2006).

Au contraire, deux autres études montrent que la diminution d'expression de la cortactine induit une augmentation du nombre de lamellipodes mais empêche la formation d'un unique lamellipode dominant suggérant que la cortactine est impliqué dans la rétraction du lamellipode et dans l'établissement de la polarité cellulaire (Unsworth et coll., 2004 ; Kempiak et coll., 2005). Donc, même si l'activité de la cortactine est définitivement associée au lamellipode, sa fonction reste encore controversée entre l'activité d'extension ou de rétraction du lamellipode (Cosen-Binker et Kapus, 2006). En fin, Lai et coll. montrent par une technique de FRAP, que la cinétique de redistribution du marquage de l'actine et du complexe ARP2/3 est plus rapide de celle de la cortactine ce qui suggère que la cortactine serait impliquée dans la stabilisation du complexe ARP2/3 après que le complexe soit adressé au niveau du lamellipode (Lai et coll., 2008).

Le recrutement de la cortactine vers la membrane plasmique est dépendant de la GTPase Rac1 (Kim et Wong, 1998; Weed et coll., 1998; Vidal et coll., 2002). En 1998, Weed et coll. montrent que la translocation de la cortactine du cytoplasme à la membrane plasmique est liée directement à l'activation des extensions membranaires contrôlées par Rac1 (Weed et coll., 1998): tout d'abord, cette équipe montre que dans les fibroblastes 3T3 privés de sérum, la localisation cellulaire de la cortactine est diffuse dans le cytoplasme. Les traitements avec des facteurs de croissances (PDGF (platelet-derived growth factor) et PMA (phorbol myristate acetate)) qui sont des activateur de Rac1 (Zigmond, 1996), induisent des extensions membranaires et la cortactine est relocalisée à la membrane plasmique où elle colocalise avec l'actine corticale. Puis en utilisant des mutants de Rac1, cette équipe montre que l'expression d'un dominant négatif de Rac1 qui inhibe les extensions membranaires comme cela avait déjà été démontré (Ridley et coll., 1992), inhibe aussi la translocation de la cortactine vers la membrane plasmique. L'expression d'un mutant de Rac1, avec une activité GTPases défailante, mène à une augmentation exagérée des extensions membranaires et à la translocation quasi-totale de la cortactine à la membrane plasmique (Weed et coll., 1998).

Dans cet article, plusieurs remarques sont importantes:

Premièrement, les auteurs précisent qu'ils n'ont pas détectés de variation du taux de cortactine phosphorylée. En effet même si la phosphorylation de la cortactine a bien été documentée et semble impliquée dans la fonction de la cortactine, la voie de signalisation qui mène à la translocation de la cortactine vers la membrane plasmique reste inconnue.

Deuxièmement, les auteurs précisent qu'ils n'ont pas pu mettre en évidence une interaction directe entre la cortactine et Rac1 (en co-immunoprécipitation), mais ils suggèrent qu'une ou plusieurs protéines de liaison avec Rac1 pourraient interagir avec la cortactine et soumettent l'hypothèse d'un candidat possible POR1 (**Partner of Rac1**) (Van Aelst et coll., 1996).

## **IV.2 La myosine II et la formation des lamellipodes**

Différentes approches ont mis en évidence le rapport entre l'inhibition de la fonction de myosine II et l'extension de lamellipode suggérant l'implication de la myosine II dans la dynamique de la membrane plasmique: l'ablation des gènes spécifiques de chaque isoforme de MHCs, l'utilisation d'ARN d'interférence ciblant chaque isoforme de MHCs et l'inhibition de l'activité ATPasique des MHCs par la blebbistatine. Le lien entre l'inhibition de l'expression des isoformes de myosine II ou l'altération de la fonction de la myosine II et la formation de lamellipodes n'est toujours pas clarifié.

L'expression de MHCIIA est diminuée de 60 à 65% dans les fibroblastes HFFs (human foreskin fibroblasts) traités avec l'ARN d'interférence spécifique de MHCIIA (Even-Ram et coll., 2007). Morphologiquement, ces fibroblastes traités présentent une forme cellulaire comparable à celle des cellules embryonnaires ES (stem cells) issues de souris knockout pour MHCIIA: cette morphologie cellulaire, déterminée par l'absence de MHCIIA, est caractérisée par une exagération des extensions membranaires et plus précisément par la formation de larges lamellipodes instables et très dynamiques. Le

traitement avec la blebbistatine, un inhibiteur de l'activité ATPasique des MHCs, induit le même changement morphologique dans les cellules de type sauvage, c'est-à-dire l'extension de larges lamellipodes consolidant l'hypothèse que les MHCs sont impliquées dans la régulation négative des lamellipodes. Les auteurs montrent aussi que l'extension des lamellipodes instables et dynamiques est associée avec une augmentation du niveau d'activation de la petite protéine G, Rac1. Rac1 est plus fortement activé dans la lignée MHCIIA(-/-) que dans la lignée de type sauvage alors que l'activation de Rho reste inchangée. De plus, Rac est localisé au niveau des lamellipode en association avec Tiam1, un GEF spécifique de Rac1 (Even-Ram et coll., 2007).

Les fibroblastes issus de souris KO pour MHCIIIB (-/-) ont été étudiés pour comprendre l'incidence de la perte de MHCIIIB sur la migration cellulaire (Lo et coll., 2004). Morphologiquement, les fibroblastes de type sauvage ont les mêmes caractéristiques que les fibroblastes NIH 3T3. Par contre, les fibroblastes MHCIIIB (-/-) présentent un large lamellipode instable ce qui altère leur polarité cellulaire et leur direction de migration.

## **IV.2.1 Les relations entre myosine II, cortactine et Rac1**

### **IV.2.1.1 La myosine II et la cortactine**

En plus des observations sur l'interaction entre les isoformes de myosines II et la formation des lamellipodes, il a été rapporté que la cortactine co-immunoprécipite avec l'isoforme MHCIIA (He et coll., 1998). Dans cet article, les auteurs transfectent des cellules NIH 3T3 avec la protéine Ras. La protéine Ras est connue pour activer la kinase PI-3 qui active à son tour Rac1 (Rodriguez-Viciano et coll., 1997). Très rapidement, la transfection de Ras induit l'extension de lamellipodes. La co-immunoprécipitation de la cortactine avec MHCIIA est détectée seulement dans les cellules NIH 3T3 contrôles et pas dans les cellules NIH 3T3 transfectées avec Ras, suggérant que l'activation de Rac1, inhibe l'interaction de MHCIIA avec la cortactine. Le complexe cortactine/MHCIIA est conservé

lorsque les cellules sont transfectées avec Ras et traitées avec un inhibiteur spécifique de Rac1.

Ces résultats tendent à montrer que, la cortactine interagirait avec MHCIIA seulement dans le cytoplasme. Lors de la formation du lamellipode, la cortactine qui est relocalisée à la membrane plasmique n'interagirait pas avec MHCIIA ce qui concorde avec le fait que MHCIIA visualisée par immunofluorescence, est exclue de la membrane du lamellipode (Vicente-Manzanares et coll., 2007).

#### **IV.2.1.2 La myosine II et Rac1**

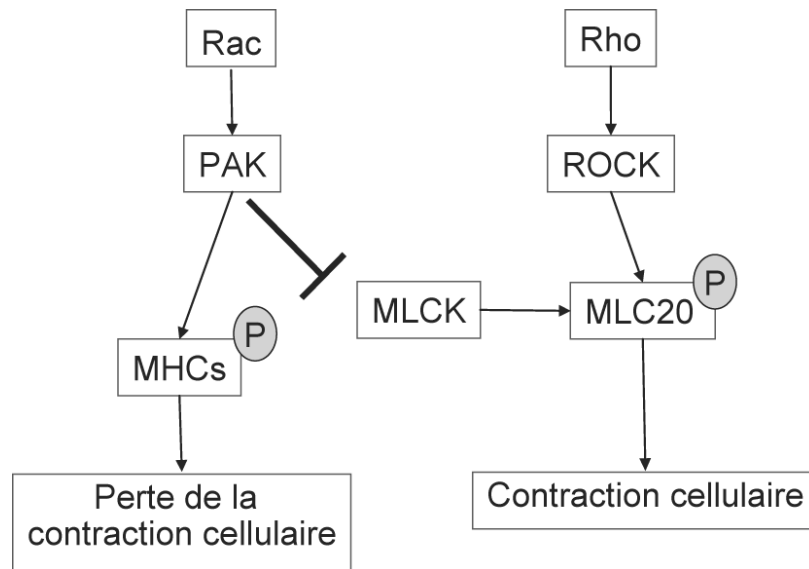
Il existe un lien entre l'activation de Rac1 durant la formation du lamellipode et le complexe actomyosine. En effet, il est très intéressant de voir que le complexe actomyosine n'est pas sollicité de la même façon en fonction des Rho GTPases activées.

Comme on l'a vu précédemment, l'activation de RhoA induit la formation des fibres de stress et des contacts focaux. Rho induit alors l'activation des kinases ROCKs et la phosphorylation de MLC20, contribuant à augmenter la contraction cellulaire (Gutjahr et coll., 2005).

L'activation de Rac1, par contre, induit la formation des lamellipodes et a l'effet opposé à RhoA: l'activation de Rac1 induit l'activation des kinases PAKs qui inhibent la phosphorylation de MLC20, donc contribue à diminuer la contraction cellulaire. En effet, la transfection de cellules issues de carcinome, avec un dominant-actif de Rac1, altère la polarité cellulaire et inhibe la phosphorylation de MLC20 (Gutjahr et coll., 2005). L'inhibition de Rac1 n'a par contre pas d'effet sur la phosphorylation des MLC20 (Salhia et coll., 2008). L'activité de Rac1, et de ces effecteurs, est aussi impliquée dans la phosphorylation des MHCs et plus spécifiquement de MHCIIA via PAK, et comme on l'a vu précédemment la phosphorylation des MHCs inhibe la formation de filaments bipolaires de myosine II, contribuant encore à diminuer la contraction cellulaire. D'où le modèle



proposé par Van Leeuwen et coll. dans lequel, l'activation de RhoA mène à une augmentation de la contraction cellulaire et où, au contraire, l'activation de Rac1 mène à une diminution de la contraction cellulaire (van Leeuwen et coll., 1999)(cf. **figure 9, page 81**).



**Figure 9.** Les rôles distincts de Rho et Rac dans le contrôle de l'activité du complexe d'actomyosine. Figure adaptée de (van Leeuwen et coll., 1999).

## V. Les modèles utilisés

### V.1 Les cellules folliculo stellaires de l'hypophyse antérieure et la lignée TtT/GF

Les cellules folliculo stellaires (FS) ont été décrites la première fois par Rinehart et Farquhar en 1953 (Rinehart et Farquhar, 1953) par l'étude en microscopie électronique de l'hypophyse antérieure de rat. En se basant sur l'absence de granules de sécrétion dans le cytoplasme des cellules observées, Rinehart et Farquhar ont visualisé un type cellulaire très peu représenté (5%) par rapport aux cellules granulaires endocrines. Ils en ont conclu qu'il s'agissait probablement d'un type cellulaire distinct des cellules endocrines. Ce «nouveau» type cellulaire est agranulaire avec un noyau dense, présentant une forme étoilée contrastant avec la forme ronde des cellules endocrines et enfin, dessinant au sein de l'hypophyse antérieure des cavités en forme de follicules d'où le nom «folliculo stellaire» donné par Vila-porcile en 1972 (Vila-Porcile, 1972). Puis en 1980, Nakajima et son équipe montrent par microscopie électronique et immunohistochimie que dans l'hypophyse antérieure de rat, seule la population des cellules FS exprime la protéine S-100 spécifique du tissu nerveux, dans le noyau et le cytoplasme (Nakajima et coll., 1980). D'autres études montrent aussi ce fait chez d'autres animaux ainsi que chez l'homme (Girod et coll., 1985; Van Nassauw et coll., 1987; Cardin et coll., 2000; Vitale et coll., 2001; Marettova et Maretta, 2004). Le marquage positif pour la protéine S-100 suggère que les cellules FS sont d'origine neuroectodermique. Les cellules FS expriment aussi le glial fibrillary acidic protein (GFAP) (Van Nassauw et coll., 1987).

Les cellules FS étendent de longs prolongements cellulaires formant un réseau entre les cellules endocrines notamment les cellules thyrotrophes et jouent un rôle de soutien ou support pour les cellules endocrine (Harrisson et coll., 1982). Allaerts et son équipe en 1990 suggèrent que les cellules FS sont impliquées dans la sécrétion de facteurs comme les

cytokines et pourraient jouer un rôle plus important que le métabolisme, le support ou le trafic au sein de l'hypophyse antérieure. En effet, les cellules FS modulent d'une façon paracrine la sécrétion et la production des hormones hypophysaires (Baes et coll., 1987; Allaerts et coll., 1994). Le réseau que forment les cellules FS avec leurs prolongements cytoplasmiques permet une communication intercellulaire, entre les cellules FS et entre les cellules FS et les cellules endocrines (Soji et coll., 1997) et les jonctions lacunaires jouent un rôle important dans cette communication intercellulaire (Fauquier et coll., 2001; Stojilkovic, 2001; Fortin et coll., 2006; Meilleur et coll., 2007).

Plus récemment, des travaux ont montré que les cellules FS sont impliquées dans la communication entre le système immunitaire et le système hormonal, cela par le fait que des cytokines peuvent moduler la sécrétion hormonale hypophysaire par le biais des cellules FS qui produisent et sont elles-mêmes la cible de cytokines. Un rapprochement a même été fait entre les cellules dendritiques et les cellules FS qui sont capables de phagocytose (Allaerts et coll., 1996). En ce qui concerne les facteurs sécrétés par les cellules FS, il y a des facteurs de croissance comme le basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) (Ferrara et coll., 1987) et le vascular endothelial growth factor (VEGF) (Ferrara et Henzel, 1989; Gospodarowicz et Lau, 1989), des cytokines tel le leukemia inhibitory factor (LIF) (Ferrara et coll., 1992), l'interleukine-6 (Vankelecom et coll., 1989) et le macrophage migration inhibitory factor (MIF) (Tierney et coll., 2005) et enfin des peptides comme la follistatine (Gospodarowicz et Lau, 1989).

En 2000, des travaux dans notre laboratoire (Cardin et coll., 2000) ont montré que chez le male vison qui est un animal à reproduction saisonnière, les cellules FS observées par immunohistochimie présentaient deux types de formes distincts: le type 1 observé lorsque l'animal est sacrifié au printemps (en avril), présente une forme étoilée avec de longs prolongements cytoplasmique. Le type 2 est observé lorsque l'animal est sacrifié (en hiver) et présente une forme ronde sans projections cytoplasmiques. Il existe donc deux formes de cellules FS en fonction de l'activité sécrétoire de l'hypophyse antérieure qui

varie chez le vison en fonction des saisons. Comme les cellules FS sont sensibles à différents facteurs comme les cytokines, nous avons cherché à déterminer si une de ces cytokines pouvait être à l'origine de ce changement de forme.

L'établissement d'une lignée cellulaire de cellules FS, la lignée TtT/GF, a grandement facilité le travail des chercheurs (Inoue et coll., 1992). Ces cellules présentent les mêmes caractéristiques morphologiques, c'est à dire une forme étoilée avec de longs prolongements cytoplasmiques et forment en culture des follicules. De plus, la lignée TtT/GF exprime les mêmes marqueurs caractéristiques des cellules FS, comme la protéine S-100 et le GFAP et répondent aux mêmes stimuli dont le TNF $\alpha$  (Kobayashi et coll., 1997; Lohrer et coll., 2000).

## **V.2 La lignée de fibroblastes NIH 3T3**

Les fibroblastes sont des cellules du tissu conjonctif qui dérivent des cellules souches mésenchymateuses et sont impliqués dans la cicatrisation et dans la synthèse de molécules de la matrice extracellulaire. Leur migration répond au chemotaxisme et à divers stimuli physiques (Pelham et Wang, 1997; Lo et coll., 2000). La migration des fibroblastes en culture, a particulièrement bien été caractérisée et est coordonnée en plusieurs étapes: l'extension d'un front cellulaire, l'adhésion, la translocation du corps cellulaire et le détachement du train arrière (Lauffenburger et Horwitz, 1996; Mitchison et Cramer, 1996; Sheetz et coll., 1998). La lignée NIH 3T3 a été obtenue à partir de fibroblastes embryonnaires de souris en 1962 (Todaro et Green, 1963) est représentée la lignée standard de fibroblaste. La désignation NIH provient du type souris (NIH Swiss mice) et 3T3 provient du nom donné au protocole de culture de cette lignée: «**3**-day transfer, inoculum **3** x 10<sup>5</sup> cells», c'est-à-dire que les fibroblastes sont transférés tout les 3 jours à une densité de 3 x 10<sup>5</sup> cellule jusqu'à l'obtention spontanée d'une population de cellules immortalisées avec un taux de division stable ce qui se produit entre la 20<sup>ème</sup> et la 30<sup>ème</sup> génération. La lignée NIH 3T3 est utilisée comme un modèle pour l'étude des fibroblastes in vitro. Les fibroblastes NIH 3T3 présentent des caractéristiques morphologiques spécifiques des

fibroblastes: ce sont des cellules allongées, quelques fois fusiformes, avec de nombreux prolongements cytoplasmiques et extensions membranaires. Ceux sont des cellules très mobiles et qui n'ont pas perdu leur inhibition de contact en culture. La lignée NIH 3T3 sert de référence à l'étude des fibroblastes.

### **V.3 La souche de fibroblastes embryonnaires knockout pour MHCIIB**

En 1997, l'équipe du Dr. Adelstein a généré des souris dont le gène de la MHCIIB a été supprimé (Tullio et coll., 1997). Brièvement, un plasmide contenant le gène de résistance à la néomycine *neoR* flanqué de deux séquences spécifiques du locus de MHCIIB est introduit dans des cellules embryonnaires de souris par électroporation. Les cellules embryonnaires dans lesquelles le gène de résistance à la néomycine s'est inséré, au niveau de l'exon 2 codant pour MHCIIB par recombinaison homologue, sont sélectionnées sur un milieu contenant de la néomycine. Ces cellules embryonnaires sont cultivées selon une méthode précise (Li et coll., 1992) puis une analyse du génome est réalisée par Southern blot pour vérifier que la recombinaison homologue a fonctionné. Les cellules des clones positifs sont microinjectées dans le blastocoele d'embryons de souris. Les embryons sont réimplantés dans des mères porteuses puis une analyse par Southern blot est réalisée pour évaluer si le transgène a été transmis à la lignée germinale. Par croisements répétés, des souris hétérozygotes (B+/B-) et homozygotes (B+/B+),(B-/B-) sont obtenues. En 2004, Lo et coll. isolent les fibroblastes embryonnaires de souris de type sauvage (Wt), ou B+/B+, et de souris B-/B-, ou MHCIIB (-/-), issues de la même portée et obtiennent une lignée cellulaire de chaque type par passages répétitifs (Lo et coll., 2004).

La lignée Wt présente un phénotype comparable à la lignée NIH 3T3. La lignée de fibroblastes B-/B-, ou MHCIIB (-/-) a été sélectionnée sur la base que l'expression de MHCIIA devait être identique à celle des fibroblastes Wt ; dans cette lignée, il n'a pas de compensation de la perte de MHCIIB, par une augmentation de l'expression de MHCIIA.

Les auteurs attestent que la seule différence en composition protéique des deux lignées est l'absence de MHCIIIB dans les fibroblastes MHCIIIB (-/-) et précisent qu'ils n'ont pas observé de différences ni dans la distribution des fibres de stress ni dans la distribution de la vinculine au niveau des contacts focaux, entre les deux lignées. Il faut aussi noter qu'au niveau de la distribution des isoformes dans les fibroblastes Wt, MHCIIIB semble être associée plus fortement aux fibres de stress que MHCIIA et MHCIIIB est présente au centre de la cellule alors que MHCIIA est plutôt localisée en périphérie (ce qui est l'inverse de ce qui avait été trouvé jusqu'à présent).

## VI. Hypothèse de recherche

Le complexe d'actomyosine est formé par l'association de la myosine II avec les filaments d'actine. Certains processus cellulaires comme la motilité cellulaire et l'apoptose, sont dépendants de la contraction cellulaire non-musculaire c'est-à-dire des forces de traction exercées par le complexe d'actomyosine. La forme cellulaire dépend de la modulation du cytosquelette d'actine et donc du rôle de stabilisation exercé par le complexe actomyosine sur les filaments d'actine.

Beaucoup de travaux se sont penchés sur le rôle des chaînes légères régulatrices (MLC20) dans le contrôle de l'activité du complexe actomyosine. Par contre, très peu d'attention a été portée sur le rôle des MHCs. Comme il existe trois isoformes de MHCs de myosine II, il est intéressant d'élucider si ces isoformes jouent des rôles identiques ou différents lorsque le complexe d'actomyosine est sollicité par la cellule. Le focus a été fait sur l'implication de MHCIIA et MHCIIIB, car l'isoforme MHCIIIC semble seulement exprimée dans les cellules d'origine hématopoïétique. D'ailleurs, il reste beaucoup à découvrir sur l'isoforme MHCIIIC dont la séquence n'est disponible sur le site de NCBI que depuis juillet 2008.

MHCIIA et MHCIIIB ont des taux d'expression qui peuvent varier selon le stade de développement ou le type cellulaire, des activités enzymatiques différentes et des localisations cellulaires distinctes suggérant que ces deux isoformes pourraient avoir chacune des fonctions spécifiques. Donc à partir de ces observations, nous nous sommes proposés d'étudier, dans ce travail de doctorat, les fonctions contractiles et structurales spécifiques de chacune des isoformes MHCIIA et MHCIIIB durant dans deux processus physiologiques, l'apoptose et l'établissement de la forme cellulaire.

Dans un premier temps, nous avons émis l'hypothèse que l'implication des isoformes MHCIIA et MHCIIIB serait différente dans le processus de contraction cellulaire

qui caractérise la phase tardive de l'apoptose. Nous avons étudié le processus de contraction cellulaire en observant la morphologie des cellules apoptotiques, l'expression des différents acteurs de l'apoptose en induisant l'apoptose de quatre lignées cellulaires distinctes. Puis nous avons étudié l'implication de chacune des isoformes MHCIIA et MHCIIB durant ce processus.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié comment l'isoforme MHCIIB affecte la forme cellulaire, en observant les différences marquantes entre la lignée de fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs) déficiente pour MHCIIB, ou MHCIIB (-/-) et la lignée de fibroblastes embryonnaires de souris de type sauvage (Wt) issue de la même portée.

Morphologiquement, les fibroblastes MHCIIB (-/-) présentent de larges extensions de la membrane plasmique, des lamellipodes, qui paraissent aberrantes par rapport à la morphologie des fibroblastes Wt. L'extension de ces larges lamellipodes semble uniquement due à l'absence de MHCIIB suggérant que la perte de la fonction structurale de MHCIIB affecte la forme cellulaire et la dynamique des extensions membranaires. Nous avons donc étudié par quel mécanisme l'absence de MHCIIB pouvait induire la formation de lamellipodes et quelles étaient les protéines impliquées.



## RESULTATS

### I. Premier article:

#### **Isoform B of myosin II heavy chain mediates actomyosin contractility during TNF $\alpha$ -induced apoptosis.**

Sara Solinet and María Leiza Vitale

Department of Pathology and Cell Biology, Université de Montréal.

2900 Edouard-Montpetit, Montréal, Québec, H3T 1J4 Canada

*Accepted 19 February 2008*  
*Journal of Cell Science 121.*

**Short title:** myosin II heavy chains in apoptosis.

**Key words:** myosin, apoptosis, actin.

## I.1 Summary

Cells that are treated long-term with TNF $\alpha$  or short-term with TNF $\alpha$  together with cycloheximide (CHX) undergo apoptosis. Cell shrinkage and detachment during apoptosis is dependent on actomyosin contractility. Myosin II heavy chain (MHCII) isoforms have shared and distinct functions. Here, we investigated whether the involvement of MHCII isoforms A and B (MHCIIA and MHCIIIB, respectively) in cell shrinkage and detachment differs during apoptosis. We show that TNF $\alpha$  induced caspase-dependent MHCIIA degradation, whereas MHCIIIB levels and association with the cytoskeleton remained virtually unchanged in TtT/GF cells and NIH 3T3 fibroblasts. MHCIIA proteolysis also occurred in fibroblasts that lack MHCIIIB when treated with TNF $\alpha$  and CHX together. The absence of MHCIIIB did not affect cell death rate. However, MHCIIIB (-/-) fibroblasts showed more resistance to TNF $\alpha$ -induced actin disassembly, cell shrinkage and detachment than wild-type fibroblasts, indicating the participation of MHCIIIB in these events. Moreover, inhibition of atypical PKC $\zeta$ , which targets MHCIIIB but not MHCIIA, blocked TNF $\alpha$ -induced shrinkage and detachment in TtT/GF cells and wild-type fibroblasts, but the inhibitory effect was significantly reduced in MHCIIIB (-/-) fibroblasts. TNF $\alpha$  treatment increased cytoskeleton-associated myosin light chain (MLC) phosphorylation but did not induce actin cleavage. In conclusion, our results demonstrate that MHCIIIB, together with MLC phosphorylation and actin, constitute the actomyosin cytoskeleton that mediates contractility during apoptosis.

## I.2 Introduction

The tumour necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) is a pro-inflammatory cytokine involved in distinct bioregulatory functions such as cell proliferation, differentiation and programmed cell death or apoptosis (Leong and Kaplan, 2000). During apoptosis, TNF $\alpha$  signalling triggers the trimerization of TNF $\alpha$ -receptor-1 (TNFR1) leading to the sequential recruitment of a series of adaptor proteins to constitute the death-inducing signalling complex (DISC) (Baud and Karin, 2001). DISC assembly induces the cleavage and activation of the initiator pro-caspase-8 (Baud and Karin, 2001) which triggers the “execution” phase of apoptosis during which several effector caspases are activated that cause the cleavage of target proteins (Mills et al., 1999) - among them several cytoskeletal proteins (Chen et al., 2001; Jänicke et al., 1998; Kook et al., 2003).

The execution phase of the apoptotic process is characterized by specific changes in cell morphology, such as chromatin condensation and fragmentation, cell shrinkage, membrane blebbing, and apoptotic body formation (Earnshaw, 1995; Mills et al., 1999). Actin-myosin interaction is required to generate the contractile force necessary for most of these morphological responses (Croft et al., 2005; Mills et al., 1999; Suarez-Huerta et al., 2000b).

Myosins are motor proteins that bind to and move on actin filaments. Myosins are oligomers formed by one or two myosin heavy chains (MHCs) and one or more light chains (MLCs). Several classes of myosins have been described and classified on the basis of the MHC isoform in the complex (Korn, 2000). Contractile actomyosin fibers are mainly formed by the association of actin and myosin II. Class II conventional myosins are hexamers constituted through the noncovalent association of a pair of MHCs (MHCII, 200 kDa) and two pairs of MLCs (17 and 20 kDa) one of which being “regulatory” and the other “constitutive” (Bresnick, 1999).

Actomyosin fiber contraction in nonmuscle cells is regulated by the phosphorylation state of the regulatory MLC, which is dependent on MLC kinase (MLCK)

(Gallagher et al., 1997) and Rho-regulated kinases (ROCK1 and ROCK2) (Amano et al., 1996; Maekawa et al., 1999) and on myosin phosphatase (Kimura et al., 1996; Noda et al., 1995). All these enzymes are necessary for cell contraction, shrinkage, membrane bleb formation and relocalization of fragmented DNA into apoptotic bodies (Coleman et al., 2001; Croft et al., 2005; Mills et al., 1998; Orlando et al., 2006; Song et al., 2002).

The experimental evidence has demonstrated a role for MLC phosphorylation and for the corresponding kinases in generating contractile forces within cells that undergo apoptosis, but the potential role of MHC has received little attention. Interaction between actin and myosin II and, thus, the formation of actomyosin contractile elements, also depend on the heavy chains that possess the actin-binding site and the actin-activated ATPase activity (Bresnick, 1999). The C-terminal region of the MHC binds to cellular structures and acts as a crosslinker that stabilises the actomyosin complex (Bresnick, 1999). The class II nonmuscle MHC consists of three isoforms, MHCIIA, MHCIIIB (Sellers and Goodson, 1995) and the recently discovered MHCIIIC (Golomb et al., 2004). Whereas MHCIIA and MHCIIIB share a high degree of homology in the amino-acid sequence (Takahashi et al., 1992), their catalytic activity and intracellular distribution differ (Kawamoto and Adelstein, 1991; Kelley et al., 1996; Lo et al., 2004). This suggests that, although some of the activities of the isoforms overlap (Wylie and Chantler, 2001), intrinsic differences also occur (Kolega, 2003; Lo et al., 2004; Straussman et al., 2001; Swailes et al., 2006; Togo and Steinhardt, 2004; Vicente-Manzanares et al., 2007; Wei and Adelstein, 2000; Wilson et al., 2001; Wylie and Chantler, 2003). In addition, differential phosphorylation of the MHCIIIs has been shown to be implicated in regulating myosin fiber assembly (Redowicz, 2001). Numerous studies have focussed on the role of MHCII isoforms in cell locomotion and cytokinesis but few have attempted to elucidate the role of the isoforms in apoptosis. MHCIIA has been reported to be a caspase-3 target during apoptosis (Gerner et al., 2000; Kato et al., 2005; Suarez-Huerta et al., 2000a).

Our study addresses the contribution of MHCII isoform A and isoform B in actin cytoskeleton remodelling during TNF $\alpha$ -induced apoptosis. The study used the

folliculostellate (FS) cell line TtT/GF, a stable mouse cell line characterized by morphological and biochemical features of normal FS cells (Allaerts and Vankelecom, 2005; Inoue et al., 1992). TtT/GF cells express the TNFR1 receptor (Kobayashi et al., 1997) and are responsive to TNF $\alpha$  (Fortin et al., 2006; Kobayashi et al., 1997; Meilleur et al., 2007). Here, we report a distinctive participation of MHCIIA and MHCIIB in the execution phase of apoptosis. MHCIIB, together with the phosphorylated MLCs, is required for the formation of a functional contractile cytoskeleton that is needed for shrinkage and detachment of apoptotic cells. In addition, our results show that PKC $\zeta$  facilitates this process.

## I.3 Results

### Long-term TNF $\alpha$ treatment induces apoptosis of TtT/GF cells

TtT/GF cells cultured in a serum-containing medium possessed abundant lamellipodia, pseudopodia and membrane ruffles and, as they settle, they progressively acquired a flatten and elongated morphology (Fig. 1A, control, 24 to 96 hours). We have previously shown that the actin cytoskeleton of serum-cultured TtT/GF cells is characterized by its association with the subplasmalemmal region and by the presence of thin cytoplasmic actin cables (Zheng et al., 2005). Treatment of TtT/GF cells with TNF $\alpha$  for increasing periods of time (0 to 96 hours) induced the cells to acquire a rounded shape and to detach from the culture support (Fig. 1A, TNF $\alpha$ ). Detached cells showed abundant membrane blebbing (Fig. 1A, TNF $\alpha$ , inset). These TtT/GF cell morphological responses to TNF $\alpha$  were similar of those seen in cells undergoing apoptosis (Earnshaw, 1995; Mills et al., 1999). To confirm or infirm whether long-term TNF $\alpha$  treatment alone caused apoptosis of TtT/GF cell, we searched for the presence of distinct apoptotic hallmarks.

Firstly, by using Western blot analysis, we detected the cleavage - and, therefore, the activation - of the initiator caspase 8 (Fig. 1B) and of the effector caspase-3 (Fig. 1C) following treatment with TNF $\alpha$ . Caspase 8 activation was observed as early as 48 hours after addition of TNF- $\alpha$  (Fig. 1B), whereas caspase-3 activation was observed from 72 hours onwards (Fig. 1C). Caspase-3 cleavage was blocked by the wide-range caspase inhibitor Z-VAD-fmk (Fig. 1D). Interestingly, the caspase-3 fragment corresponding to the active enzyme was recovered in the cytoskeleton-enriched-fraction of TNF $\alpha$ -treated cells (Fig. 1D), suggesting a close interaction between cytoskeletal proteins and activated caspase-3 during TNF $\alpha$  treatment.

Second, three different methods were used to quantify and determine whether TNF $\alpha$ -treated TtT/GF cells were undergoing apoptosis: (1) detection and counting of cell

nuclei containing condensed chromatin using an assay in which healthy cells showed low levels of blue fluorescence, apoptotic cells showed high levels of blue fluorescence and the necrotic cells showed a combination of blue and red fluorescence; (2) measurement of cytoplasmic nucleosome release induced by endonuclease activation using a photometric enzyme-immunoassay that detects cytoplasmic histone-associated-DNA fragments (mono and oligonucleosomes) and; (3) counting of detached cells. Our time-course studies showed that there was an increasing trend in the number of TNF $\alpha$ -treated cells displaying these apoptotic markers from 48 hours onwards (Fig. 1E). TNF $\alpha$ -induced TtT/GF cell contraction and detachment (Fig. 1F), and nucleosome release (Fig. 1G) were blocked by the caspase inhibitor Z-VAD-fmk.

Third, in accordance with the orderly dismantling of the apoptotic cells due to the proteolysis of key structural proteins, exposure of TtT/GF cells to TNF $\alpha$  for more than 48 hours caused the down-regulation of the focal-adhesion-associated protein  $\alpha$ -actinin and the cleavage of the actin-anchoring protein spectrin into two fragments (Fig. 1H). The 150 kDa spectrin fragment corresponds to the calpain-catalyzed cleavage of spectrin, whereas the 120 kDa fragment corresponds to the caspase-3-mediated cleavage of the protein (Boivin et al., 1990; Jänicke et al., 1998). The TNF $\alpha$ -induced proteolysis of these actin-binding proteins was coincident with the activation of caspases 8 and 3, and was blocked by caspase inhibitor Z-VAD-fmk (not shown).

Fourth, changes in the phosphorylation state of MLC during apoptosis are required for cell retraction, membrane blebbing, nuclear disintegration and formation of apoptotic bodies (Croft et al., 2005; Mills et al., 1998). We found that MLC phosphorylated in serine residue 19 (MLC-Ser19-P) was mainly associated with the cytoskeleton-enriched fraction of control and TNF $\alpha$ -treated cells. Long-term exposure of TtT/GF cells to TNF $\alpha$  increased level of MLC-Ser19-P, which were reduced by caspase inhibition (Fig. 2A). Most MLC was recovered in the cytoskeleton fraction of control and TNF $\alpha$ -treated cells (Fig. 2A). The cytoskeleton-associated MLC levels slightly increased after TNF $\alpha$  treatment and this was

independent of caspase activation (Fig. 2A). By contrast, the TNF $\alpha$ -induced MLC decreased in the non-cytoskeleton-enriched fraction was partially blocked by Z-VAD-fmk (Fig. 2A). Long-term incubation with TNF $\alpha$  led to ROCK1 translocation to the cytoskeleton and to its cleavage into a 122 kDa fragment that was also recovered in the cytoskeleton fraction (Fig. 2B). ROCK1 cleavage, but not its translocation to the cytoskeleton, was blocked by caspase inhibition (Fig. 2B). ROCK2 was not cleaved by TNF $\alpha$  treatment (data not shown). The ROCK1 inhibitor Y-27632 blocked TNF $\alpha$ -induced MLC-Ser19-P increase (not shown). ROCK1 inhibition induced broad lamellipodia and thin cytoplasmic extensions in untreated cells and blocked TNF $\alpha$ -induced cell contraction and detachment (Fig. 2C).

Together, the results prove that long-term TNF $\alpha$  treatment induced the apoptosis of TtT/GF cells. Moreover, the findings demonstrate that there is a time-related activation of caspase-3 and cytoskeleton remodelling in TNF $\alpha$ -induced TtT/GF cell apoptosis.

### **The role of MHCIIA and MHCIIIB in the execution phase of apoptosis**

The participation of MLC in apoptosis is well established but the differential implication of MHCII isoforms is unknown. We therefore investigated the participation of MHCIIA and MHCIIIB in TNF $\alpha$ -induced TtT/GF cell apoptosis.

TtT/GF cells were incubated 96 hours either with culture medium only or with culture medium containing TNF $\alpha$ . Next, MHCIIA and MHCIIIB expression was analysed by Western blotting in the non-cytoskeleton (N)- and cytoskeleton (C)-enriched subcellular fractions. MHCIIA levels were reduced in the non-cytoskeleton fraction in TNF $\alpha$ -treated cells and the levels recovered after blocking caspase activity (Fig. 3A, N-labelled lanes in MHCIIA blot). MHCIIA content in the cytoskeleton-enriched fraction was decreased separately by Z-VAD-fmk and TNF $\alpha$  when compared to control levels (Fig. 3A, C-labelled



lanes in MHCIIA blot). Treatment of TtT/GF cells with TNF $\alpha$  in combination with Z-VAD-fmk increased MHCIIA levels in the cytoskeleton fraction with respect to those measured in cells treated with TNF $\alpha$  alone. However, MHCIIA levels were lower than those assessed in Z-VAD-fmk-treated and control cells (Fig. 3A, C-labelled lanes in MHCIIA blot). Two different polyclonal MHCIIA antibodies yielded the same results. No MHCIIA fragments were detected by these antibodies in any of the subcellular fractions. The effect of TNF $\alpha$  on MHCIIIB was very different. Cytoskeleton-associated MHCIIIB was not affected by TNF $\alpha$  treatment, whereas non-cytoskeleton-MHCIIIB was slightly reduced by the treatment and this reduction was abolished by the caspase inhibitor (Fig. 3A, MHCIIIB). Similar results were obtained with three different antibodies against MHCIIIB.

These results demonstrate that TNF $\alpha$  alone is capable of inducing TtT/GF cell apoptosis when the cells are incubated for long periods of time. Probably, the delay in inducing apoptosis is because TNF $\alpha$  elicits both anti-apoptotic and pro-apoptotic signals, but with time the apoptotic signals prevail in TtT/GF cells. To block the TNF $\alpha$ -induced anti-apoptotic signals, we inhibited the survival pathways using the eukaryotic protein synthesis inhibitor cycloheximide (CHX, 5  $\mu$ g/ml). In addition, to assess whether the different behaviour of the two myosin II isoforms also takes place in other cells, we used another cell line, the NIH 3T3 fibroblasts. A 24 hours-incubation with either TNF $\alpha$  or CHX did not affect MHCIIA levels; however, TNF $\alpha$  together with CHX reduced MHCIIA levels which were restored by Z-VAD-fmk in both cell types (Fig. 3B). On the contrary, MHCIIIB levels in TtT/GF cells were not affected by neither TNF $\alpha$  nor CHX nor a combination of the compounds (Fig. 3B). TNF $\alpha$  alone did not affect MHCIIIB but together with CHX slightly decreased the levels of the protein in NIH 3T3 fibroblasts (Fig. 3B). To characterize the differential stability of MHCII isoforms A and B, TtT/GF cells were incubated with the protein synthesis inhibitor CHX (50  $\mu$ g/ml; Fig. 3C) or with the transcription inhibitor actinomycin D (ActD, 1  $\mu$ g/ml; Fig.3D) for increasing periods of time. The expression levels of each myosin II isoform was assessed by western blotting. The MHCIIA protein and mRNA showed a faster turnover than those of MHCIIIB.

### **MHCIIB (-/-) embryonic fibroblasts**

Our results show that MHCIIIB was less affected than MHCIIA during cytoskeleton reorganization in cells undergoing apoptosis. Perhaps, MHCIIIB is the isoform that remains longer in the cells to form the active actomyosin fibers which mediate some morphological responses during the execution phase of the apoptotic process. This was investigated by using a stable mouse embryonic cell line lacking MHCIIIB (MHCIIIB (-/-) fibroblasts) with the corresponding wild-type cells (Tullio et al., 1997). The MHCIIIB (-/-) fibroblasts express neither MHCIIIB nor MHCIIIC but only MHCIIA (Lo et al., 2004), which is therefore the only MHCII isoform to interact with MLC and to be incorporated in the actomyosin contractile fibers in these cells.

The wild-type and MHCIIIB (-/-) fibroblasts were treated with culture medium alone, or with culture medium containing either TNF $\alpha$  or TNF $\alpha$  plus CHX for 24 hours. Short-term incubation with TNF $\alpha$  did not affect MHCIIA levels in either wild-type or MHCIIIB (-/-) fibroblasts (Fig. 4A, B). However, TNF $\alpha$  together with CHX decreased MHCIIA levels in both cell lines (Fig. 4A, B). The effect was blocked by the caspase inhibitor Z-VAD but not by ROCK1 inhibitor Y-27632 (Fig. 4A, B). MHCIIIB levels were not affected by any of those treatments in the wild-type fibroblasts (Fig. 4A). Spectrin cleavage was similar in both wild-type and MHCIIIB (-/-) embryonic fibroblasts (Fig. 4A), indicating that other members of the actin cytoskeleton were similarly affected in wild-type and MHCIIIB (-/-) fibroblasts. Indeed, caspase-3 was processed similarly in wild-type and MHCIIIB (-/-) fibroblasts (Fig. 4A). Furthermore, a time course study revealed that wild-type and MHCIIIB (-/-) embryonic fibroblasts responded to TNF $\alpha$ +CHX treatment by activating caspase-3 and by degrading MHCIIA with similar kinetics (Fig. 5 A). In addition, there was no difference in the percentage of active caspase-3-positive cells during TNF $\alpha$ +CHX treatment in both cell lines, indicating that the absence of MHCIIIB did not affect the rate of cell death. (Fig. 5 B).

We next evaluated whether the morphological responses that normally take place in cells undergoing apoptosis were affected or not by the absence of MHCIIIB. Wild-type embryonic fibroblasts treated with TNF $\alpha$ +CHX retracted and detached (Fig. 6A). By contrast, most MHCIIIB (-/-) fibroblasts subjected to the same treatment remained flat and adherent (Fig. 6A). Quantification of cell attachment demonstrated a tenfold increase in the number of attached cells in the MHCIIIB (-/-) cell line with respect to the wild-type fibroblasts after TNF $\alpha$ +CHX treatment (Fig. 6B). The percentage of apoptotic, i.e. cells labelled with caspase-3 that remained flat and adherent during TNF $\alpha$ +CHX treatment, was also higher within the MHCIIIB (-/-) than within the wild-type fibroblasts from 16 hours onwards (Fig. 6C). Since we have shown that the percentage of apoptotic cells for each time point is the similar in both cell lines (Fig. 5B), this result indicate that there is an accumulation of flat cells within the apoptotic MHCIIIB (-/-) cell population.

We further characterized this differential behaviour by double labelling the TtT/GF cells and the wild-type and MHCIIIB (-/-) embryonic fibroblasts with rhodamine-phalloidin to exhibit the filamentous actin (F-actin) distribution, and with antibody against active caspase-3 to label the apoptotic cells (Fig. 7). All control cells were flat and showed plasma membrane projections and cortical and cytoplasmic F-actin (Fig. 7, control, F-actin). As expected, the control cells displayed a low level of caspase-3 activation (Fig. 7, control, active caspase-3). Following TNF $\alpha$ +CHX treatment for 16 hours, most TtT/GF cells and wild-type fibroblasts that remained adherent and showed labelling for active caspase-3 labelling were retracted (Fig. 7 TNF $\alpha$ +CHX-treated TtT/GF and wild-type cells). Note that caspase-3 was not activated in TNF $\alpha$ +CHX-treated TtT/GF cells that stayed flat (Fig. 7, TNF $\alpha$ +CHX, TtT/GF cells, arrows). However, most TNF $\alpha$ +CHX-treated MHCIIIB (-/-) fibroblasts that remained flat and adherent showed actin filaments and activation of caspase-3 (Fig. 7, TNF $\alpha$ +CHX, MHCIIIB (-/-) fibroblasts, see also supplementary material Fig. S1). In these cells, active caspase-3 was distributed as cytoplasmic dots (Fig. 7, MHCIIIB (-/-) fibroblasts).

### **Participation of PKC $\zeta$ in TNF $\alpha$ -induced morphological responses during apoptosis**

Having established the importance of MHCIIIB in cell shrinkage during apoptosis, we further analyzed the mechanisms by which MHCIIIB mediates cell contraction. Recent reports have shown that MHCIIIB, but not MHCIIA, is rapidly phosphorylated following EGF stimulation by a complex involving PAK1 and the atypical PKC isoform  $\zeta$  following EGF stimulation (Even-Faitelson and Ravid, 2006). PKC $\zeta$  is activated by phosphorylation at threonine residue 410 (Thr410) (Smith et al., 2003) and by a caspase-mediated cleavage that releases the C-terminal catalytic domain from the N-terminal autoinhibitory domain (Smith et al., 2000). We investigated whether PKC $\zeta$  is involved in MHCIIIB-mediated cell rounding up and detachment during apoptosis. TNF $\alpha$ +CHX treatment of TtT/GF cells caused the cleavage of endogenous PKC $\zeta$  with a time course similar to that of caspase-3 cleavage (Fig. 8A). The PKC $\zeta$  fragment was recovered in the cytoskeleton-enriched fraction (Fig. 8B). TNF $\alpha$ +CHX also induced the translocation of full-length PKC $\zeta$  to the cytoskeleton fraction (Fig. 8B). PKC $\zeta$  cleavage but not its translocation to the cytoskeleton was blocked by caspase inhibition (Fig. 8B). PKC $\zeta$  cleavage following TNF $\alpha$ +CHX treatment also took place in NIH 3T3 fibroblasts, wild-type and MHCIIIB (-/-) embryonic fibroblasts although with different kinetics (Fig. 8C).

PKC $\zeta$  and MHCIIIB have been demonstrated to physically interact (Even-Faitelson and Ravid, 2006). Here, we show that PKC $\zeta$  and MHCIIIB co-immunoprecipitated in untreated TtT/GF cells (Fig. 9 A and B) as well as in TtT/GF cells treated with TNF $\alpha$ +CHX (Fig. 9C).

To evaluate the involvement of PKC $\zeta$  in TNF $\alpha$ +CHX-induced cell retraction during apoptosis, TtT/GF cells and wild-type and MHCIIIB (-/-) embryonic fibroblasts were treated with the specific PKC $\zeta$  inhibitor Myr-PKC $\zeta$  pseudosubstrate for 16 hours. Inhibition of PKC $\zeta$  activity in control cells induced formation of cytoplasmic projection but the cells remained adherent (Fig. 10). Myr-PKC $\zeta$  pseudosubstrate neither induced the apoptosis of

any of the cells examined (Fig. 10) nor inhibited TNF $\alpha$ -induced cleavage of caspase-3 (supplementary material Fig. S2). However, PKC $\zeta$  inactivation reduced TNF $\alpha$ +CHX-induced cell retraction in TtT/GF cells and wild-type embryonic fibroblasts (Fig. 10) but was without effect on TNF $\alpha$ +CHX-treated MHCIIIB (-/-) fibroblasts (Fig. 10).

## I.4 Discussion

The study provides evidence of a distinctive role of MHCIIA and MHCIIIB isoforms during the execution phase of apoptosis. We demonstrate that MHCIIIB, together with the phosphorylated MLCs and actin, is required for the assembly of a functional contractile cytoskeleton involved in the retraction and detachment of cells undergoing apoptosis. In addition, we show that PKC $\zeta$  has a facilitatory role in this process. Because TNF $\alpha$  elicits both apoptotic and antiapoptotic signals (Baud and Karin, 2001), it is not considered a good apoptotic inducer, and therefore, it is used in combination with a protein synthesis inhibitor to selectively trigger the apoptotic pathway. However, we found that long-term TNF $\alpha$  treatment induced biochemical and morphological features in TtT/GF cells that are typical to cells undergoing apoptosis (Earnshaw, 1995; Mills et al., 1999). Furthermore, the morphological and biochemical responses observed in cells treated with TNF $\alpha$  either alone or in combination with CHX were similar, except that all events occurred faster in the presence of CHX.

The morphological responses taking place during the execution stage of the apoptotic process require the participation of the actin cytoskeleton (Coleman and Olson, 2002). Proteolysis of several actin-binding proteins contributes to cell shrinkage and detachment (Brancolini et al., 1997; Chen et al., 2001; Jänicke et al., 1998; Kook et al., 2003). At the same time, a contractile actomyosin system is necessary for cell contraction, apoptotic body formation and nuclear breakdown (Croft et al., 2005; Lane et al., 2005; Mills et al., 1998). A paradox seems to underlie this experimental evidence: a dismantling yet functional actin cytoskeleton is needed for a successful execution phase.

The involvement of MLC phosphorylation in the regulation of actomyosin contraction during apoptosis is well established; however, the implication of MHCII in the apoptotic process is not. We show here, for the first time, a distinct contribution of MHCII isoforms A and B to the apoptotic process: MHCIIIB levels remained unchanged, whereas

those of MHCIIA decreased significantly during TNF $\alpha$  or TNF $\alpha$ +CHX treatment in TtT/GF cells, NIH 3T3 fibroblasts and embryonic fibroblasts. MHCIIA cleavage has already been recorded in TNF $\alpha$ +CHX-treated aortic endothelial cells (Suarez-Huerta et al., 2000a) and anti-Fas-treated Jurkat cells (Gerner et al., 2000; Kato et al., 2005). Surprisingly, MHCIIA cleavage products were either not recognized by the antibodies used (Suarez-Huerta et al., 2000a) or their recognition was due to a crossreactivity with another antibody (Kato et al., 2005). The two different MHCIIA antibodies used in the present study also failed to detect any MHCIIA fragment.

Since we found that MHCIIA has a faster turnover than MHCIIIB, low MHCIIA levels in TNF $\alpha$ +CHX-treated cells may be the result of the rapid disappearance of MHCIIA following protein synthesis inhibition. However, the same down regulation of MHCIIA but not of MHCIIIB was obtained in long-term TNF $\alpha$ -treated cells in which protein synthesis was not exogenously inhibited. In addition, MHCIIA possesses consensus sequences for caspase-3 proteolysis (Kato et al., 2005); therefore, by default, it will be broken down during the execution phase of the apoptotic process. In accordance with this, reduced MHCIIA levels in apoptotic cells were restored to control values by inhibition of caspase activity (Gerner et al., 2000; Suarez-Huerta et al., 2000a) (and this paper). Therefore, the experimental data indicates that the loss of MHCIIA and the conservation of MHCIIIB are specific events of the apoptotic process not a consequence of a different stability of the isoforms.

But why then is the isoform A lost but the isoform B retained? On the one hand, experimental evidence has demonstrated the need of actin contractile fibers for cell contraction and detachment during apoptosis. Our results suggest that there is a specific dismantling of actomyosin fibers made of MHCIIA during apoptosis. The observation of MHCIIA in late blebs together with the phosphorylated MLCs (Lane et al., 2005) agrees with this idea. On the other hand, MHCIIIB and actin were virtually not affected by TNF $\alpha$ . MHCIIIB was reported to bind to actin more slowly and weakly than MHCIIA (Bresnick,

1999; Kolega, 2003; Kolega, 2006). Thus, MHCIIA proteolysis could facilitate the access of MHCIIIB molecules to the actin fibers due to a lack of competition with MHCIIA. In support of this view is the report that MHCIIIB but not MHCIIIC is assembled into cytoplasmic stress fibers in the absence of MHCIIA (Bao et al., 2005). Therefore, MHCIIIB may be the main contributor to actomyosin fibers in apoptotic cells.

MHCIIA is responsible for the forward movement of the cell body during locomotion, whereas MHCIIIB is responsible for cell retraction and remains associated with stable stress fibers (Kolega, 2003). We have shown that increased association of myosin II with cortical actin participates in the rounding-up of cells (Vitale and Carbajal, 2004). Disposal of MHCIIA and maintenance of MHCIIIB in the apoptotic cells would shift the locomotion and/or contraction balance towards cell contraction. Our observation of a larger number of flat and adherent apoptotic MHCIIIB (-/-) fibroblasts than apoptotic wild-type fibroblasts during TNF $\alpha$  treatment, supports the view of a requirement of MHCIIIB for actomyosin fiber assembly necessary for cell contraction during apoptosis. The fact that COS-7 cells, which lack MHCIIA, contract and detach during apoptosis adds supports to the notion (Orlando et al., 2006). However, the removal of MHCIIA, and therefore, the disassembly of actin-MHCIIA fibers probably contribute to the dismantling of focal adhesions that is also required for detachment. Instability of MHCIIA affects focal adhesions (Dulyaninova et al., 2007).

The contribution of MHCII phosphorylation in the stability of myosin fibers has become increasingly manifest (Even-Faitelson and Ravid, 2006; Murakami et al., 2000; Straussman et al., 2001). Once again, the kinetics of the phosphorylation and the kinases involved differ for the A and B isoforms (Dulyaninova et al., 2007; Kolega, 1999; Redowicz, 2001). Among the several kinases that phosphorylate the MHCIIIs, the atypical PKC isoform  $\zeta$  is of particular significance because, on the one hand, this kinase interacts and phosphorylates MHCIIIB not MHCIIA (Even-Faitelson and Ravid, 2006) and, on the other hand, PKC $\zeta$  is itself a target of caspase-3 (Smith et al., 2003). PKC $\zeta$  activity is



stimulated by phosphorylation in Thr 410, and this phosphorylation normally occurs in serum cultured cells (Smith et al., 2003). However, full activation of the enzyme is achieved by the caspase-mediated cleavage that releases the C-terminal catalytic domain from the N-terminal autoinhibitory domain (Smith et al., 2000). Under our experimental conditions, only a small proportion of total PKC $\zeta$  was found cleaved by TNF $\alpha$ +CHX treatment. Nonetheless, because cleaved PKC $\zeta$  has a shorter half-life than that of the full length kinase (Smith et al., 2000; Smith et al., 2003), once the fragment is formed it is expected to be quickly degraded, hence reducing the intensity of the immunoreactive band.

Our findings that, (1) PKC $\zeta$  and MHCIIB physically interacted not only in control cells but in TNF $\alpha$ -treated cells as well, (2) TNF $\alpha$  induced the translocation of PKC $\zeta$  to the cytoskeleton and, (3) that cleaved PKC $\zeta$  was associated with the cytoskeleton fraction, provide strong support to the idea that MHCIIB is a target of PKC $\zeta$  during TNF $\alpha$ -induced apoptosis. Specific inhibition of PKC $\zeta$  did not induce cell death and did not affect TNF $\alpha$ -induced caspase-3 processing. However, PKC $\zeta$  inactivation blocked TNF $\alpha$ -induced retraction and detachment of TtT/GF cells and of wild-type embryonic fibroblasts, indicating that the activity of the kinase is necessary for actin cytoskeleton remodelling in apoptotic cells. The fact that TNF $\alpha$ -induced morphological responses were less affected by PKC $\zeta$  inhibition in MHCIIB (-/-) fibroblasts than in the cells expressing MHCIIB suggests that PKC $\zeta$ -MHCIIB interaction plays an important role in TNF $\alpha$ -induced cell contraction during apoptosis.

Besides MHCIIB contribution, our results confirm the implication of ROCK1-mediated MLC phosphorylation in cell contraction and detachment during the execution phase of apoptosis. Moreover, our findings extended previous observations by showing that cleaved-activated ROCK1 and phosphorylated MLC were both specifically associated with the cytoskeleton fraction. The results highlight the fact that TNF $\alpha$  induced the translocation of some cytoskeleton related proteins (such as MLC, ROCK1 and PKC $\zeta$ ) from the non-

cytoskeleton to the cytoskeleton fraction, and that this effect was independent of caspase activation.

Together, our results indicate that, during the execution phase of apoptosis, there is an increased detachment of actin fibers to the cell periphery (down regulation and/or cleavage of MHCIIA,  $\alpha$ -actinin and spectrin) accompanied by a reinforcement of the actin-MHCIIB contractile fibers (increased cytoskeleton association and/or activation of ROCK1, phosphorylated MLC, MHCIIB and actin). These results may explain the apparent paradox of a dismantling yet functional actin cytoskeleton.

## **I.5 Materials and methods**

### **Cell culture**

The folliculostellate cell line TtT/GF was obtained from Dr. U. Renner (Department of Endocrinology, Max Planck Institute of Psychiatry, Munich, Germany) and the MHCIIB-deficient, or MHCIIB (-/-), cells and control mouse embryonic fibroblasts were obtained from Dr. R.S. Adelstein (Laboratory of Molecular Cardiology, National Heart, Lung and Blood Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). All cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 5% of fetal bovine serum, 3.7 g/ml of NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM Hepes (pH 7.2), and antibiotics (penicillin 0.2 mg/ml and streptomycin 50 µg/ml) at 37°C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 95% air. The cells were cultured for 48 hours before subjected to different treatments.

### **Source of antibodies and chemicals**

Several myosin heavy chain antibodies were used in the present study: a rabbit polyclonal MHCIIA antibody raised against a synthetic peptide corresponding to amino acids 1950-1961 of human nonmuscle myosin heavy chain IIA and a rabbit polyclonal MHCIIB antibody raised against synthetic peptide corresponding to amino acid residues 1965-1976 of human nonmuscle myosin heavy chain IIB were obtained from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). Rabbit polyclonal anti-MHCIIA raised against the peptide GKADGAEAKPAE corresponding to the C-terminus of human nonmuscle myosin II heavy chain isoform A and rabbit polyclonal MHCIIB antibody generated against the peptide SDVNETQPPQSE corresponding to the C-terminus of nonmuscle myosin heavy chain isoform B were purchased from Convance (Berkeley, CA, USA). Mouse monoclonal nonmuscle chicken MHCIIB antibody (CMII 23) was developed by Drs G.W. Conrad and A.H Conrad (Division of Biology, Kansas State University, Manhattan, KS, USA) and was

obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank University of Iowa, Dept Biological Sciences developed under the auspices of the NICHD. Rabbit polyclonal anti-activated caspase-3, raised against a synthetic peptide corresponding to the cleavage site of human caspase-3 and that only recognizes the 17 kDa fragment of active caspase-3, mouse monoclonal anti-MLC, rabbit polyclonal anti-actin, HRP-conjugated anti-mouse IgM, Protein A Sepharose-4B, cycloheximide and actinomycin were purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). HRP-conjugated anti-mouse IgG, HRP-conjugated anti-goat IgG and HRP-conjugated anti-rabbit IgG antibodies were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA). Mouse monoclonal anti-ROCK1 was purchased from BD Biosciences (Mississauga, ON, Canada). Mouse monoclonal antibodies to  $\alpha$ -actinin, non-erythroid  $\alpha$ -spectrin and goat polyclonal anti-vimentin were from Chemicon International (Temecula, CA, USA). The rabbit anti-caspase-8 p20 (H-134), that detects both the precursor and the activated fragment, rabbit anti-PKC $\zeta$  (C-20) and goat anti-PKC $\zeta$  (N-17) were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Cleaved Caspase-3 (Asp175) (5A1) rabbit monoclonal antibody from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) detects endogenous levels of the large fragment (17/19 kDa) of activated caspase-3 resulting from cleavage adjacent to Asp175. This antibody does not recognize full length caspase-3 or other cleaved caspases. It was raised against a synthetic peptide corresponding to N-terminal residues adjacent to Asp175 of human caspase-3. Phospho-myosin light chain 2 (Ser19) antibody was also purchased from Cell Signaling Technology. The vybrant<sup>TM</sup> apoptosis assay kit #5 and rhodamine-phalloidin were purchased from Molecular Probes (Eugene, OR, USA). Human recombinant tumor TNF $\alpha$ , the Cell Death Detection ELISA<sup>plus</sup> and the chemiluminescence substrate Lumilight were purchased from Roche (Laval, QC, Canada). The ROCK inhibitor Y27632 and the caspase inhibitor Z-VAD-fmk were purchased from Calbiochem (San Diego, CA, USA). The specific PKC $\zeta$  inhibitor, myr-PKC $\zeta$  pseudosubstrate was from BioSource (Camarillo, CA, USA). Proteins in the samples were measured by the Bradford dye binding assay with materials provided by Bio Rad (BioRad, Mississauga, ON, Canada).

### **Morphological analysis**

Cells were treated with different compounds according to the specific protocol. The morphology of adherent control and treated cells was evaluated with an inverted microscope (Leica DMRIB, Wetzlar, Germany); the images were acquired with a Retiga Ex-I camera (Q-Imaging, Burnaby, Canada) and treated with the Northern Eclipse v6 program (Empix Imaging, Mississauga, Canada). Morphological analysis of detached cells, particularly the presence of membrane blebbing, was carried out with a Zeiss Axio-Imager Z1 microscope (Zeiss, Jena, Germany). Pictures were taken with a Zeiss HrM camera (Zeiss, Jena, Germany) and processed with the Axio-Vision v 4.5 program (Zeiss, Jena, Germany).

### **Fluorescence microscopy**

The cells were grown on glass coverslips and incubated with different compounds according to the specific protocol. Next, the cells were fixed with 3.7% formaldehyde and permeabilized with 0.5% Triton-X100 in phosphate buffered saline (PBS: 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4). The cells were blocked with 5% skim milk in PBS. Cells were double labelled with rhodamine-phalloidin (1:900 dilution) to show F-actin distribution and with an active caspase-3 antibody that only recognizes the 17 kDa active caspase-3 fragment to mark apoptotic cells. Next, the cells were incubated with anti-rabbit-IgG-FITC. Coverslips were mounted in PBS:glycerol (1:1) containing 5% 1,4 diazabiscyclo (2,2,2) octane (DABCO). Cells were viewed with a Carl Zeiss Axiophot II fluorescence microscope (Zeiss, Jena, Germany). Pictured were acquired using Northern Eclipse program.

## **Quantification of Apoptosis**

### *Chromatin condensation*

We used the vybrant™ apoptosis assay kit #5 which detects the compacted state of the chromatin in apoptotic cells using Hoechst 33342 and propidium iodide. Hoechst 33342 is a DNA stain that possesses a blue fluorescence and more particularly bright in the condensed nuclei of apoptotic cells. Propidium iodide which is a DNA stain presenting a red fluorescence, only enters cells with compromised plasma membranes. Briefly, following treatments, the cells were rinsed in PBS and incubated with a mixture of the dyes. Next, the cells were washed and fixed in 3.7% formaldehyde and observed with a Carl Zeiss Axiophot II fluorescence microscope. Nuclei of viable cells show a low level of blue fluorescence, apoptotic cells show a high level of blue fluorescence and necrotic cells show both blue and red fluorescence. The same procedure was applied to detached cells harvested in the culture medium. We did not observe necrotic cells under our experimental conditions.

### *Cytoplasmic nucleosome release*

The Cell Death Detection ELISA<sup>plus</sup>, a photometric enzyme-immunoassay that detects cytoplasmic histone-associated-DNA fragments (mono and oligonucleosomes) was used. In short, after treatments, the cells were scraped off and recovered by centrifugation. The pellet was incubated with the lysis buffer. Twenty µl of cell lysate were transferred into streptavidin coated microplates, and incubated with a mixture of anti-histone-biotin and anti-DNA-peroxidase (POD) antibodies for two hours. After the removal of unbound antibodies, nucleosomes were photometrically detected by measuring POD activity with ABTS (2,2-Azino-di[3-ethyl-benz-thiazolin-sulfonat]) as substrate. The absorbance corresponds to the enrichment of mono and oligonucleosomes released in the cytoplasm in each experimental condition.

### *Counting of detached cells*

Following treatments the detached cells were recovered from the medium bathing the cultures and cell counting was performed with a hemocytometer.

### *Counting of active caspase3 positive cells*

Cells cultured on glass coverslips were subjected to TNF $\alpha$ +CHX treatment for increasing periods of time. At the end of each incubation period the cells were processed for immunofluorescence microscopy with active caspase-3 antibody and rhodamine-phalloidin. Cells in the preparations were visualized under a fluorescence microscope and the number of a) total, b) active caspase-3 positive, and c) flat, active caspase-3-positive cells was recorded. More than 300 cells were counted for each experimental condition.

### **Preparation of subcellular fractions**

Following treatments, the cells were rinsed with cold PBS, scraped off and collected by centrifugation at 600 rpm (Beckman GS-6R, Beckman Canada, Mississauga, ON, Canada). Cells were resuspended and sonicated in PBS containing phosphatase and protease inhibitors (1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 2  $\mu$ g/ml leupeptin, 2  $\mu$ g/ml aprotinin, 4 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 80 mM NaF, 20 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> and 10  $\mu$ M bpV(phen)). The total-cell homogenate was centrifuged to remove the nuclei and cell debris. After centrifugation, the supernatant was incubated with 1% Triton X-100 (final concentration) in PBS containing phosphatase and protease inhibitors for 30 minutes at room temperature followed by a centrifugation at 15,000 x g (Beckman microfuge E, Beckman Canada, Mississauga, ON, Canada). The pellet was considered the cytoskeleton-enriched fraction and the supernatant the non-cytoskeleton-enriched fraction. The cytoskeleton fractions were dissolved in Ripa buffer (150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% DOC, 0.1% SDS, 50 mM Tris, pH 8). The characterization of subcellular fractions was be done elsewhere (Zheng et al., 2005).

### **Electrophoresis and immunoblotting**

Five-ten  $\mu\text{g}$  of sample proteins were loaded onto 8-12 % polyacrylamide gels. After electrophoresis, the proteins were transferred onto nitrocellulose membranes. Membranes were quickly stained with Ponceau red to ensure equal loading, rinsed and blocked in TBS containing 5% milk and 0.1% Tween for 1 hour at room temperature. Membranes were incubated with the first antibody in TBS-5% milk-0.1% Tween followed by incubation with the corresponding second antibody coupled to horseradish peroxidase. The antigen-antibody reactions were revealed by chemiluminescence. Bands on the films were scanned and the intensity of the bands was quantified by using the Scion Image Program (Scion Corporation, MD, USA).

### **Co-immunoprecipitation studies**

Co-immunoprecipitation studies were performed essentially as described before (Meilleur et al., 2007). Briefly, following treatments, the cells were washed with cold PBS, scraped and collected by centrifugation at 600 rpm (Beckman GS-6R). Cells were incubated with lysis buffer (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH.7.4), 1% NP-40, 100  $\mu\text{M}$  PMSF, 5mg/ml leupeptin, 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  aprotinin, 10  $\mu\text{M}$  bpV(pfen)) for 1 hour at 4°C. The cell lysate was centrifuged for 15 minutes at 15,000 x g, and 1 ml of supernatant was incubated with 100  $\mu\text{l}$  of protein A Sepharose bead slurry (50%) at 4°C for 10 minutes on a rocker to pre-clear the cell lysate. Protein A Sepharose beads were removed by centrifugation at 15,000 x g at 4°C for 10 minutes. Protein concentration in the pre-cleared lysates was determined by the method of Bradford. Pre-cleared supernatants (1 mg protein) were incubated with 100  $\mu\text{l}$  of protein A Sepharose beads pre-incubated with either goat or rabbit anti-PKC $\zeta$  antibody or anti-MHCIIB at 4°C overnight on a rocker. Beads were rinsed several times in lysis buffer, and were finally resuspended in 60  $\mu\text{l}$  electrophoresis sample buffer 3x and boiled for 5



minutes. After centrifugation at 15,000 x g at 4°C, the supernatant were subjected to SDS-PAGE. After electrophoresis and transfer, the membranes were incubated with anti-MHCIIB or with anti-PKC $\zeta$ . Controls for the immunoprecipitation studies included incubation of the protein lysate with Protein A-Sepharose 4B beads not pre-incubated with the PKC $\zeta$  or MHCIIB antibodies, the use of two different PKC $\zeta$  antibodies to co-immunoprecipitate MHCIIB and the use of an antibody that did not pull down PKC $\zeta$  or MHCIIB such as anti-vimentin.

## **I.6 Acknowledgments**

We thankfully acknowledge the generous gift of the TtT/GF cell line from Dr. U. Renner (Max-Plank Institute of Psychiatry, Germany) and of the MHCIIB (-/-) and control mouse embryonic fibroblasts to Dr. R.S. Adelstein (Laboratory of Molecular Cardiology, National Heart, Lung and Blood Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). We are grateful to the Developmental Studies Hybridoma Bank from the University of Iowa, Department of Biological Sciences for providing us with the antibody CMII 23 against MHCIIB. We express our sincere gratitude to Dr. R.-Marc Pelletier for his editorial assistance and helpful comments. The technical assistance of Mr. C. Charbonneau for the microscopy studies is very much appreciated. This work was funded by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada to MLV. MLV is supported by a scholarship from Fonds de la recherche en santé du Québec.

## I.7 References

- Allaerts, W. and Vankelecom, H. (2005). History and perspectives of pituitary folliculo-stellate cell research. *Eur. J. Endocrinol.* 153, 1-12.
- Amano, M., Ito, M., Kimura, K., Fukata, Y., Chihara, K., Nakano, T., Matsuura, Y. and Kaibuchi, K. (1996). Phosphorylation and activation of myosin by rho-association of myosin by rho-associated kinase (Rho-kinase). *J. Biol. Chem.* 271, 20246-20249.
- Bao, J., Jana, S. S. and Adelstein, R. S. (2005). Vertebrate nonmuscle myosin II isoforms rescue small interfering RNA-induced defects in COS-7 cell cytokinesis. *J. Biol. Chem.* 280, 19594-19599.
- Baud, V. and Karin, M. (2001). Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *TICB* 11, 372-377.
- Boivin, P., Galand, C. and Dhermy, D. (1990). *In vitro* digestion of spectrin, protein 4.1 and ankyrin by erythrocyte calcium dependent neutral protease (Calpain I). *Int. J. Biochem.* 22, 1479-1489.
- Brancolini, C., Lazarevic, D., Rodriguez, J. and Schneider, C. (1997). Dismantling cell-cell contacts during apoptosis is coupled to a caspase-dependent proteolytic cleavage of  $\beta$ -catenin. *J. Cell Biol.* 139, 759-771.
- Bresnick, A. R. (1999). Molecular mechanisms of nonmuscle myosin-II regulation. *Current Opinion in Cell Biology* 11, 26-33.
- Chen, Y.-R., Kori, R., John, B. and Tan, T.-H. (2001). Caspase-mediated cleavage of actin-binding and SH3-domain-containing proteins, cortactin, HS1, and HIP-55 during apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 288, 981-989.
- Coleman, M. L. and Olson, M. F. (2002). Rho GTPase signalling pathways in the morphological changes associated with apoptosis. *Cell Death Differ.* 9, 493-504.
- Coleman, M. L., Sahai, E. A., Yeo, M., Bosch, M., Dewart, A. and Olson, M. F. (2001). Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nature Cell Biol.* 3, 339-345.
- Croft, D. R., Coleman, M. L., Li, S., Robertson, D., Sullivan, T., Steward, C. L. and Olson, M. F. (2005). Actin-myosin-based contraction is responsible for apoptotic nuclear disintegration. *J. Cell Biol.* 168, 245-255.
- Dulyaninova, N. G., House, R. P., Betapudi, v. and Bresnick, A. R. (2007). Myosin-IIA heavy-chain phosphorylation regulates the motility of MDA-MB-231 carcinoma cells. *Mol. Biol. Cell* 18, 3144-3155.

- Earnshaw, W. C. (1995). Nuclear changes in apoptosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5, 337-3343.
- Even-Faitelson, L. and Ravid, S. (2006). PAK1 and aPKC $\zeta$  regulate myosin II-B phosphorylation: a novel signaling pathway regulating filament assembly. *Mol. Biol. Cell* 17, 2869-2881.
- Fortin, M.-E., Pelletier, R.-M., Meilleur, M.-A. and Vitale, M. L. (2006). Modulation of GJA1 turnover and intercellular communication by pro-inflammatory cytokines in the anterior pituitary folliculo-stellate cell line TtT/GF. *Biol. Reprod.* 74, 2-12.
- Gallagher, P. J., Herring, B. P. and Stull, J. T. (1997). Myosin light chain kinases. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 18, 1-16.
- Gerner, C., Fröhwein, U., Gotzmann, J., Bayer, E., Gelbmann, D., Bursch, W. and Schulte-Hermann, R. (2000). The Fas-induced apoptosis analyzed by high throughput proteome analysis. *J. Biol. Chem.* 275, 39018-39026.
- Golomb, E., Ma, X., Jana, S. S., Preston, Y. A., Kawamoto, S., Shoham, N. G., Goldin, E., Conti, M. A., Sellers, J. R. and Adelstein, R. S. (2004). Identification and characterization of nonmuscle myosin II-C, a new member of the myosin II family. *J. Biol. Chem.* 279, 2800-2808.
- Inoue, K., Matsumoto, H., Koyama, C. and Shibata, K. (1992). Establishment of a folliculo-stellate like cell line from a murine thyrotropic pituitary tumor. *Endocrinology* 131, 3110-3116.
- Jänicke, R. U., Ng, P., Sprengart, M. L. and Porter, A. G. (1998). Caspase-3 required for  $\alpha$ -fodrin cleavage but dispensable for cleavage of other death substrates in apoptosis. *J. Biol. Chem.* 273, 15540-15545.
- Kato, M., Fukuda, H., Nonaka, T. and Imajob-Ohmi, S. (2005). Cleavage of nonmuscle myosin heavy chain-A during apoptosis in human Jurkat T cells. *J. Biochem.* 137, 157-166.
- Kawamoto, S. and Adelstein, R. S. (1991). Chicken nonmuscle myosin heavy chains: Differential expression of two mRNA and evidence for two different polypeptides. *J. Cell Biol.* 112, 915-924.
- Kelley, C. W., Sellers, J. R., Gard, D. L., Bui, D., Adelstein, R. S. and Baines, I. C. (1996). Xenopus nonmuscle myosin heavy chain isoforms have different subcellular localizations and enzymatic activities. *J. Cell Biol.* 134, 675-687.
- Kimura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., Yamamori, B., Feng, J., Nakano, T., Okawa, K. et al. (1996). Regulation of myosin phosphatase by rho and rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* 273, 245-248.
- Kobayashi, H., Fukata, J., Murakami, N., Usui, T., Ebisui, O., Muro, S., Hanaoka, K., Imura, H. and Nakao, K. (1997). Tumor necrosis factor receptors in the pituitary cells. *Brain Res.* 758, 45-50.

Kolega, J. (1999). Turnover rates at regulatory phosphorylation sites on myosin II in endothelial cells. *J. Cell. Biochem.* 75, 629-639.

Kolega, J. (2003). Asymmetric distribution of myosin IIB in migrating endothelial cells is regulated by a rho-dependent kinase and contributes to tail retraction. *Mol. Biol. Cell* 14, 4745-4757.

Kolega, J. (2006). The role of myosin II motor activity in distributing myosin asymmetrically and coupling protrusive activity to cell translocation. *Mol. Biol. Cell* 17, 4435-4445.

Kook, S., Kim, d. H., Shim, S. R., Kim, W., Chun, J.-S. and Song, W. K. (2003). Caspase-dependent cleavage of tensin induces disruption of actin cytoskeleton during apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 303, 37-45.

Korn, E. D. (2000). Co-evolution of head, neck and tail domains of myosin heavy chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 97, 12559-12564.

Lane, J. D., Allan, V. J. and Woodman, P. G. (2005). Active relocation of chromatin and endoplasmic reticulum into blebs in late apoptotic cells. *J. Cell Sci.* 118, 4059-4071.

Leong, K. G. and Kaplan, A. (2000). Signaling pathways mediated by tumor necrosis factor alpha. *Histol. Histopathol.* 15, 1303-1325.

Lo, C.-M., Buxton, D. B., Chua, G. C. H., Dembo, M., Adelstein, R. S. and Wang, Y. L. (2004). Nonmuscle myosin IIB is involved in the guidance of fibroblast migration. *Mol. Biol. Cell* 15, 982-989.

Maekawa, M., Ishizaki, T., Boku, S., Watanabe, N., Fujita, A., Iwamatsu, A., Obinata, T., Ohashi, K., Mizuno, K. and Narumiya, S. (1999). Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science* 285, 895-898.

Meilleur, M.-A., Akpovi, C. D., Pelletier, R.-M. and Vitale, M. L. (2007). TNF- $\alpha$ -induced anterior pituitary folliculostellate TtT/GF cell uncoupling is mediated by connexin 43 dephosphorylation. *Endocrinology* 148, 5913-5924.

Mills, J. C., Stone, N. L., Erhardt, J. and Pittman, R. N. (1998). Apoptotic membrane blebbing is regulated by myosin light chain phosphorylation. *J. Cell Biol.* 140, 627-636.

Mills, J. C., Stone, N. L. and Pittman, R. N. (1999). Extranuclear apoptosis: the role of the cytoplasm in the execution phase. *J. Cell Biol.* 146, 703-707.

Murakami, N., Kotula, L. and Hwang, Y.-W. (2000). The distinct mechanisms for regulation of nonmuscle myosin assembly via the heavy chain: phosphorylation for MIIIB and Mts binding for MIIA. *Biochemistry* 39, 11441-11451.

Noda, M., Fukasawa-Yasuda, C., Moriishi, K., Kato, T., Okuda, T., Kurokawa, K. and Takuwa, Y. (1995). Involvement of rho in GTP $\gamma$ S-induced enhancement of phosphorylation of 20kDa myosin light chain in vascular smooth cells: inhibition of phosphatase activity. *FEBS Lett.* 367, 246-250.

Orlando, K. A., Stone, N. L. and Pittman, R. N. (2006). Rho kinase regulates fragmentation and phagocytosis of apoptotic cells. *Exp. Cell Res.* 312, 5-15.

Redowicz, M. J. (2001). Regulation of nonmuscle myosins by heavy chain phosphorylation. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 22, 163-173.

Sellers, J. R. and Goodson, H. V. (1995). Motor proteins 2: myosin. *Protein Profile* 2, 1323-1423.

Smith, L., Chen, L., Reylands, M. E., DeVries, T. A., Talanian, R. V., Omura, S. and Smith, J. B. (2000). Activation of atypical protein kinase C  $\zeta$  by caspase processing and degradation by the ubiquitin-proteasome system. *J. Biol. Chem.* 275, 40620-40627.

Smith, L., Wang, Z. and Smith, J. B. (2003). Caspase processing activates atypical protein kinase-  $\zeta$  by relieving autoinhibition and destabilizes the protein. *Biochem. J.* 375, 663-671.

Song, Y., Hoang, B. Q. and Chang, D. D. (2002). Rock-II-induced membrane blebbing and chromatin condensation require actin cytoskeleton. *Exp. Cell Res.* 278, 45-52.

Straussman, R., Even, L. and Ravid, S. (2001). Myosin II heavy chain isoforms are phosphorylated in an EGF-dependent manner: involvement of protein kinase C. *J. Cell Sci.* 114, 3047-3057.

Suarez-Huerta, N., Lecocq, R., Mosselmans, R., Galand, P., Dumont, J. E. and Robaye, B. (2000a). Myosin heavy chain degradation during apoptosis in endothelial cells. *Cell Proliferation* 33, 101-114.

Suarez-Huerta, N., Mosselmans, R., Dumont, J. E. and Robaye, B. (2000b). Actin depolymerization and polymerization are required during apoptosis in endothelial cells. *J. Cell Physiol.* 184, 239-245.

Swales, N. T., Colegrave, M., Knight, P. and Peckham, M. (2006). Non-muscle myosins 2A and 2B drive changes in cell morphology that occur as myoblasts align and fuse. *J. Cell Sci.* 119, 3570.

Takahashi, M., Kawamoto, S. and Adelstein, R. S. (1992). Evidence for inserted sequences in the head region of nonmuscle myosin specific to the nervous system. Cloning of the cDNA encoding the myosin heavy chain-B isoform of vertebrate nonmuscle myosin. *J. Biol. Chem.* 267, 17864-17861.

Togo, T. and Steinhardt, R. A. (2004). Nonmuscle myosin IIA and IIB have distinct functions in the exocytosis-dependent process of cell membrane repair. *Mol. Biol. Cell* 15, 688-695.

Tullio, A. N., Accili, D., Ferran, V. J., Yu, Z.-X., Takeda, K., Grinberg, A., Westphal, H., Preston, Y. A. and Adelstein, R. S. (1997). Nonmuscle myosin II-B is required for normal development of the heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 94, 12412.

Vicente-Manzanares, M., Zareno, J., Whitmore, L., Choi, C. K. and Horwitz, A. F. (2007). Regulation of protrusion, adhesion dynamics, and polarity by myosins IIA and IIB in migrating cells. *J. Cell Biol.* 176, 573-580.

Vitale, M. L. and Carbajal, M. E. (2004). Involvement of myosin II in dopamine-induced reorganization of the lactotroph cell's actin cytoskeleton. *J. Histochem. Cytochem.* 52, 517-527.

Wei, Q. and Adelstein, R. S. (2000). Conditional expression of a truncated fragment of nonmuscle myosin II-A alters cell shape but not cytokinesis in HeLa cells. *Mol. Biol. Cell* 11, 3617-3627.

Wilson, J. R., Ludowyke, R. I. and Biden, T. J. (2001). A redistribution of actin and myosin IIA accompanies Ca-dependent insulin secretion. *FEBS Lett.* 492, 101-106.

Wylie, S. R. and Chantler, P. D. (2001). Separate but linked functions of conventional myosins modulate adhesion and neurite outgrowth. *Nature Cell Biol.* 3, 88-92.

Wylie, S. R. and Chantler, P. D. (2003). Myosin II A drives neurite retraction. *Mol. Biol. Cell* 14, 4654-4666.

Zheng, G. F., Solinet, S., Pelletier, R.-M. and Vitale, M. L. (2005). Actin cytoskeleton remodelling in the anterior pituitary folliculo-stellate cell line TtT/GF: Implication of the actin-binding protein cortactin. *J. Mol. Histol.* 36, 461-474.

## I.8 Figures and legends

**Figure 1.** TtT/GF cell apoptosis following long-term treatment with TNF $\alpha$ . Page 121.

**Figure 2.** Effect of long-term TNF $\alpha$  treatment on MLC phosphorylation state in TtT/GF cells. Page 124.

**Figure 3.** TNF $\alpha$  treatment decreased MHCIIA levels but did not affect MHCIIB levels. Page 126.

**Figure 4.** Effect of TNF $\alpha$ +CHX treatment on MHCIIA and MHCIIB levels in wildtype and MHCIIB (-/-) embryonic fibroblasts. Page 128.

**Figure 5.** Time course studies on the effect of TNF $\alpha$ +CHX treatment on caspase-3 activation and MHCIIA degradation in wild-type and MHCIIB (-/-) embryonic fibroblasts. Page 130.

**Figure 6.** Differential morphological responses of wild-type and MHCIIB (-/-) embryonic fibroblasts during TNF $\alpha$ +CHX-induced apoptosis. Page 132.

**Figure 7.** Fluorescence microscopy of F-actin distribution and caspase-3 activation in control and TNF $\alpha$ +CHX-treated TtT/GF cells, and wild-type and MHCIIB (-/-) embryonic fibroblasts. Page 134.

**Figure 8.** Effect of TNF $\alpha$ +CHX on PKC $\zeta$  cleavage. Page 136.

**Figure 9.** Co-immunoprecipitation studies on the effect of TNF $\alpha$ +CHX on PKC $\zeta$ -MHCIIB interaction. Page 138.

**Figure 10.** Effect of PKC $\zeta$  inhibition on TNF $\alpha$ +CHX-induced cell shrinkage and detachment. Page 140.



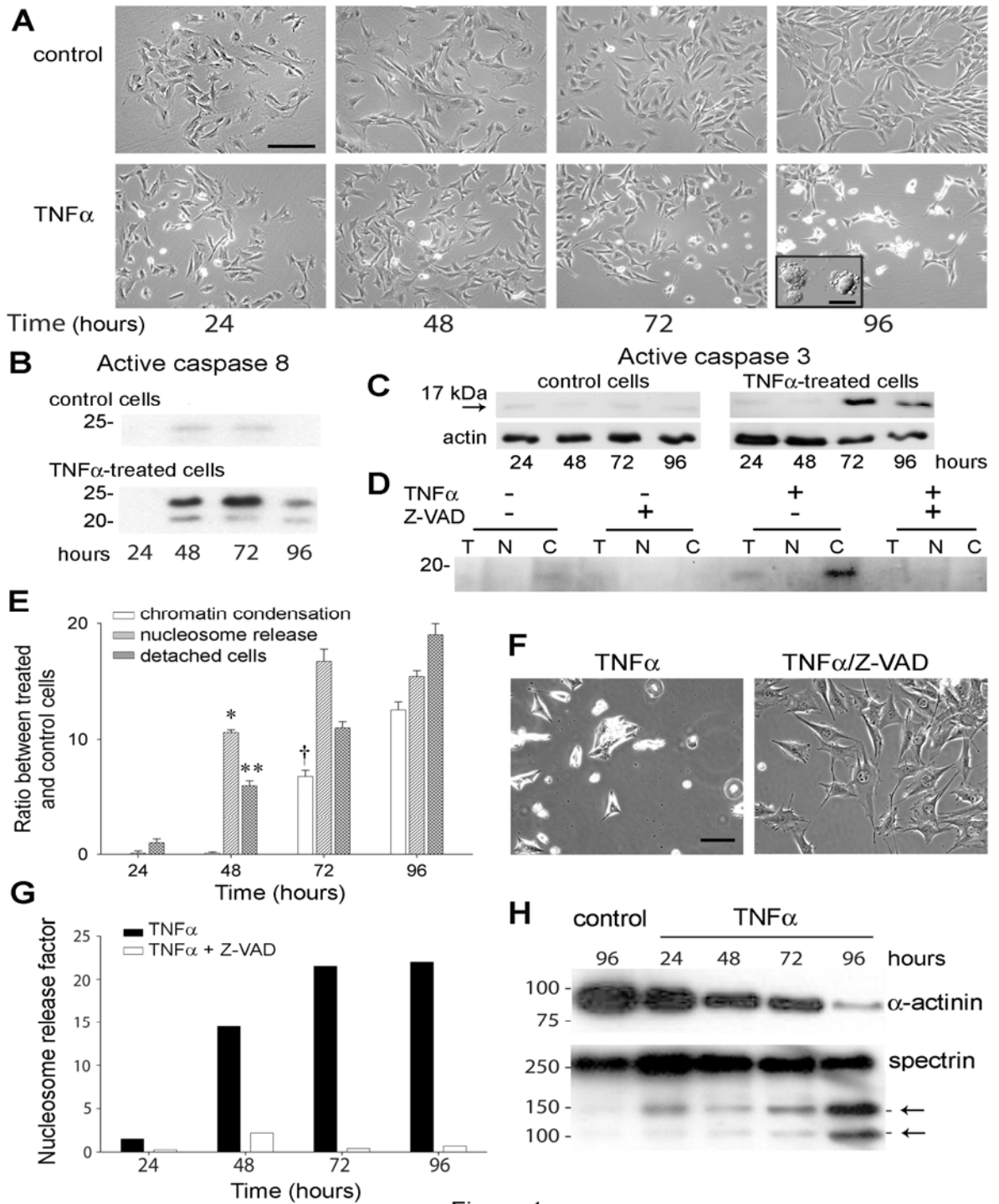


Figure 1

**Figure 1. TtT/GF cell apoptosis following long-term treatment with TNF $\alpha$ .**

TtT/GF cells were incubated with culture medium alone (control) or containing 20 ng/ml TNF $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) for increasing periods of time. **A)** The phase-contrast micrographs show control TtT/GF cells with a typical morphology of spreading cells with abundant filopodia and lamellipodia. After 48-96 hours in culture, the cells acquired elongated shapes and lamellipodia became less abundant. Following TNF $\alpha$  treatment, the cells progressively lost the membrane extensions, they shrunk and detached. Scale bar: 250  $\mu$ m. Inset: Differential interference contrast microscopy shows membrane blebbings of detached cells that had been treated with TNF $\alpha$  for 96 hours. Scale bar: 25  $\mu$ m. **B)** Representative Western blots demonstrating the absence and the presence of active caspase 8 in total-cell lysates from control and TNF $\alpha$ -treated cells respectively. **C)** Following treatments, total-cell lysates were obtained and subjected to electrophoresis and western blotting with an antibody that exclusively recognizes the active caspase-3 fragment and with anti-actin (loading control). The representative western blots show a 17 kDa band corresponding to the active caspase-3 in cells that had been treated with TNF $\alpha$  for 72 hours and 96 hours, but not in control TtT/GF cells. **D)** TtT/GF cells were incubated with either normal culture medium or culture medium containing TNF $\alpha$  (20 ng/ml) both in the absence or in the presence of the caspase inhibitor Z-VAD-fmk (5  $\mu$ M, final concentration) for 96 hours. Following treatments, total-cell lysates (T), non-cytoskeleton (N) and cytoskeleton (C) fractions were obtained and subjected to electrophoresis and western blotting with an anti-active caspase-3. Cleaved caspase-3 was recovered in the cytoskeleton fraction and the cleavage was blocked by Z-VAD-fmk. **E)** Time-course studies showing the increased chromatin condensation ( $\dagger$   $P < 0.001$ : 72 hours vs 48 hours), nucleosome release ( $*$   $P < 0.0001$ : 48 hours vs 24 hours) and cell detachment ( $**$   $P < 0.0002$ : 48 hours vs 24 hours) in TNF $\alpha$ -treated TtT/GF cells. Chromatin condensation in apoptotic cells was evaluated by labelling the cells with Hoechst 33342 and propidium iodide. Nucleosome release was measured by quantifying cytoplasmic histone-associated-DNA fragments (mono and

oligonucleosomes). Cell detachment was quantified by counting detached cells with a hemocytometer. **F)** Data from three independent experiments are expressed as the ratio of treated to control cells  $\pm$  s.e.m. TNF $\alpha$ -induced cell shrinkage and detachment (scale bar: 50  $\mu$ m) and nucleosome release **G)** were blocked by the caspase inhibitor Z-VAD-fmk. **H)** After incubation with medium alone (control) or containing TNF $\alpha$  for increasing periods of time, total-cell lysates were subjected to electrophoresis and western blotting with  $\alpha$ -actinin and spectrin antibodies. The representative western blot shows  $\alpha$ -actinin down regulation and spectrin cleavage into two fragments of 120 kDa and 150 kDa of molecular mass, respectively (arrows) in TNF $\alpha$ -treated cells.

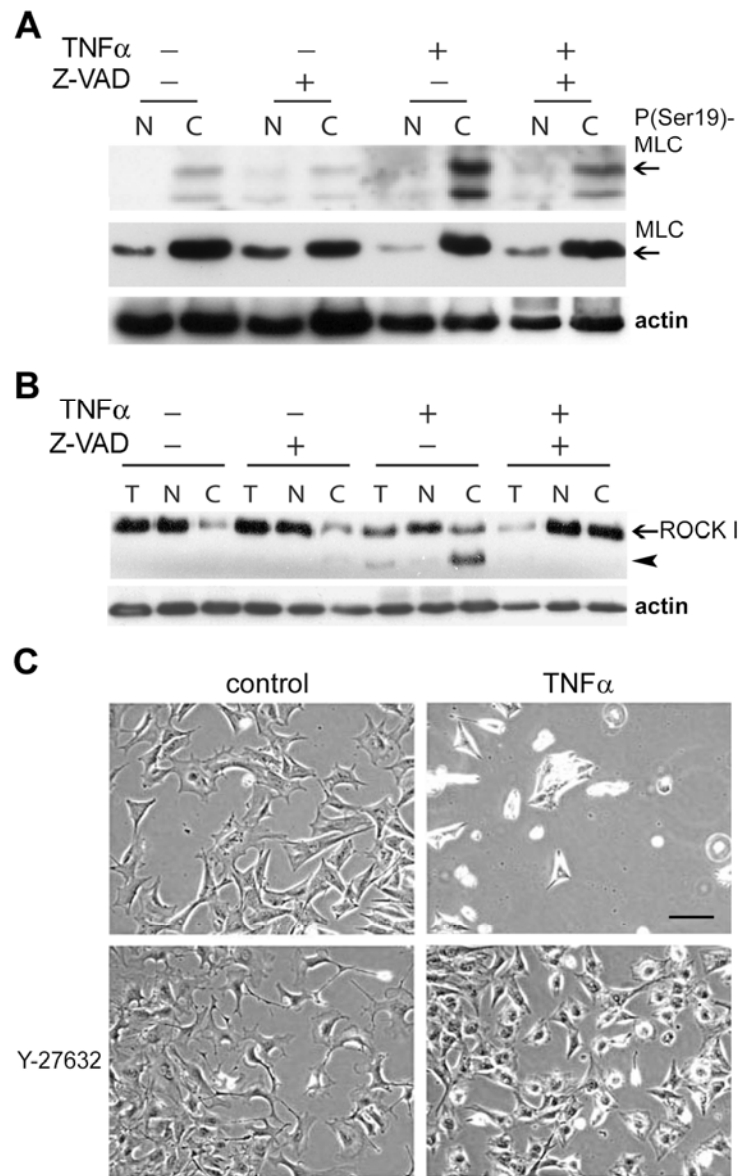


Figure 2

**Figure 2. Effect of long-term TNF $\alpha$  treatment on MLC phosphorylation state in TtT/GF cells.**

TtT/GF cells were incubated with medium alone or with medium containing 20 ng/ml TNF $\alpha$  for 96 hours. Following the treatments, the cells were scraped off and total-cell lysate (T), non-cytoskeleton (N) and cytoskeleton (C) fractions were prepared and subjected to electrophoresis and western blotting with different antibodies. **A)** Specific antibody MLC phosphorylated at Ser19 [labelled P-(Ser19)-MLC] detected phosphorylated MLC in the cytoskeleton-enriched (C) fraction of control and treated cells. TNF $\alpha$  increased MLC-Ser19-P levels. The increase was blocked by the caspase inhibitor Z-VAD-fmk. The same membrane was stripped and reprobed for MLC. Most MLC (arrow) was recovered in the cytoskeleton fraction. Cytoskeleton-associated MLC was slightly increased by TNF $\alpha$ , whereas non-cytoskeleton-associated MLC decreased in TNF $\alpha$ -treated cells. The decrease was partly abolished by the caspase inhibitor Z-VAD-fmk. The actin immunoreactive bands correspond to the loading controls. **B)** Incubation of TtT/GF cells with TNF $\alpha$  for 96 hours induced ROCK1 cleavage and translocation to the cytoskeleton fraction of the full-length enzyme. Cleaved, active ROCK1 was recovered in the cytoskeleton-enriched fraction (arrowhead). The caspase inhibitor Z-VAD-fmk blocked TNF $\alpha$ -induced ROCK1 cleavage. The actin immunoreactive bands correspond to the loading controls. **C)** Representative phase contrast micrographs of TtT/GF cells incubated with culture medium alone or with medium containing TNF $\alpha$  both in the absence (control) or presence of ROCK inhibitor Y-27632 (5 $\mu$ M). ROCK1 inhibition in control cells caused cell-body retraction and increased lamellipodia and cellular processes. TNF $\alpha$ -induced cell shrinkage and detachment were abolished by Y-27632. Scale bar: 100  $\mu$ m.

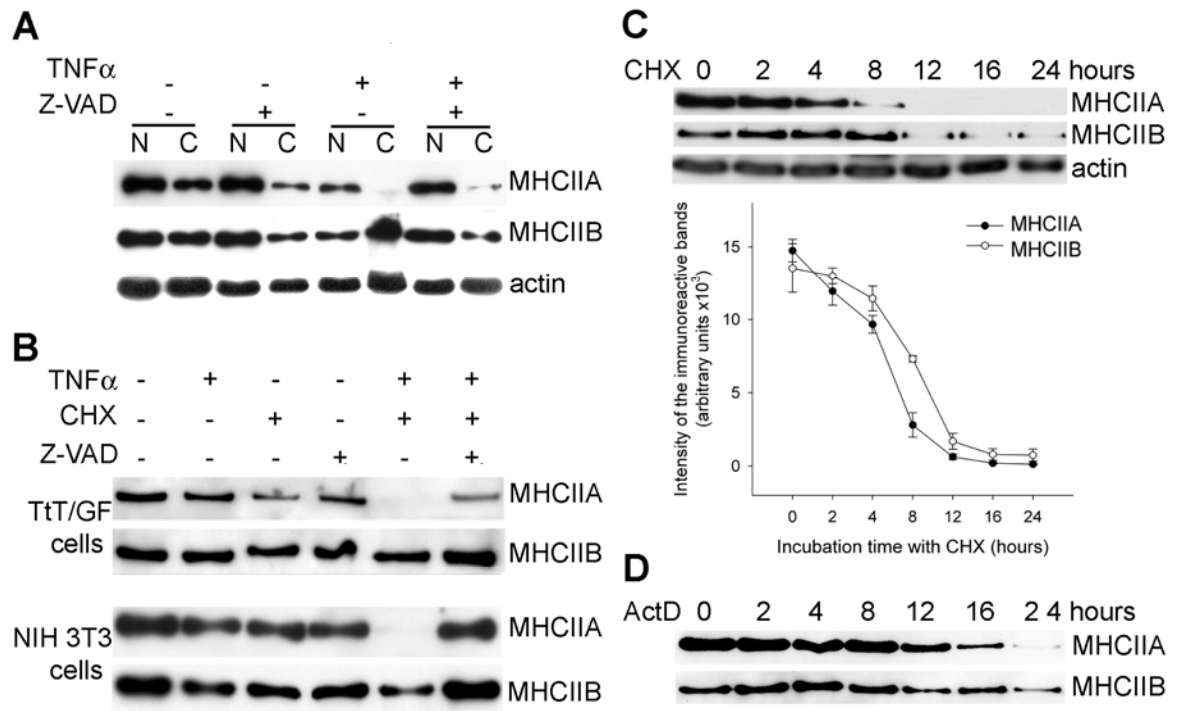


Figure 3

**Figure 3. TNF $\alpha$  treatment decreased MHCIIA levels but did not affect MHCIIIB levels.** **A)** TtT/GF cells were treated with culture medium alone or with medium containing 20 ng/ml TNF $\alpha$  both in the absence or in the presence of 5  $\mu$ M Z-VAD-fmk for 96 hours. Next, non-cytoskeleton (N) and cytoskeleton (C) fractions were obtained and subjected to electrophoresis and western blotting with antibodies against MHCIIA. The membrane was then stripped and reprobbed with anti-MHCIIIB. The actin immunoreactive bands correspond to the loading control. Z-VAD-fmk slightly decreased MHCIIA levels in the cytoskeleton fraction. TNF $\alpha$  reduced MHCIIA levels in both subcellular fractions. Inhibition of caspase activity restored control non-cytoskeleton MHCIIA levels but the recovery was not complete in the cytoskeleton fraction. MHCIIIB levels in the cytoskeleton fraction were slightly decreased by Z-VAD-fmk but were not affected by TNF $\alpha$ . **B)** TtT/GF and NIH 3T3 cells were treated with different combinations of TNF $\alpha$  (20 ng/ml), cycloheximide (CHX, 5  $\mu$ g/ml) and Z-VAD-fmk (5  $\mu$ M). Following a 24-hour treatment, MHCIIA and MHCIIIB expression levels were analyzed by western blotting in whole-cell lysates. Short-term incubation of the two cell lines with TNF $\alpha$  in combination with CHX drastically reduced MHCIIA, whereas MHCIIIB expression remained almost unchanged in TtT/GF cells and was slightly reduced in NIH 3T3 fibroblasts. The TNF $\alpha$ +CHX-induced drop of MHCIIA levels was abolished by the caspase inhibitor Z-VAD-fmk in both cell lines. **C)** TtT/GF cells were incubated with the protein synthesis inhibitor cycloheximide (CHX, 50  $\mu$ g/ml) for increasing periods of time. Following treatments, total cell proteins were subjected to SDS-PAGE followed by immunoblotting with anti-MHCIIA. Next, the membrane was stripped and incubated with anti-MHCIIIB. The actin immunoreactive bands correspond to the loading control. The figure shows representative immunoblots. The bands were scanned and the mean intensity values for each myosin isoform were plotted. Values shown are the mean  $\pm$  s.e.m. of three independent experiments. **D)** TtT/GF cells were incubated with the translation inhibitor actinomycin D (ActD, 1  $\mu$ g/ml) for increasing periods of time. Blockade of protein or mRNA synthesis affected MHCIIA more rapidly than MHCIIIB.

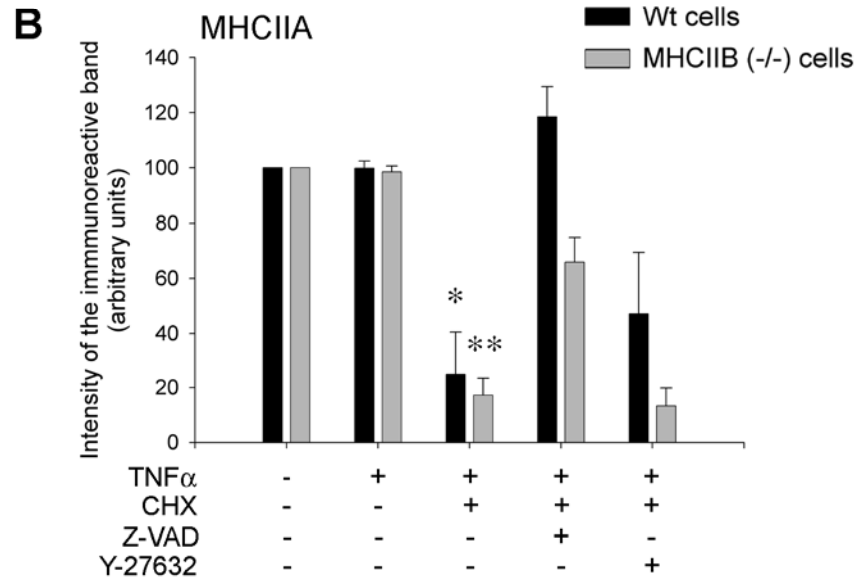
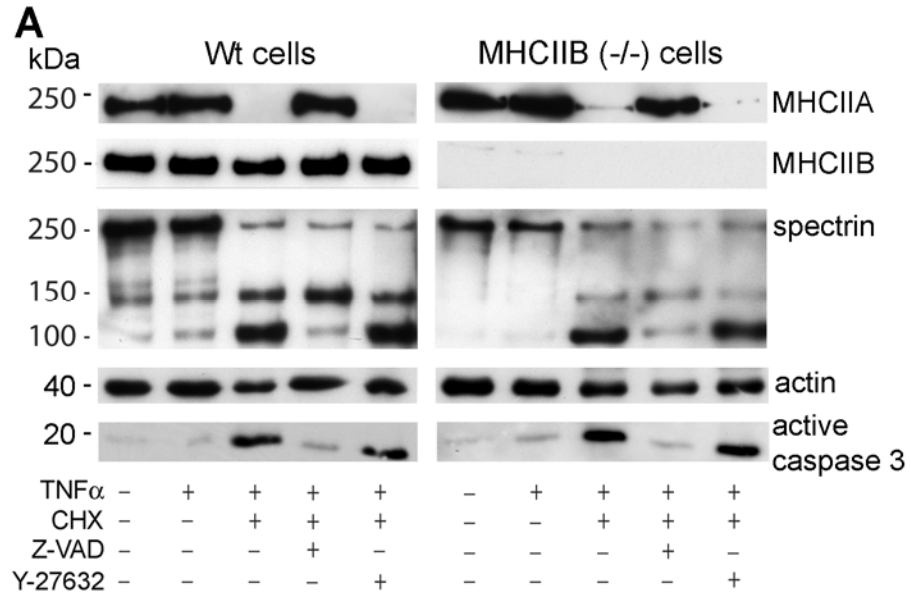


Figure 4



**Figure 4. Effect of TNF $\alpha$ +CHX treatment on MHCIIA and MHCIIB levels in wildtype and MHCIIB (-/-) embryonic fibroblasts.**

**A)** Wild-type and MHCIIB (-/-) embryonic fibroblasts were treated with different combinations of TNF $\alpha$  (20 ng/ml), CHX (5  $\mu$ g/ml), Z-VAD-fmk (5  $\mu$ M) and Y-27632 (20  $\mu$ M) for 24 hours. Following treatments, total-cell lysates were subjected to western blotting with antibodies against MHCIIA, MHCIIB, spectrin, actin and active caspase-3. TNF $\alpha$ +CHX treatment reduced MHCIIA levels and caused the cleavage of spectrin and caspase-3 in both wild-type and MHCIIB (-/-) fibroblasts. Control conditions for each protein were restored by the caspase inhibitor Z-VAD-fmk but not by Y-27632. MHCIIB expression in wild-type cells was not affected by the treatments. The figure shows representative western blots. **B)** Quantification of MHCIIA levels in wild-type and MHCIIB (-/-) fibroblasts. The intensity of the MHCIIA immunoreactive bands was measured for each experimental condition described in A and normalized to control cell levels. Values shown are the mean  $\pm$  s.e.m. of three independent experiments. The graph shows that TNF $\alpha$ +CHX treatment had a similar effect on MHCIIA levels in both cell lines. \* $P$ < 0.01: wild-type fibroblasts, TNF $\alpha$  vs TNF $\alpha$ +CHX; \*\* $P$ <0.0002: MHCIIB (-/-) fibroblasts, TNF $\alpha$  vs TNF $\alpha$ +CHX.

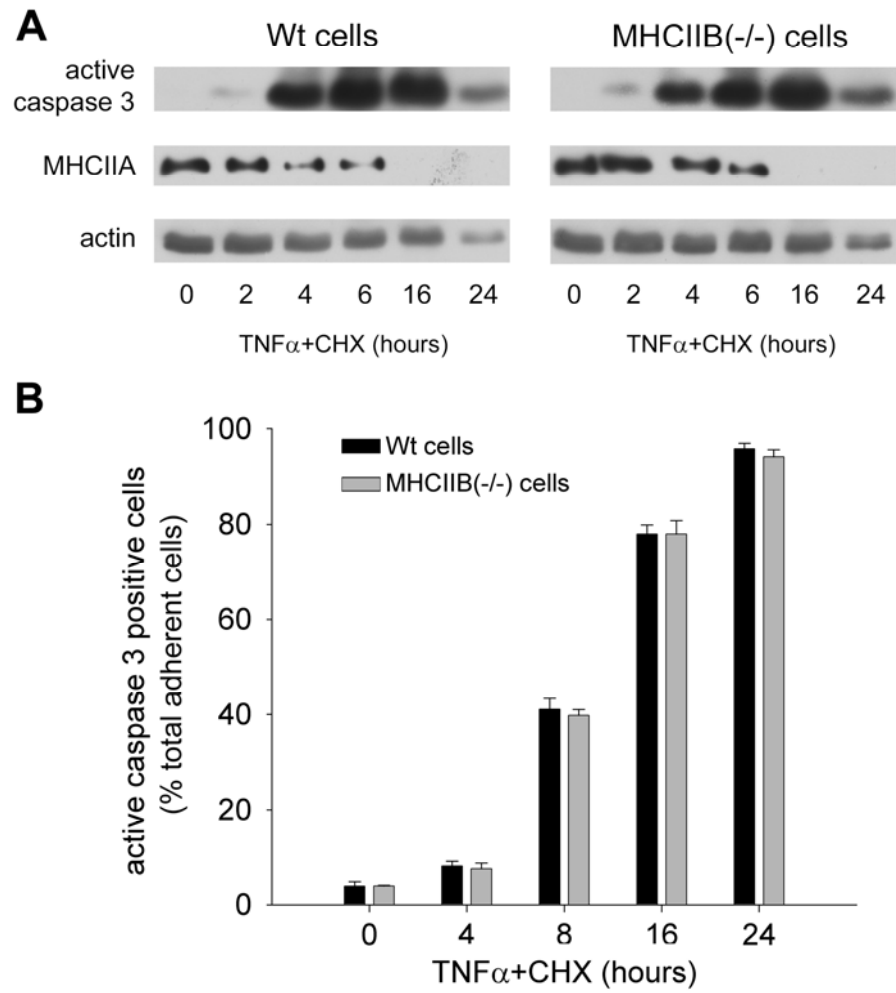


Figure 5

**Figure 5. Time course studies on the effect of TNF $\alpha$ +CHX treatment on caspase-3 activation and MHCIIA degradation in wild-type and MHCIIIB (-/-) embryonic fibroblasts.**

Wild-type and MHCIIIB (-/-) fibroblasts were incubated in the absence (0 hour) or in the presence of TNF $\alpha$ +CHX for increasing periods of time (2 to 24 hours). **A)** Total-cell lysates were subjected to western blotting analyses: the same membrane was incubated with antibodies against active caspase-3, MHCIIA and actin. The figure shows representative western blots. The time course of caspase-3 cleavage and of MHCIIA disappearance was similar in the two cell lines. **B)** Following treatments, the cells were processed for immunofluorescence microscopy with anti-active caspase-3 and Rhodamine-phalloidin. Total adherent cells and adherent cells positive for active caspase-3 were counted for each time point. TNF $\alpha$ +CHX treatment induced an increase in the percentage of cells positive for active caspase-3 with the same time course in both cell lines. The values shown are the mean  $\pm$  s.e.m of three independent experiments and more than 300 cells were observed per experimental condition.

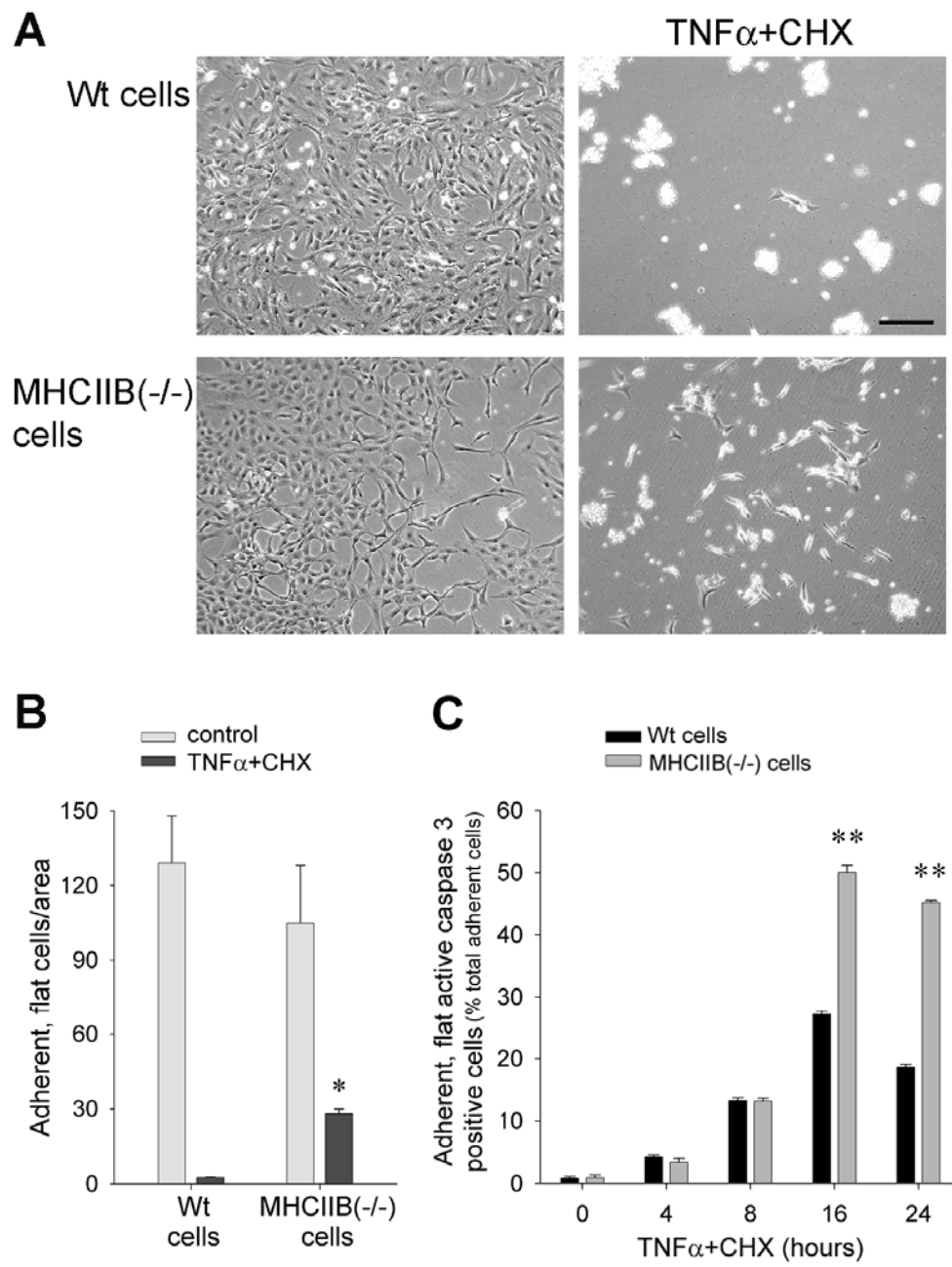


Figure 6

**Figure 6. Differential morphological responses of wild-type and MHCIIIB (-/-) embryonic fibroblasts during TNF $\alpha$ +CHX-induced apoptosis.**

Wild-type and MHCIIIB (-/-) fibroblasts were incubated in the absence (control) or in the presence of TNF $\alpha$ +CHX for 24 hours. **A)** Representative bright-field micrographs of control and treated cells. TNF $\alpha$ +CHX induced cell shrinkage and detachment of wild-type and MHCIIIB (-/-) embryonic fibroblasts; however, more MHCIIIB (-/-) than wild-type cells remained attached. Scale bar: 250  $\mu$ m. **B)** Adherent cells in ten different areas per experimental condition were counted. Quantification of the responses demonstrated a larger number of adherent MHCIIIB (-/-) than wild-type cells after the treatment. Data shown are the mean  $\pm$  s.e.m. of 6 independent experiments. \* $P$ <0.0001: treated MHCIIIB (-/-) vs treated wild-type fibroblasts. **C)** Wild-type and MHCIIIB (-/-) embryonic fibroblasts were incubated for increasing periods of time with TNF $\alpha$ +CHX. Following treatments, the cells were processed for immunofluorescence microscopy with anti-active caspase-3 to identify the apoptotic cells and with Rhodamine-phalloidin to facilitate cell visualization. Adherent, flat cells that were active caspase-3 positive were counted and the percentage of these cells with respect to the total adherent cell population was calculated. The percentage of apoptotic cells that were flat and adherent was higher in MHCIIIB (-/-) than in wild-type fibroblasts from 16 hours onwards. More than 300 cells per experimental condition were counted. The values shown are the mean  $\pm$  s.e.m. of 3 independent experiments. \*\* $P$ <0.00001: Wt fibroblasts vs MHCIIIB (-/-) fibroblasts 16 and 24 hours treatment.

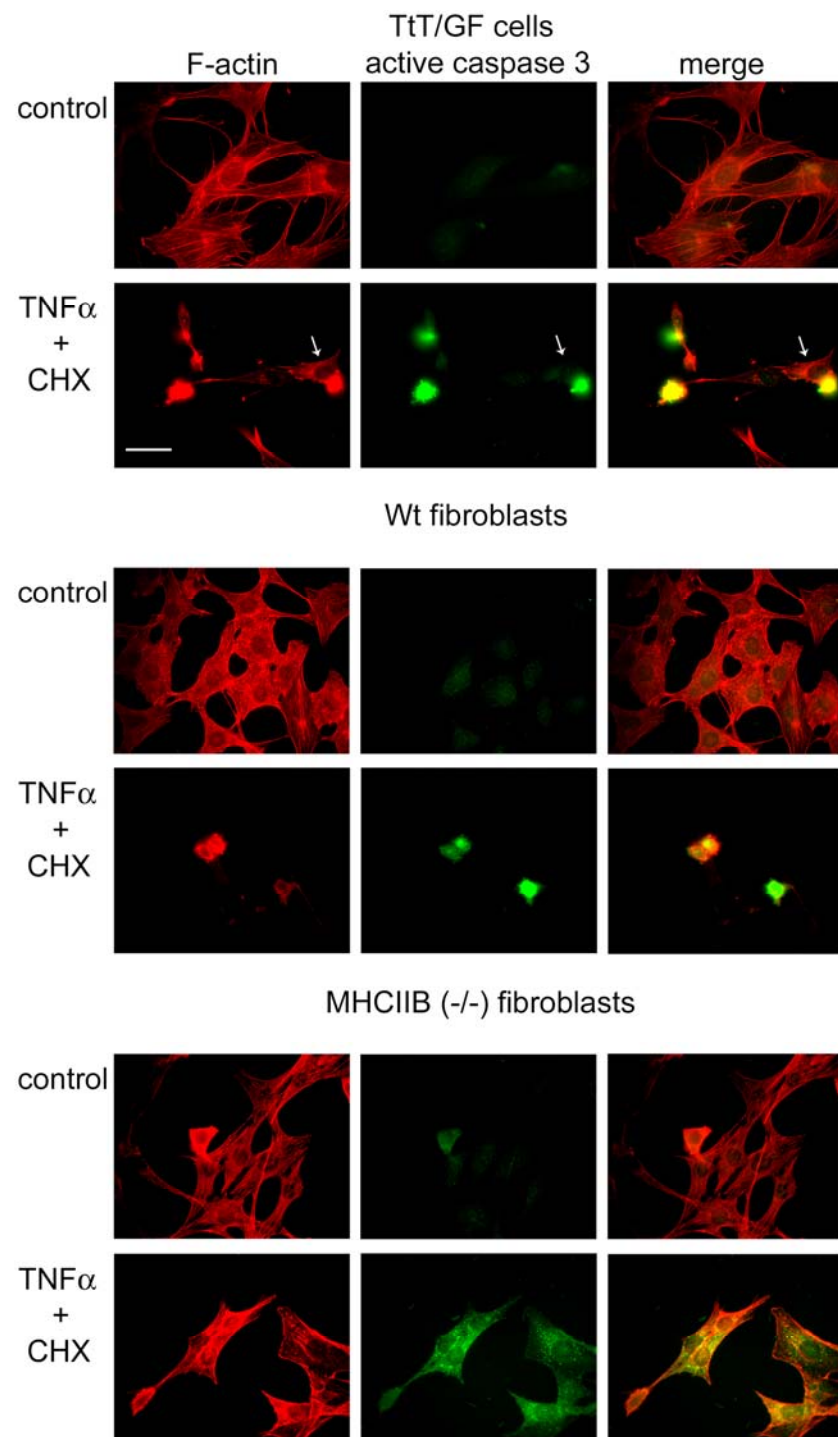


Figure 7

**Figure 7. Fluorescence microscopy of F-actin distribution and caspase-3 activation in control and TNF $\alpha$ +CHX-treated TtT/GF cells, and wild-type and MHCIIB (-/-) embryonic fibroblasts.**

The cells were incubated with culture medium alone (control) or containing TNF $\alpha$ +CHX for 16 hours. Next, the cells were processed for fluorescence microscopy with Rhodamine-phalloidin and anti-active caspase-3. Control cells were flat with cytoplasmic extensions and cortical and cytoplasmic actin filaments. Control cells showed low levels of caspase-3 activation. Following TNF $\alpha$ +CHX treatment, the few TtT/GF cells and wild-type fibroblasts that remained attached were round and displayed caspase-3 activation. Some treated TtT/GF cells that remained flat showed no evidence of caspase-3 activation (arrows). Treated MHCIIB (-/-) fibroblasts that remained attached were flat and possessed actin fibers. Moreover, caspase-3 was active in these adherent, TNF $\alpha$ +CHX-treated MHCIIB (-/-) fibroblasts. Scale bar: 50  $\mu$ M.

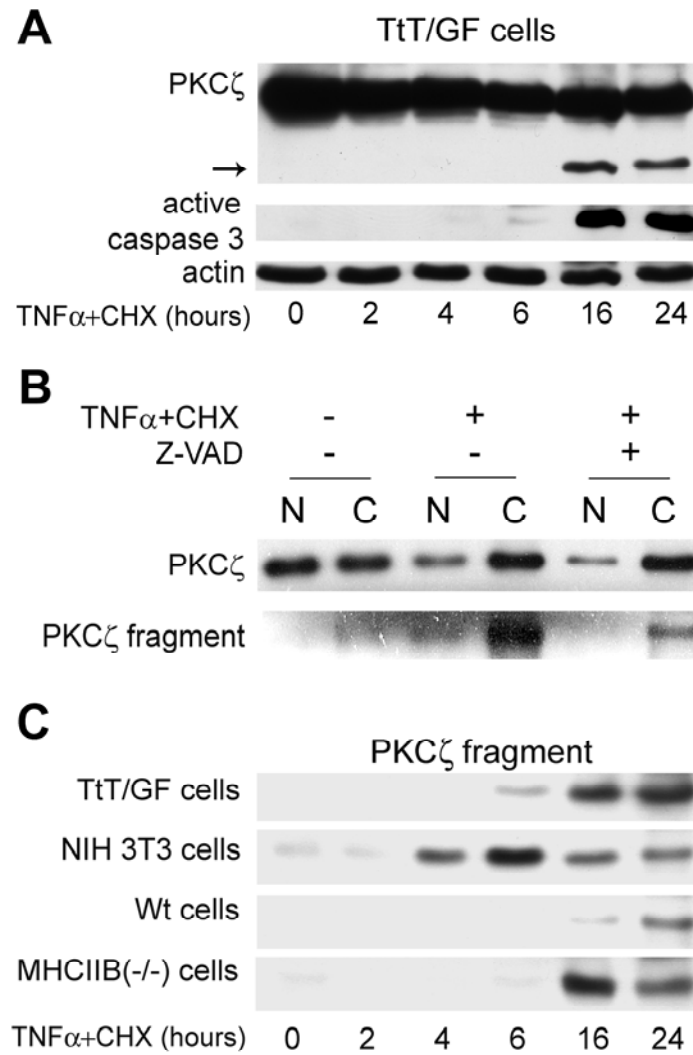


Figure 8



**Figure 8. Effect of TNF $\alpha$ +CHX on PKC $\zeta$  cleavage.**

**A)** TtT/GF cells were incubated with TNF $\alpha$ + CHX for increasing periods of time. Next, total-cell lysates were prepared and subjected to western blotting with antibodies to PKC $\zeta$  and active caspase-3. The membrane was striped and incubated with anti-actin as loading control. The representative western blot shows PKC $\zeta$  cleavage in cell incubated with TNF $\alpha$ +CHX for more than 16 hours. The cleavage was coincident with caspase-3 activation. **B)** TtT/GF cells were incubated culture medium alone or containing TNF $\alpha$ +CHX either in the absence or presence of the caspase inhibitor Z-VAD-fmk for 16 hours. Next, the cells were homogenized and non-cytoskeleton-(N) and cytoskeleton-(C) enriched fractions were prepared. The subcellular fractions were subjected to western blot analyses with anti-PKC $\zeta$ . The figure shows representative western blots. PKC $\zeta$  is present in both subcellular fractions in control and treated cells. TNF $\alpha$ +CHX treatment induced the translocation of PKC $\zeta$  from the non-cytoskeleton (N) to the cytoskeleton (C) fraction. The PKC $\zeta$  cleavage product was only found in the cytoskeleton (C) fraction of TNF $\alpha$ +CHX-treated cells. The caspase inhibitor Z-VAD-fmk blocked TNF $\alpha$ +CHX-induced PKC $\zeta$  cleavage but not its translocation. **C)** TtT/GF cells, NIH 3T3 fibroblasts, wild-type and MHCIIB (-/-) embryonic fibroblasts were treated with TNF $\alpha$ +CHX for increasing periods of time. Next, cell lysates were prepared and 10  $\mu$ g protein per sample were subjected to electrophoresis and western blotting with anti-PKC $\zeta$ . The representative western blots show the appearance of a 48 kDa immunoreactive band that corresponds to one of the cleavage products of PKC $\zeta$  after TNF $\alpha$ +CHX treatment in all cell lines.



**Figure 9. Co-immunoprecipitation studies on the effect of TNF $\alpha$ +CHX on PKC $\zeta$ -MHCIIB interaction.**

**A)** TtT/GF cell lysates were prepared from untreated cells (L). Precleared cell lysates were incubated with proteinA-Sepharose4B beads that had been preincubated with either buffer alone (B) or anti-vimentin (Vm) or anti-MHCIIB (MHCIIB). The pellets were subjected to SDS-PAGE followed by immunoblotting with anti-PKC $\zeta$ . A representative membrane shows the presence of a 70kDa immunoreactive band in the cell lysate and in the MHCIIB immunoprecipitate. **B)** Untreated TtT/GF cell lysates were prepared (L). Precleared cell lysates were incubated with proteinA-Sepharose4B beads that had been preincubated with either buffer alone (B), anti-vimentin (Vm) or anti-PKC $\zeta$  (PKC $\zeta$ ) antibodies. The pellets were subjected to SDS-PAGE followed by immunoblotting with anti-MHCIIB. A representative membrane shows the presence of a 210kDa immunoreactive band in the cell lysate and in the PKC $\zeta$  immunoprecipitate. **C)** Control and 24-hour-TNF $\alpha$ +CHX-treated TtT/GF cells were subjected to immunoprecipitation with PKC $\zeta$  antibody. The pellets were recovered and subjected to western blotting with MHCIIB antibodies. This representative membrane shows presence of a 70kDa immunoreactive band in the immunoprecipitates of both untreated and treated cells.

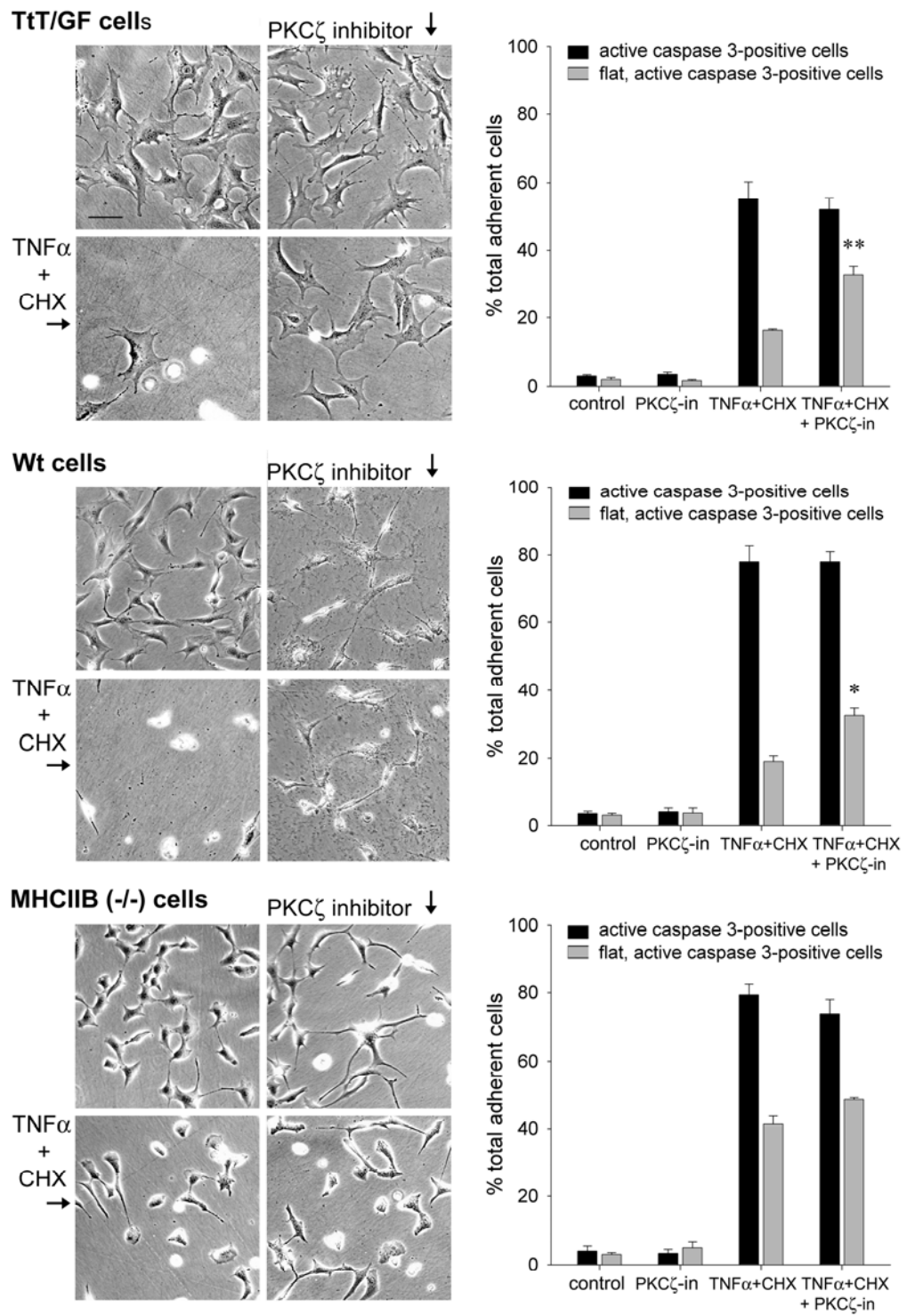


Figure 10

**Figure 10. Effect of PKC $\zeta$  inhibition on TNF $\alpha$ +CHX-induced cell shrinkage and detachment.**

TtT/GF cells, wild-type and MHCIIIB (-/-) embryonic fibroblasts were incubated with culture medium either alone or with medium containing TNF $\alpha$ +CHX both in the absence or presence of the specific PKC $\zeta$  inhibitor Myr-PKC $\zeta$  pseudosubstrate (10  $\mu$ M, final concentration) for 16 hours. Some cell preparations were double labelled with anti-active caspase-3 to identify apoptotic cells and with Rhodamine-phalloidin to label F-actin. Next, the total number of adherent cells, of flat cells positive for active caspase-3 and cells positive for active caspase-3 were recorded for each experimental condition. The representative phase contrast micrographs on the left of the figure show flat and elongated control TtT/GF, wild-type and MHCIIIB (-/-) fibroblasts. PKC $\zeta$  inhibited-cells remained attached and showed elongated cytoplasmic processes. TNF $\alpha$ +CHX treatment induced cell shrinkage and detachment in TtT/GF cells and in wild-type fibroblasts but the MHCIIIB (-/-) fibroblasts stayed adherent and elongated. PKC $\zeta$  inhibition reduced TtT/GF cell and wild-type embryonic fibroblast detachment induced by TNF $\alpha$ +CHX. Scale bar: 100  $\mu$ m. The histograms on the right of the figure show the quantification of these results. PKC $\zeta$  inhibition did not affect cell-death rate in any of the cell lines tested; however, it increased the percentage of flat apoptotic TtT/GF cells and wild-type fibroblasts but was without effect on MHCIIIB (-/-) fibroblasts. The values shown are the mean  $\pm$  s.e.m. of 3 independent experiments; more than 300 cells per experimental condition were counted. \* $P$ <0.03: TNF $\alpha$ +CHX+PKC $\zeta$ - vs TNF $\alpha$ +CHX-treated wild-type fibroblasts; \*\* $P$ <0.005: TNF $\alpha$ +CHX+PKC $\zeta$ - vs TNF $\alpha$ +CHX-treated TtT/GF cells.

## **I.9 Supplementary material**

**Figure S1.** Validation of the immunofluorescence microscopy studies on caspase-3 activation in TNF $\alpha$ +CHX-treated adherent MHCIIIB (-/-) embryonic fibroblasts. Page 143.

**Figure S2.** Effect of PKC $\zeta$  inhibition on caspase-3 cleavage. Page 145.

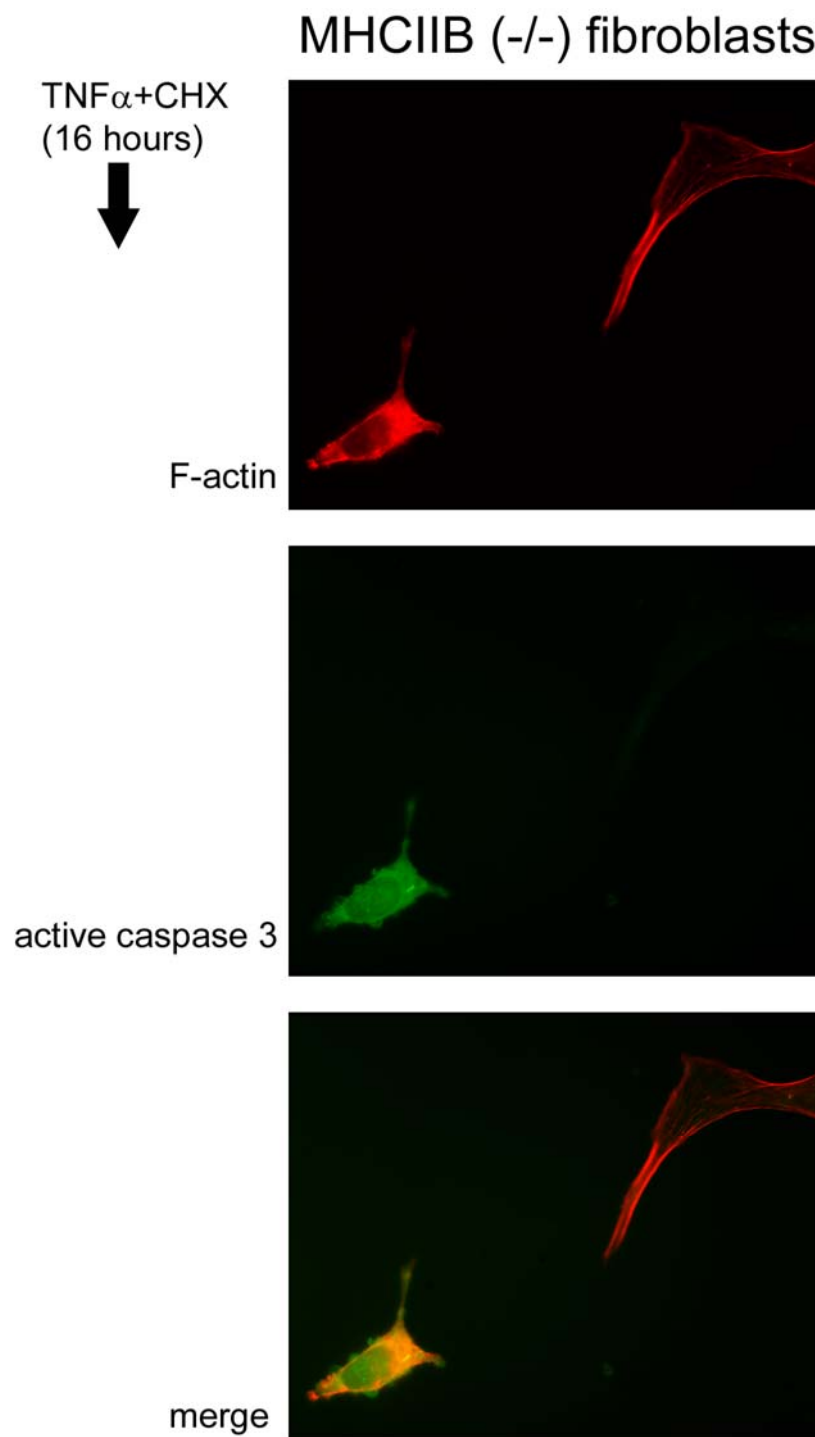


Figure S1

**Figure S1. Validation of the immunofluorescence microscopy studies on caspase-3 activation in TNF $\alpha$ +CHX-treated adherent MHCIIIB (-/-) embryonic fibroblasts.**

The cells were incubated with culture medium containing TNF $\alpha$ +CHX for 16 hours. Next, they were processed for fluorescence microscopy with Rhodamine-phalloidin and anti-active caspase-3. A treated MHCIIIB (-/-) cell that remained attached was positive for active-caspase-3 labelling. Another treated-MHCIIIB (-/-) fibroblast (arrow) that remained flat showed no evidence of caspase-3 activation (arrows). Scale bar: 50  $\mu$ M.



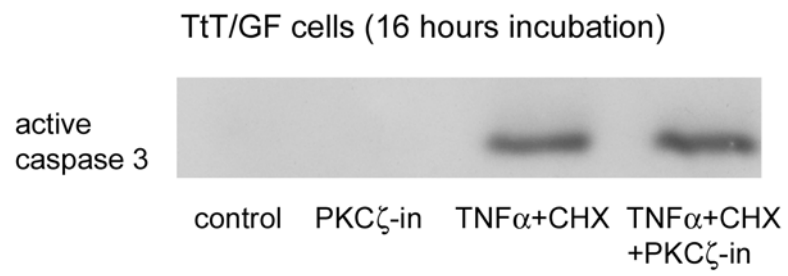


Figure S2

**Figure S2. Effect of PKC $\zeta$  inhibition on caspase-3 cleavage.**

MHCIIB (-/-) embryonic fibroblasts were incubated with culture medium either alone (control) or with medium containing TNF $\alpha$ +CHX both in the absence or presence of the specific PKC $\zeta$  inhibitor Myr-PKC $\zeta$  pseudosubstrate (PKC $\zeta$ -in, 10 $\mu$ M, final concentration) for 16 hours. Next, total-cell lysates were prepared and subjected to SDS-PAGE followed by immunoblotting with anti-active caspase-3. PKC $\zeta$  inhibition neither induced the cleavage of caspase-3 nor affected TNF $\alpha$ -induced caspase-3 cleavage.

## **II. Deuxième article:**

### **Isoform B of myosin II affects the cell shape by interfering with the activation of the small GTPase Rac1**

Sara Solinet and María Leiza Vitale

Department of Pathology and Cell Biology, Université de Montréal

2900 Edouard-Montpetit, Montréal, Québec, H3T 1J4 Canada

*Article en soumission.*

**Short title:** Myosin II and cell shape modulation

**Key words:** Myosin, Rac1, cortactin, cell shape, lamellipodia

## II.1 Summary

Isoforms A and B of myosin II exhibit distinctive roles in several cell processes. Here, we studied the involvement of the isoform B in determining cell shape and polarity in spreading fibroblasts. Cells deficient in myosin heavy chain IIB (MHCIIB (-/-)) spontaneously formed lamellipodia. The cortical cytoskeleton of these cells was impoverished in myosin II but enriched in the actin binding protein cortactin when compared to wild type fibroblasts. MHCIIB deficiency did not affect cortactin tyrosine phosphorylation. Cortactin coimmunoprecipitated with MHCIIA, but not with MHCIIB, and partially colocalized with MHCIIA only in wild type fibroblasts. Activation and association of Rac1 with the cell membrane were increased in MHCIIB (-/-) fibroblasts. Lamellipodium formation, Rac1 activation, and Rac1 and cortactin membrane association were a) blocked by Rac1-GTP exchange factor inhibition in MHCIIB (-/-) fibroblasts, and b) induced by inhibition of myosin II ATPase and crosslinking activities in wild type fibroblasts. bFGF treatment activated Erk1/2 in both cell lines. However, bFGF-treated MHCIIB (-/-) formed aberrant membrane projections. Our results indicate that MHCIIB deficiency reduced cortical actin filament crosslinking leading to Rac1 activation, and through this, to the recruitment of actin-binding proteins such as cortactin that modulate the shape of the cell.

## II.2 Introduction

Nonmuscle myosins class II are members of the large family of myosins. They are composed of two heavy chains (MHC), and of two essential and two regulatory light chains (MLC). Up to date, three isoforms of myosin II have been described, that correspond to three different heavy chains A, B and C respectively (Bresnick, 1999; Golomb et al., 2004). However, most biochemical and physiological data gathered are related to the isoforms A and B. These two isoforms share a general molecular organization and enzymatic activity, and their intracellular distribution partially overlaps (Bao et al., 2005; Kolega, 2003; Takahashi et al., 1992). Nevertheless, there is increasing experimental evidence that nonmuscle myosin II isoforms' contractile and structural activities and distribution are differently regulated, and thus, that myosin II isoforms distinctively contribute to several cellular processes (Bao et al., 2005; Conti and Adelstein, 2008; Ivanov et al., 2004; Straussman et al., 2001). For instance, nonmuscle myosin IIA moves actin filaments faster than myosin IIB (Kelly et al., 1996), the assembly of myosin IIA and myosin IIB filaments is blocked by different kinases (Murakami et al., 2000) myosin IIA and IIB distribute differently in migrating endothelial cells (Kolega, 2006), myosin IIA is cleaved during apoptosis while myosin IIB is more resistant (Solinet and Vitale, 2008), myosin IIA but not myosin IIB promotes microtubule dynamics (Even-Ram et al., 2007), and the phosphorylation of myosin light chains in myosin IIA and IIB are differentially modulated by the Rho-dependent kinase (ROCK) (Sandquist et al., 2006).

Myosin II is implicated in the polarization of the cytoskeleton during cell locomotion (Conti and Adelstein, 2008). Myosin IIA has been associated with pulling forces at the front of the cell and myosin IIB with retracting forces at the rear of the cell (Kolega, 2006; Saitoh et al., 2001; Vicente-Manzanares et al., 2007). However, other studies have shown the opposite, that myosin IIA would act as a brake for cell protrusions (Even-Ram et al., 2007) whereas myosin IIB would contribute to lamella extension

(Betapudi et al., 2006). Myosin II may also be involved in modulating the behaviour of unstimulated, spreading cells. Fibroblasts from the myosin II heavy chain B (MHCIIB) knock out cell line (MHCIIB (-/-)) were reported to possess multiple lamellipodia even when these cells were not induced to migrate in a given direction (Lo et al., 2004). Lamellipodium formation requires the participation of the small GTPase Rac1 which promotes actin filament dendritic polymerization through activation of the Arp2/3 complex by the WAVE (WASP family verprolin-homology) proteins (Cori and Ridley, 2002; Eden et al., 2002; Heasman and Ridley, 2008). Rac1 also enhances the localization to the lamellipodium leading edge of the actin filament binding protein cortactin (Weed et al., 1998). Cortactin has been implicated in the dynamics and stability of lamellipodia (Cosen-Binker and Kapus, 2006; Daly, 2004; Gatesman and Weed, 2008).

The present study investigated the contribution of the isoform B of myosin II in the establishment of cell shape in spreading fibroblasts. In particular, we focussed our study in elucidating why the lack of MHCIIB induced the formation of lamellipodia. Using the MHCIIB (-/-) fibroblast cell line, we show that MHCIIB deficiency induced lamellipodium formation by increasing both the basal activity and the association of the small GTPase Rac1 with the cell membrane which in turn induced the translocation of the actin-binding protein cortactin to the cell cortex.

## II.3 Results

### **Lack of MHCIIIB induces lamellipodium formation and increases cortactin association with the cell membrane**

Wild type embryonic fibroblasts grown in serum containing medium had a polygonal shape with abundant cell projections (Fig. 1, upper panel). In contrast, myosin IIB-deficient embryonic fibroblast (MHCIIIB (-/-)) possessed a prominent lamellipodium with scarce projections (Lo et al., 2004) (Fig. 1, lower panel). MHCIIA and MHCIIIB in wild type fibroblasts colocalized with cytoplasmic actin cables and with cortical actin filaments; although, most cell projections were devoid of both myosin II isoforms (Fig. 1, right, upper panels). MHCIIA labelling in MHCIIIB (-/-) fibroblasts was associated with stress fibers in the cytoplasm and with actin filaments in the lamella. MHCIIA was absent from the cortex of knock out cells; specially, no MHCIIA labelling was observed at the leading edge of the lamellipodium (Fig. 1, right, lower panel).

MHCIIIB (-/-) fibroblasts spontaneously formed lamellipodia. The lack of MHCIIIB may have caused the redistribution of actin binding proteins related to lamellipodium turnover and stability. To determine why and how MHCIIIB deficiency lead to lamellipodium formation, we assessed whether the absence of MHCIIIB affected the distribution of cortactin, an actin binding protein known to contribute to the maintenance of lamellipodia (Bryce et al., 2005; Lai et al., 2008). In wild type fibroblasts, cortactin was preferentially cytoplasmic and was concentrated in perinuclear clumps (Fig. 2A). Cortactin heavily labelled the leading edge of lamellipodia in MHCIIIB (-/-) fibroblasts, while the perinuclear punctate labelling appeared more diffused than in wild type fibroblasts (Fig. 2A). In addition, cortactin expression was not affected by the absence of MHCIIIB, however, significantly more cortactin was recovered in the membrane fraction in MHCIIIB (-/-) than in wild type fibroblasts (Fig. 2B and C). Therefore, the presence of lamellipodia

in MHCIIIB (-/-) fibroblasts coincided with an increased association of cortactin with the cell cortex.

Since cortactin tyrosine phosphorylation has been associated with lamellipodial stability and turnover (Cosen-Binker and Kapus, 2006; Selbach and Backert, 2005; Zheng et al., 2005), we determined the distribution and the level of tyrosine phosphorylated cortactin in wild type and in MHCIIIB (-/-) embryonic fibroblasts. We used an antibody that specifically recognizes cortactin phosphorylated in tyrosine 421 (henceforth called P-cortactin). Immunofluorescence images show that P-cortactin distributed in the cytoplasm and fine membrane projections in wild type fibroblasts (Fig. 3A). P-cortactin staining was associated with the leading edge of lamellipodia in MHCIIIB (-/-) fibroblasts (Fig. 3A). The level of cortactin tyrosine phosphorylation was similar in both cell lines; however, there was an increased association of P-cortactin with the membrane fractions in MHCIIIB (-/-) fibroblasts compared to wild type fibroblasts (Fig. 3B).

### **Interaction between cortactin and myosin II isoforms**

Experimental evidence has shown that cortactin and MHCIIA may interact (He et al., 1998). Therefore, we hypothesized that the absence of the isoform B of myosin II could influence on cortactin-MHCIIA interaction. This hypothesis was tested by evaluating MHCIIA and cortactin interaction in wild type and MHCIIIB (-/-) fibroblasts. First, by coimmunoprecipitation studies, we determined whether cortactin interacted with MHCIIA in wild type and in MHCIIIB (-/-) fibroblasts. None of the antibodies directed against a particular isoform of myosin II coimmunoprecipitated the other isoform (Fig. 4). The MHCIIA antibody coimmunoprecipitated cortactin and P-cortactin and, reciprocally, the cortactin antibody coimmunoprecipitated MHCIIA, in both wild type and MHCIIIB (-/-) fibroblasts. There was no significant difference in cortactin and MHCIIA interaction in both cell lines. On the other hand, the MHCIIIB antibody did not coimmunoprecipitate



cortactin and the cortactin antibody did not coimmunoprecipitate MHCIIB (Fig. 4). These results indicate that only MHCIIA interacts with cortactin and that the presence or absence of MHCIIB does not alter this interaction in the cell lysate.

Secondly, we looked at whether the interaction between MHCIIA and cortactin occurred in specific cellular regions using confocal microscopy. MHCIIA and cortactin colocalized in peripheral filaments but did not colocalize in cell projections in wild type fibroblasts (Fig. 5). In MHCIIB (-/-) fibroblasts, the lamellipodium was heavily labelled with cortactin but almost devoid of MHCIIA. Instead, MHCIIA filaments lagged behind in the lamella (Fig. 5). Cortactin and MHCIIA did not colocalize in the knock out cells (Fig. 5).

#### **Modification of the activation state and subcellular localization of the small GTPase Rac1 in MHCIIB (-/-) fibroblasts**

On the one hand, cortactin translocation from the cytoplasm to the plasma membrane has been shown to be dependent on Rac1 (Weed et al., 1998). On the other hand, Rac1 is believed to control the formation of lamellipodia (Heasman and Ridley, 2008); therefore, we investigated whether Rac1 was implicated in the formation of lamellipodia in MHCIIB-deficient cells. The quantification of Rac, RhoA and Cdc42 activation was carried out using G-LISA kits which measure the level of GTP-bound small GTPases. GTP-Rac was significantly higher in MHCIIB (-/-) than in wild type fibroblasts (Fig. 6A). Under the same experimental conditions, similar GTP-RhoA levels were measured in the two cell lines, whereas GTP-Cdc42 levels were significantly lower in MHCIIB (-/-) than in wild type fibroblasts (Fig. 6A). Then, we examined the association of Rac1 with the membrane fraction in wild type and MHCIIB (-/-) fibroblasts. Total Rac1 levels were similar in control and MHCIIB (-/-) fibroblasts (Fig. 6B). However, there was a significant increase in membrane-associated Rac1 in cells devoid of MHCIIB when compared to wild type

fibroblasts (Fig. 6B). Immunofluorescence studies showed a cytoplasmic staining for Rac1 in both cell types (Fig. 6C). In addition, Rac1 labelling was associated with the tips of membrane projections in wild type fibroblasts and with the leading edge of the lamellipodium in MHCIIIB (-/-) fibroblasts (Fig. 6C).

These data clearly indicate an intrinsic activation of Rac1 in MHCIIIB (-/-) fibroblasts. This enhanced Rac1 activation may be responsible for the translocation of cortactin from the cytoplasm to the cortex of knock out cells. To explore this eventuality, MHCIIIB (-/-) fibroblasts were incubated with the Rac1 inhibitor, NSC23766, which inhibits the interaction of Rac1 with its guanine-nucleotide exchange factors (Rac1-GEFs) (Gao et al., 2004). Treatment of MHCIIIB (-/-) fibroblasts with NSC23766 caused the disappearance of lamellipodia (Fig. 7A). Cortactin and Rac1 were no longer associated with the plasma membrane but instead dispersed in the cytoplasm of treated MHCIIIB (-/-) fibroblasts (Fig. 7B). Moreover, MHCIIA distribution and colocalization with cortactin observed in NSC23766-treated MHCIIIB (-/-) fibroblasts were similar to those described in wild type fibroblasts (Fig. 7B and compare with Fig. 5).

### **Studies on the relationship between myosin II, Rac1 and cortactin**

In untreated, wild type fibroblasts, myosin IIA and IIB were associated with the cell cortex, whereas no myosin II occupied the cortical region of MHCIIIB (-/-) fibroblasts (Fig. 1). To determine whether the absence of cortical myosin II affected Rac1 and cortactin, wild type fibroblasts were incubated with blebbistatin, which blocks myosin II in an actin detached state by inhibiting ATPase and crosslinking activities of myosin (Kovács et al., 2004), and the effect of the treatment on Rac1, cortactin and myosin II distribution as measured. Cortactin and Rac1 did not colocalize in control wild type fibroblasts with the exception of a partial overlap at the tip of the projections (Fig. 8 upper panel). In blebbistatin-treated wild type fibroblasts, cortical and cytoplasmic myosin IIA and IIB

filaments were disrupted (not shown), while the cortical actin network remained unaltered (see supplemental Fig.S1). Blebbistatin treatment induced the formation of wide lamellae, the dispersion of the cortactin perinuclear labelling and the accumulation of cortactin and Rac1 at the edge of lamellipodia (Fig. 8, lower panel). Thus, blebbistatin-treated wild type fibroblasts exhibited morphological similarities of MHCIIIB (-/-) fibroblasts. The formation of lamellipodia and the cortactin and Rac1 association with the edge of lamellipodia were not modified by blebbistatin treatment of MHCIIIB (-/-) fibroblasts (data not shown).

The association of the actin filament-binding protein paxillin with the cell periphery was increased in MHCIIIB (-/-) fibroblasts compared to wild type fibroblasts. Blebbistatin treatment of wild type fibroblasts increased paxillin association to the cell cortex but not paxillin distribution in MHCIIIB (-/-) fibroblasts (Fig. S1).

To assess whether blebbistatin affected the activation of Rac we measured GTP-Rac with a specific G-LISA activation kit. Blebbistatin treatment significantly increased GTP-Rac levels in wild type fibroblasts without increasing the already high GTP-Rac levels in MHCIIIB (-/-) fibroblasts. As expected, the Rac-GEF inhibitor NSC23766 did not modify the basal GTP-Rac levels in wild type fibroblasts; however, it significantly reduced the increased basal GTP-Rac levels in MHCIIIB (-/-) fibroblasts (Fig. 9).

### **Response of wild type and MHCIIIB (-/-) fibroblasts to bFGF**

The impact of myosin IIB in cell morphological responses was investigated by examining the reaction of MHCIIIB (-/-) fibroblasts to bFGF which induces cell projection formation in wild type fibroblasts. Wild type and MHCIIIB (-/-) fibroblasts were serum deprived for 16 hours then treated with 10 ng/ml bFGF for an additional period of 16 hours. Serum deprived wild type fibroblast showed a polygonal or elongated morphology with several projections, while cells lacking MHCIIIB had a flat and rounded shape (Fig. 10,

control). Following treatment with bFGF, the wild type fibroblasts were fusiform and extended one or two long cell processes (Fig. 10, bFGF). In response to bFGF, MHCIIIB (-/-) fibroblasts formed a lamellipodium and an extensive, generally unique cell projection at the opposite site of the lamellipodium (Fig. 10, bFGF). The effect of bFGF was blocked in both cell types by the MEK inhibitor, U0126 (Fig. 10) but not by the PI3 kinase inhibitor, LY294002 or the p38MAPK inhibitor, SB 203580 (data not shown).

Since the differential morphological response of the MHCIIIB (-/-) fibroblasts could be attributed to an altered Erk1/2 activation, the activation of the Erk-dependent cascade following bFGF challenge as investigated in both cell types. Neither the expression nor the basal level of activation of Erk1/2 was affected by the absence of MHCIIIB (Fig. 11A). Erk1/2 activation following bFGF treatment was similar in wild type and MHCIIIB (-/-) fibroblast (Fig. 11). In both cell lines, Erk1/2 was rapidly and transiently phosphorylated (Fig. 11A, B) and translocated to the nucleus (Fig. 11C). Thus, the lack of MHCIIIB did not affect the activation of the Erk1/2 by bFGF or its kinetics.

Since cortactin distribution was different in wild type and MHCIIIB (-/-) fibroblasts (Fig. 2), we assessed the effect of bFGF on cortactin distribution in both cell lines. In serum-starved, wild type fibroblasts, cortactin localized to the perinuclear region, to the tip of cell protrusions and to cell-to cell contact areas (Fig. 12) as we have previously described for the TtT/GF cell line (Zheng et al., 2005). Cortactin labelling in MHCIIIB (-/-) fibroblasts was concentrated in the perinuclear area and along the cell membrane of large and wide lamella and other elongated projections (Fig. 12). Treatment with bFGF induced the association of cortactin to the tip of membrane projections in wild type fibroblasts (Fig. 12). In bFGF-treated, MHCIIIB (-/-) fibroblasts cortactin labelled the membrane of the large lamellipodium and the membrane of cell projections (Fig. 12).

## II.4 Discussion

The present work demonstrates that deregulation in the expression of the isoform B of myosin II affects cell morphology by interfering with the GTPase Rac1 activation pathway. Deficiency in MHCIIIB led to lamellipodium formation in spreading fibroblasts as a consequence of enhanced basal Rac1 activity and membrane association which, in turn, induced the translocation of cortactin to the leading edge of lamellipodia. In addition, although MHCIIIB deficiency did not alter the basal level or the bFGF-induced-activation of the Erk1/2 pathway, bFGF caused the formation of aberrant cell processes in the absence of myosin IIB.

The lack of MHCIIIB expression has been shown to modify the direction stability during cell migration (Lo et al., 2004). In addition, MHCIIIB deficiency was accompanied by the appearance of lamellipodia in spreading fibroblasts ((Lo et al., 2004), and this paper), suggesting that myosin IIB is involved in the shaping and stabilization of cells not stimulated to migrate. We showed here that the isoforms A and B of myosin II colocalized with the cortical actin cytoskeleton in wild type embryonic fibroblasts. In contrast, myosin IIA was absent from the periphery of MHCIIIB (-/-) fibroblasts. Since embryonic fibroblasts do not express MHCIIIC (Lo et al., 2004), our results indicate that the subplasmalemmal actin network of MHCIIIB (-/-) fibroblasts is impoverished in myosin II. This lack of cortical myosin II may allow for a less cross-linked, looser cortical actin cytoskeleton with a propensity to form membrane protrusions. This hypothesis is supported by our finding that blebbistatin, which “freezes” myosin in an actin detached state and prevents actomyosin cross-linking (Kovács et al., 2004) increased lamellipodium formation in wild type but not in MHCIIIB (-/-) fibroblasts. A similar result has been reported in mouse embryonic fibroblasts (Vidali et al., 2006) and in wild type embryonic stem cells (Even-Ram et al., 2007). Our earlier finding that an increased interaction of myosin II with the cortical actin cytoskeleton caused cell shrinkage, stabilization of the cell membrane and

inhibition of exocytosis in lactotrope cells (Vitale and Carbajal, 2004) add supports the view that the absence of cortical myosin II reduces the state of tension of the cortical actin cytoskeleton.

This more flexible cortical cytoskeleton may facilitate lamellipodium formation either passively by releasing a constraint to allow the protrusion of the cell membrane or actively through a signaling pathway. Our results support the hypothesis that both mechanisms cooperate to activate the protrusional activity of the cell: the lack of myosin II at the cell periphery promotes lamellipodium formation by triggering small GTPase Rac1 activation. This hypothesis is based on our observations that: 1) MHCIIB deficiency was accompanied by both the activation of Rac1 and an increased accumulation of Rac1 at the leading edge of lamellipodia, and 2) the inhibition of Rac1 activation blocked lamellipodium formation in MHCIIB (-/-) fibroblasts. The participation of Rac1 in membrane ruffle and lamellipodium formation has been firmly established (Ridley et al., 1992; Ridley, 2001), even though Rac1 is dispensable for cell locomotion (Vidali et al., 2006; Well et al., 2004). Rac1 also regulates cell shape and random migration. Increased levels of active Rac1 promotes formation of lamellae (Pankov et al., 2005), and Rac1 knockdown profoundly affects the morphology of macrophages and fibroblasts (Pankov et al., 2005; Vidali et al., 2006; Well et al., 2004). On the other hand, manipulations of the actin cytoskeleton that interfere with the generation of lamellipodia or with the spreading of cells were accompanied by an alteration of Rac1 activity and/or Rac1 membrane association (Baumer et al., 2008; Even-Ram et al., 2007; Grosheva et al., 2001; Katsumi et al., 2002; Sharma and Mayer, 2008; Vitale and Carbajal, 2004). Clearly, these findings, advocate for a reciprocity between the state of organization of the cortical actin cytoskeleton and the state of activation of Rac1. Our observation that the inhibition of the myosin ATPase activity and crosslinking capacity with blebbistatin induced Rac1 activation and Rac1 association with the lamellipodium leading edge in wild type fibroblasts but not in MHCIIB (-/-) fibroblasts strongly supports the notion that the lack of MHCIIB facilitates Rac1 activation. In fact, MHCIIA deficiency also induces Rac1

activation and the formation of wide lamellae (Even-Ram et al., 2007). We propose that a myosin II-impoverished cortical actin cytoskeleton possesses biophysical properties leading to Rac1 activation and the subsequent generation of lamellipodia. A looser actin filament lattice in the absence of myosin II could facilitate the access of Rac1 to membrane-bound Rac1 GEFs. Our finding that Rac1 activation in MHCIIB (-/-) fibroblasts was dependent on the activity of Rac1 GEFs provides support to this view.

The polymerization of a branching actin network in the lamellipodium depends on the activation of the Arp2/3 complex that generates nucleation sites on the sides of existing actin filaments (Pollard, 2007). The recruitment of Arp2/3 to the cell membrane is dependent on the Rac1 mediated activation of the WAVE proteins (Ridley, 2006; Suetsugu et al., 2003; Takenawa and Suetsugu, 2007). Indeed, the constitutively active WAVE proteins (Daly, 2004), form an inhibitory complex which is disrupted by Rac1 (Eden et al., 2002). In addition, the Arp2/3 complex interacts with the actin filament-binding protein cortactin (Cosen-Binker and Kapus, 2006; Gatesman and Weed, 2008). Cortactin localizes to active lamellipodia (Kaksonen et al., 2000) where it is recruited by the Arp2/3 complex (Bryce et al., 2005). Translocation of cortactin from the cytoplasm to the cell membrane is dependent on Rac1 (Weed et al., 1998). Cortactin enhances Arp2/3 complex activation (Urano et al., 2001; Weaver et al., 2001); however, there is growing evidence that cortactin may not be necessary for triggering activation of the Arp2/3 complex to promote branched actin polymerization but rather that cortactin would stabilize the Arp2/3 complex-induced actin network (Bryce et al., 2005; Lai et al., 2008). We found that deficiency of MHCIIB was accompanied by the recruitment of cortactin to the cell membrane and that this cortactin localized to the lamellipodial protrusions together with Rac1. Although cortactin does not interact with Rac1 (Di Ciano et al., 2002) or if it does, the interaction at the cell membrane of lamellipodial protrusion was minimal (this article), the cortactin redistribution recorded here in MHCIIB (-/-) fibroblasts was dependent on Rac1 activation. Several stress stimuli applied to the cell membrane were also reported to be accompanied by a Rac1-dependent translocation of cortactin to the cell periphery (Birukov et al., 2002; Di Ciano et

al., 2002). The absence of subsurface myosin II could impose a stress to the membrane that could cause the downstream activation of Rac1. On the other hand, total cortactin tyrosine phosphorylation was not affected by MHCIIIB deficiency which agrees with previous reports that translocation of cortactin to the cell periphery is independent of its phosphorylation in tyrosine (Head et al., 2003; Huang et al., 1998; Illés et al., 2006; Vitale and Carbajal, 2004). Yet, we also observed an increased association of P-cortactin with the membrane fraction and with the lamellipodia of MHCIIIB (-/-) fibroblasts. This increased cortical levels P-cortactin may be related to an increase in focal adhesion-associated protein paxillin detected at the leading edge of lamellipodial protrusions in MHCIIIB (-/-) fibroblasts. The tyrosine phosphorylation of cortactin has been shown to contribute to focal adhesion dynamics and overexpression of a cortactin mutant that mimics the Src-mediated phosphorylation induces in lamellipodium formation (Kruchten et al., 2008).

Cortactin is composed of several domains, each of which is capable of recruiting different effector proteins (Cowieson et al., 2008). Accordingly, cortactin acts as an integrator of several signaling pathways to modulate the actin cytoskeleton (Cosen-Binker and Kapus, 2006; Selbach and Backert, 2005). Here, we found that cortactin interacted with MHCIIA not MHCIIIB. Confocal microscopy studies showed that MHCIIA-cortactin interaction in wild type fibroblasts was mainly on peripheral fibres not involved in membrane protrusions. Colocalization of cortactin and MHCIIA was not apparent in MHCIIIB (-/-) fibroblasts. Our finding that MHCIIA and cortactin did not colocalize in MHCIIIB (-/-) fibroblasts but that colocalization resumed following inhibition of Rac1-GEFs provides additional support to the view that Rac1 activation interfere with the formation of the MHCIIA-cortactin complex. However, coimmunoprecipitation of MHCIIA and cortactin was not affected by the absence of MHCIIIB. This result does not seemingly agree with our confocal microscopy studies and with the report of He et al. (He et al., 1998) who have shown that in normal fibroblasts, cortactin forms a complex with F-actin and myosin IIA which is disrupted in Ras-transformed cells in a Rac1-PIP2-dependent manner. The discrepancy may be due to the fact that in the coimmunoprecipitation studies,



the MHCIIA-cortactin complex could still form in the cell lysate despite Rac1 activation *in vivo*. In addition, inhibition of the myosin II ATPase and cross-linking activities in wild type fibroblasts increased the association of cortactin with the cell membrane suggesting that cortactin translocation occurred provided there was no actomyosin complex in the cell cortex. Collectively, the results indicate that increased membrane-associated cortactin is not only the consequence of Rac1 activation in MHCIIIB (-/-) fibroblasts but, in addition, that the lack of cortical MHCIIA in MHCIIIB (-/-) fibroblasts would free cortactin molecules and allow them to move to the cell cortex.

The abnormal intrinsic polarity of cells lacking MHCIIIB not only caused the generation of lamellipodia in unstimulated cells but also affected the cells' response to bFGF stimulation. The activation of the Erk and Rac1 pathways concurs to generate cell polarity (Huang et al., 2004; Ray et al., 2007). MHCIIIB deficiency stimulated the Rac1 pathway but it neither affected the basal nor the bFGF-induced activation of the Erk1/2 signaling cascade. However, bFGF stimulation of MHCIIIB (-/-) fibroblasts instead of inducing the formation of polarized, spindle-shaped cells with two or more cell projections, as observed in the wild type fibroblasts, caused the formation of extensive cell process that only developed at the opposite side of the lamellipodium. These results further highlight the involvement of myosin II in the development of polarized membrane projections.

We have provided evidence for a critical contribution of the organization of the cortical actin cytoskeleton in the modulation of both the intrinsic and the stimulated development of cell protrusions. The present findings emphasise the view that modifications of the biophysical properties of the cortical cytoskeleton may result in the activation/inhibition of intracellular signaling pathways, thereby, they can modulate the cell response to distinct stimuli.

## **II.5 Materials and methods**

### **Cell culture**

The MHCIIIB (-/-) fibroblasts and wild type mouse embryonic fibroblasts were a gift of Dr. R.S. Adelstein (Laboratory of Molecular Cardiology, National Heart, Lung and Blood Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Both cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 5% of fetal bovine serum, 3.7 g/ml of NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM HEPES (pH 7.2), and antibiotics (penicillin 0.2 mg/ml and streptomycin 50 µg/ml) at 37°C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 95% air. The cells were cultured for 48 hours before subjected to different treatments.

### **Source of antibodies and chemicals**

Rabbit polyclonal MHCIIA antibody raised against a synthetic peptide corresponding to amino acids 1950-1961 of human nonmuscle myosin heavy chain IIA, rabbit polyclonal MHCIIIB antibody raised against synthetic peptide corresponding to amino acid residues 1965-1976 of human nonmuscle myosin heavy chain IIB, rabbit polyclonal anti-actin antibody, protein A Sepharose-4B, cycloheximide and blebbistatin were purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). Mouse monoclonal anti-cortactin (clone 4F11) and goat polyclonal anti-vimentin were from Chemicon (Temecula, CA, USA). Rabbit polyclonal anti-phospho-cortactin (Y421) and mouse bFGF were obtained from BioSource (Camarillo, CA, USA). Monoclonal anti-vimentin (clone 9) was purchased from Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany). Polyclonal anti-Rac1 (C-14) antibody was obtained from Santa Cruz Biotech. (Santa Cruz, CA, USA). Monoclonal anti-Rac1 clone 0T.127 was from Abcam (Cambridge, MA, USA). Monoclonal mouse paxillin antibody was purchased from BD Transduction laboratories (San Jose, CA, USA). Mouse phospho-p44/42 MAPK (Erk) (Thr202/Tyr204) and rabbit p44/42 MAPK (Erk) antibodies were

purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). Rhodamine-phalloidin and DAPI were from Molecular Probes (Eugene, OR, USA). HRP-conjugated anti-mouse IgG, HRP-conjugated anti-goat IgG and HRP-conjugated anti-rabbit IgG, Cy<sup>TM</sup>3-conjugated Fab fragment anti-rabbit IgG, TRITC-conjugated anti-mouse IgG, FITC-conjugated anti-mouse IgG, FITC-conjugated anti-rabbit IgG antibodies were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA). The G-LISA RhoA and G-LISA Rac activation Assay Biochem Kits were from Cytoskeleton (Denver, CO, USA). The G-LISA Cdc42 activation Assay Biochem Kit was a generous gift of Cytoskeleton (Denver, CO, USA). The MEK inhibitor (U0126), PI3 kinase inhibitor (LY294002), p38MAPK inhibitor (SB203580) and Mowiol 4-88 reagent were purchased from Calbiochem (San Diego, CA, USA). The Rac1 inhibitor NSC 23766 was obtained from Tocris Cookson Inc. (Ellisville, MO, USA). Proteins in the samples were measured by the Bradford dye binding assay with materials provided by Bio Rad (BioRad, Mississauga, ON, Canada). The chemiluminescence developer Lumiligt<sup>TM</sup> was from Roche (Laval, QC, Canada).

### **Morphological analysis**

The morphology of control and treated cells was evaluated with an inverted microscope (Leica DMRIB, Wetzlar, Germany); the images were acquired with a Retiga Ex-I camera (Q-Imaging, Burnaby, Canada) and treated with the Northern Eclipse v6 program (Empix Imaging, Mississauga, Canada).

### **Fluorescence microscopy**

The cells were grown on glass coverslips. Following treatment cells were fixed with 3.7% formaldehyde and permeabilized with 0.5% Triton-X100 in phosphate buffered saline

(PBS: 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) or with acetone (50%-100%-50%). The cells were blocked with 5% skim milk in PBS. Some cell preparations were labelled with either an antibody to an actin-binding protein or rhodamine-phalloidin (1:900 dilution) to show F-actin distribution. Other cell preparations were double labelled with a combination of two antibodies. Next, the cells were incubated with the corresponding FITC- or TRICT or Cy3-conjugated secondary antibodies. Coverslips were mounted in Mowiol solution (10% w/v Mowiol, 24% glycerol, 0.1 M Tris, pH 8.5). Cells were viewed with a Carl Zeiss Axiophot II fluorescence microscope (Zeiss, Jena, Germany). Pictured were acquired using Northern Eclipse program. For confocal imagery, cells were viewed with a Leica TCS SP confocal microscope.

### **Detection of Erk phosphorylation and nuclear translocation**

Following treatment, the cells were rinsed, and were fixed with 3.7% formaldehyde for 20 minutes and permeabilized with ice-cold methanol for 10 minutes. Cells were blocked with 5% skim milk in PBS. Cells were labelled with anti-phospho-ERK (Thr202/Tyr204) antibody diluted in 1% skim milk in PBS and incubated overnight at 4°C. Next, the cells were incubated with anti-mouse-IgG-FITC. Coverslips were mounted in Mowiol solution containing 1 µg/ml of DAPI to visualise the nuclei.

### **Isolation of membrane and cytosol fractions**

Cells were cultured 48 hours in serum containing-medium, rapidly washed with PBS, scraped and recovered by centrifugation at 1500 x g (Beckman GS-6R; Beckman, Canada) for 10 minutes at 4°C. The cells were rinsed in PBS, resuspended and sonicated in HB buffer (2 mM PMSF, 1 mM EGTA, 2 µg/ml of leupeptin, 2 µg/ml of aprotinin, 4 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 80 mM NaF, 20 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, and 10 µM bpV phen) to obtain total cell lysate.

Twenty  $\mu$ l of total cell lysate (t) were conserved and the remaining lysate was subjected to centrifugation at 120,000 x g (Beckman TLA55; Beckman, Canada) at 4°C for 1 hour. The supernatant was considered as the cytosol-enriched fraction (c). The pellet (P1) was washed in HB buffer and centrifuged again at 120,000 x g (Beckman TLA55; Beckman, Canada) at 4°C for 1 hour. The pellet (P2) was considered as the membrane-enriched fraction (m) and was resuspended in RIPA buffer (150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% DOC, 0.1% SDS, 50 mM Tris, pH 8) and sonicated briefly.

### **Co-immunoprecipitation studies**

Wild type and MHCIIIB (-/-) fibroblasts were washed with cold PBS, scraped in lysis buffer (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH.7.4), 1% NP-40, 100  $\mu$ M PMSF, 5 mg/ml leupeptin, 5  $\mu$ g/ml aprotinin, 10  $\mu$ M bpV(pfen)) and incubated for 1 hour at 4°C. Cell lysates were centrifuged for 20 minutes at 14,000 x g , and 1 ml of each supernatant was incubated with 100  $\mu$ l of protein A Sepharose bead slurry (50%) at 4°C for 1 hour on a rocker to pre-clear the cell lysates. Protein A Sepharose beads were removed by centrifugation at 15,000 x g at 4°C for 10 minutes. Protein concentration in the pre-cleared lysates was determined by the method of Bradford. Pre-cleared supernatants (2 mg/ml) were incubated with either buffer (control) or rabbit anti-MHCIIA, rabbit anti-MHCIIIB, mouse anti-cortactin, rabbit anti-actin or mouse anti-vimentin overnight at 4°C on a orbital rocker. One hundred  $\mu$ l of protein A Sepharose 4B beads, pre-washed with PBS, were added to each sample and the mixtures were further incubated for 4 hours at 4°C. Beads were rinsed several times in lysis buffer, and were finally resuspended in 30  $\mu$ l electrophoresis sample buffer 3x and boiled for 5 minutes. Following centrifugation at 14,000 x g (Beckman microfuge E, Beckman Canada, Mississauga, ON, Canada) at 4°C, the supernatants were subjected to SDS-PAGE. After electrophoresis and electrotransfer, the membranes were incubated with goat anti-vimentin, mouse anti-cortactin, rabbit anti-MHCIIA or rabbit anti-MHCIIIB.

### **Electrophoresis and immunoblotting**

Five to 10  $\mu\text{g}$  of sample proteins were loaded onto 12 % polyacrylamide gels. After electrophoresis, the proteins were transferred onto nitrocellulose membranes. Membranes were quickly stained with Ponceau red to ensure equal loading, rinsed and blocked in Tris-buffered saline (TBS: 140 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4) containing 5% milk and 0.1% Tween for 1hour at room temperature. Membranes were incubated with the first antibody in TBS-5% milk-0.1% Tween followed by incubation with the corresponding secondary antibody coupled to horseradish peroxidase (HRP). After incubation with the antibodies, membranes were stripped and reprobed with anti-non muscle actin. The antigen-antibody reactions were revealed by chemiluminescence. Bands on the films were scanned and the intensity of the bands was quantified by using the Scion Image Program (Scion Corporation, MD, USA). To compare results from different experiments the intensity values were normalized by dividing them by the intensity of the actin band of the corresponding sample.

### **Detection of RhoA and Rac activation**

Detection of activated RhoA, Rac and Cdc42 was performed by using the G-LISA<sup>TM</sup> RhoA activation Assay Biochem Kit<sup>TM</sup>, the G-LISA<sup>TM</sup> Rac activation Assay Biochem Kit<sup>TM</sup> and the G-LISA<sup>TM</sup> Cdc42 activation Assay Biochem Kit<sup>TM</sup> respectively according to the manufacturer's instructions. The assay is based on the specific binding of the active GTP-binding protein to an immobilized acceptor protein. Briefly, wild-type and MHCIIIB (-/-) fibroblasts were lysed and scraped in ice-cold cell lysis buffer. Twenty  $\mu\text{l}$  of cell lysates were used for protein quantification. One mg/ml cell lysate were loaded into the wells of a 96 well plate. GTP-RhoA, GTP-Rac or GTP-Cdc42 in the lysates will bind to the specific acceptor proteins in the wells, while inactive GDP-RhoA, GDP-Rac or GDP-Cdc42 will not, and thus, they will be removed by washing. Bound GTP-RhoA, GTP-Rac or GTP-Cdc42 were detected with a RhoA, Rac or Cdc42 specific antibody respectively. An

internal positive control is provided with each kit. The degree of activation was determined by a colorimetric signal measured at 490 nm using a microplate spectrophotometer.

## **II.6 Acknowledgments**

We thankfully acknowledge the generous gift of the MHCIIB (-/-) and control mouse embryonic fibroblasts to Dr. R.S. Adelstein (Laboratory of Molecular Cardiology, National Heart, Lung and Blood Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). We thank Cytoskeleton Inc for the gift the G-LISA Cdc42 activation Assay Biochem Kit. We express our gratitude to Dr. R.-Marc Pelletier for his editorial assistance and helpful comments. The technical assistance of Mr. C. Charbonneau and Mr. M. Lauzon for the confocal microscopy studies is very much appreciated. This work was funded by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada to MLV. MLV is supported by a scholarship from Fonds de la recherche en santé du Québec.



## II.7 References

- Bao, J., Jana, S. S. and Adelstein, R. S. (2005). Vertebrate nonmuscle myosin II isoforms rescue small interfering RNA-induced defects in COS-7 cell cytokinesis. *J. Biol. Chem.* 280, 19594-19599.
- Bao, J., Ma, X., Liu, C. and Adelstein, R. S. (2008). Replacement of nonmuscle myosin II-B with II-A rescues brain but not cardiac defects in mice. *J. Biol. Chem.* 282, 22101-22111.
- Baumer, Y., Drenckhahn, D. and Waschke, J. (2008). cAMP induced Rac 1-mediated cytoskeletal reorganization in microvascular endothelium. *Histochem Cell Biol* 129, 765-778.
- Betapudi, V., Licate, L. S. and Egelhoff, T. T. (2006). Distinct roles of nonmuscle myosin II isoforms in the regulation of MDA-MB-231 breast cancer cell spreading and migration. *Cancer Res.* 66, 4725-4733.
- Birukov, K. G., Birukova, A. A., Dudek, S. M., Verin, A. D., Crow, M. T., Zhan, X., DePaola, N. and Garcia, J. G. N. (2002). Shear stress-mediated cytoskeleton remodelling and cortactin translocation in pulmonary endothelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 26, 453-464.
- Bresnick, A. R. (1999). Molecular mechanisms of nonmuscle myosin-II regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 26-33.
- Bryce, N. S., Clark, E. S., Leysath, J. L., Currie, J. D., Webb, D. J. and Weaver, A. M. (2005). Cortactin promotes cell motility by enhancing lamellipodial persistence. *Curr. Biol.* 15, 1276-1285.
- Conti, M. A. and Adelstein, R. S. (2008). Nonmuscle myosin II moves in new directions. *J. Cell Sci.* 121, 11-18.
- Cori, G. O. and Ridley, A. J. (2002). Cell motility: braking WAVES. *Nature* 418, 732-733.
- Cosen-Binker, L. I. and Kapus, A. (2006). Cortactin: The gray eminence of the cytoskeleton. *Physiology* 21, 352-361.
- Cowieson, N. P., King, G., Cookson, D., Ross, I., Huber, T., Hume, D. A., Kobe, B. and Martin, J. L. (2008). Cortactin adopts a globular conformation and bundles actin into sheets. *J. Biol. Chem.* 283, 16187-16193.
- Daly, R. J. (2004). Cortactin signalling and dynamic actin networks. *Biochem. J.* 382, 13-25.
- Di Ciano, C., Nie, Z., Szász, K., Lewis, A., Uruno, T., Zhan, X., Rotstein, O. D., Mak, A. and Kapus, A. (2002). Osmotic stress-induced remodelling of the cortical cytoskeleton. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 288, C850-C865.

Eden, S., Rohatgi, R., Podtelejnikov, A. V., Mann, M. and Kirschner, M. W. (2002). Mechanism of regulation of WAVE-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature* 418, 790-793.

Even-Ram, S., Doyle, A. D., Conti, M. A., Matsumoto, K., Adelstein, R. S. and Yamada, K. M. (2007). Myosin IIA regulates cell motility and actomyosin-microtubule crosstalk. *Nature Cell Biol.* 9, 299-309.

Gao, Y., Dickerson, J. B., Guo, F. and Zheng, Y. (2004). Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 101, 7618-7623.

Gatesman, A. and Weed, S. A. (2008). Cortactin branches out: Roles in regulating protrusive actin dynamics. *Cell Motil. Cytoskeleton* 68, 687-707.

Golomb, E., Ma, X., Jana, S. S., Preston, Y. A., Kawamoto, S., Shoham, N. G., Goldin, E., Conti, M. A., Sellers, J. R. and Adelstein, R. S. (2004). Identification and characterization of nonmuscle myosin II-C, a new member of the myosin II family. *J. Biol. Chem.* 279, 2800-2808.

Grosheva, I., Shtutman, M., Elbaum, M. and Berrshadsky, A. D. (2001). p120 catenin affects cell motility via modulation of activity of Rho-family GTPases: a link between cell-cell contact formation and regulation of cell locomotion. *J. Cell Sci.* 114, 695-707.

He, H., Watanabe, T., Zhan, X., Huang, C., Schuuring, E., Fukami, K., Takenawa, T., Kumar, C. C., Simpson, R. J. and Maruta, H. (1998). Role of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in Ras/Rac-induced disruption of the cortactin-actomyosin II complex and malignant transformation. *Mol. Cell Biol.* 18, 3829-3837.

Head, J. A., Jiang, D., Li, M., Zorn, L. J., Schaeffer, E. M., Parsons, J. T. and Weed, S. A. (2003). Cortactin tyrosine phosphorylation requires Rac1 activity and association with the cortical actin cytoskeleton. *Mol. Biol. Cell* 14, 3216-3229.

Heasman, S. J. and Ridley, A. J. (2008). Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from *in vivo* studies. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology* 9, 690-701.

Huang, C., Jacobson, K. and Schaller, M. D. (2004). MAP kinases and cell migration. *J. Cell Sci.* 117, 4619-4628.

Huang, C., Liu, J., Haudenschild, C. C. and Zhan, X. (1998). The role of tyrosine phosphorylation of cortactin in the locomotion of endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 273, 25770-25776.

Illés, A., Enyedi, B., Tamás, P., Balázs, A., Bögel, G. and Buday, L. (2006). Induced phosphorylation of cortactin is not necessary for cortactin-mediated actin polymerization. *Cell. Signalling* 18, 830-840.

Ivanov, A. I., McCall, I. C., Parkos, C. A. and Nusrat, A. (2004). Role for actin filament turnover and myosin II motor in cytoskeleton-driven disassembly of the epithelial apical junctional complex. *Mol. Biol. Cell* 15, 2639-2651.

Kaksonen, M., Peng, H. B. and Rauvala, H. (2000). Association of cortactin with dynamic actin in lamellipodia and on endosomal vesicles. *J. Cell Sci.* 113, 4421-4426.

Katsumi, A., Milanini, J., Kiosses, W. B., del Pozo, M. I., Kaunas, R., Chien, S., Hahn, K. M. and Schwartz, M. A. (2002). Effects of cell tension on the small GTPase Rac. *J. Cell Biol.* 158, 153-164.

Kelly, C. A., Sellers, J. R., Gard, D. L., Bui, D., Adelstein, R. S. and Baines, I. C. (1996). *Xenopus* nonmuscle myosin heavy chain isoforms have different subcellular localization and enzymatic activities. *J. Cell Biol.* 134, 675-687.

Kolega, J. (2003). Asymmetric distribution of myosin IIB in migrating endothelial cells is regulated by a rho-dependent kinase and contributes to tail retraction. *Mol. Biol. Cell* 14, 4745-4757.

Kolega, J. (2006). The role of myosin II motor activity in distributing myosin asymmetrically and coupling protrusive activity to cell translocation. *Mol. Biol. Cell* 17, 4435-4445.

Kovács, M., Tóth, T., Hetényi, C., Málnási-Csizmadia, A. and Sellers, J. R. (2004). Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II. *J. Biol. Chem.* 279, 35557-35563.

Kruchten, A. E., Krueger, E. W., Wang, Y. and McNiven, M. A. (2008). Distinct phosphoforms of cortactin differentially regulate actin polymerization and focal adhesions. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 295, C113-C1122.

Lai, F. P. L., Szczodrak, M., Block, J., Faix, J., Breitsprecher, D., Mannherz, H. G., Stradal, T. E. B., Dunn, G. A., Small, J. V. and Rottner, K. (2008). Arp2/3 complex interactions and actin network turnover in lamellipodia. *EMBO J.* 27, 982-992.

Lo, C.-M., Buxton, D. B., Chua, G. C. H., Dembo, M., Adelstein, R. S. and Wang, Y. L. (2004). Nonmuscle myosin IIB is involved in the guidance of fibroblast migration. *Mol. Biol. Cell* 15, 982-989.

Murakami, N., Kotula, L. and Hwang, Y.-W. (2000). The distinct mechanisms for regulation of nonmuscle myosin assembly via the heavy chain: phosphorylation for MIIB and Mts binding for MIIA. *Biochemistry* 39, 11441-11451.

Pankov, R., Endo, Y., Even-Ram, S., Araki, M., Cukierman, E., Matsumoto, K. and Yamada, K. M. (2005). A Rac switch regulates random versus directionally persistent cell migration. *J. Cell Biol.* 170, 793-802.

Pollard, T. D. (2007). Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 36, 451-477.

Ray, R. M., Vaidya, R. J. and Johnson, L. R. (2007). MEK/ERK regulates adherens junctions in migration through Rac1. *Cell Motil. Cytoskeleton* 64, 143-156.

Ridley, A. J. (2001). Rho GTPases and cell migration. *J. Cell Sci.* 114, 2713-2722.

Ridley, A. J. (2006). Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *TICB* 16, 522-529.

Ridley, A. J., Paterson, H. F., Johnston, C. L., Diekman, D. and Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein Rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 70, 401-410.

Saitoh, T., Takemura, S., Ueda, K., Hosoya, H., Nagayama, M., Haga, H., Kawabata, K., Yamagishi, A. and Takahashi, M. (2001). Differential localization of non-muscle myosin II isoforms and phosphorylated regulatory light chains in human MRC-5 fibroblasts. *FEBS Lett.* 509, 365-369.

Sandquist, J. C., Swenson, K. I., DeMail, K. A., BurrIDGE, K. and Means, A. R. (2006). Rho kinase differentially regulates phosphorylation of nonmuscle myosin isoforms A and B during cell rounding and migration. *J. Biol. Chem.* 281, 35873-35883.

Selbach, M. and Backert, S. (2005). Cortactin: an Achilles' heel of the actin cytoskeleton targeted by pathogens. *TRENDS Microbiol.* 13, 181-189.

Sharma, A. and Mayer, B. J. (2008). Phosphorylation of p130Cas initiates rac activation and membrane ruffling. *BMC Cell Biol* 9, 50-65.

Solinet, S. and Vitale, M. L. (2008). Isoform B of myosin II heavy chain mediates actomyosin contractility during TNF $\alpha$ -induced apoptosis. *J. Cell Sci.* 121, 1681-1892.

Straussman, R., Even, L. and Ravid, S. (2001). Myosin II heavy chain isoforms are phosphorylated in an EGF-dependent manner: involvement of protein kinase C. *J. Cell Sci.* 114, 3047-3057.

Suetsugu, S., Yamazaki, D., Kurisu, S. and Takenawa, T. (2003). Differential roles of WAVE1 and WAVE2 in dorsal and peripheral ruffle formation for fibroblast cell migration. *Dev. Cell* 5, 595-609.

Takahashi, M., Kawamoto, S. and Adelstein, R. S. (1992). Evidence for inserted sequences in the head region of nonmuscle myosin specific to the nervous system. Cloning of the cDNA encoding the myosin heavy chain-B isoform of vertebrate nonmuscle myosin. *J. Biol. Chem.* 267, 17864-17861.

Takenawa, T. and Suetsugu, S. (2007). The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology* 8, 37-48.

Urano, T., Liu, J., Zhang, P., Fan, Y., Eglie, C., Li, R., Mueller, S. C. and Zhan, X. (2001). Activation of Arp2/3 complex-mediated actin polymerization by cortactin. *Nature Cell Biol.* 3, 259-266.

Vicente-Manzanares, M., Zareno, J., Whitmore, L., Choi, C. K. and Horwitz, A. F. (2007). Regulation of protrusion, adhesion dynamics, and polarity by myosins IIA and IIB in migrating cells. *J. Cell Biol.* 176, 573-580.

Vidali, L., Chen, F., Cicchetti, G., Ohta, Y. and Kwiatkowski, D. J. (2006). Rac1-null mouse embryonic fibroblasts are motile and respond to platelet-derived growth factor. *Mol. Biol. Cell* 17, 2377-2390.

Vitale, M. L. and Carbajal, M. E. (2004). Involvement of myosin II in dopamine-induced reorganization of the lactotroph cell's actin cytoskeleton. *J. Histochem. Cytochem.* 52, 517-527.

Weaver, A. M., Karginov, A. V., Kinley, A. W., Weed, S. A., Li, Y., Parsons, J. T. and Cooper, J. A. (2001). Cortactin promotes and stabilizes Arp2/3-induced actin filament network formation. *Curr. Biol.* 11, 370-374.

Weed, S. A., Du, Y. and Parsons, J. T. (1998). Translocation of cortactin to the cell periphery is mediated by the small GTPase Rac1. *J. Cell Sci.* 111, 2433-2443.

Well, C. M., Walmsley, M., Ooi, S., Tybulewicz, V. and Ridley, A. J. (2004). Rac1-deficient macrophages exhibit defects in cell spreading and membrane ruffling but not migration. *J. Cell Sci.* 117, 1259-1268.

Zheng, G. F., Solinet, S., Pelletier, R.-M. and Vitale, M. L. (2005). Actin cytoskeleton remodelling in the anterior pituitary folliculo-stellate cell line TtT/GF: Implication of the actin-binding protein cortactin. *J. Mol. Histol.* 36, 461-474.

## II.8 Figures and legends

**Figure 1.** Morphological differences between wild type and MHCIIIB (-/-) embryonic fibroblasts. Distribution of actin and isoforms A and B of myosin II. Page 175.

**Figure 2.** Cortactin distribution in wild type and MHCIIIB (-/-) fibroblasts. Page 177.

**Figure 3.** P-Cortactin distribution in wild type and MHCIIIB (-/-) fibroblast. Page 179.

**Figure 4.** Co-immunoprecipitation studies on the interaction between cortactin and MHCIIA and MHCIIIB. Page 181.

**Figure 5.** Confocal microscopy studies on the co-localization of cortactin, and MHCIIA in wild type and MHCIIIB (-/-) fibroblasts. Page 183.

**Figure 6.** Rac1 activation and subcellular distribution were affected by the absence of MHCIIIB. Page 185.

**Figure 7.** Effect of Rac1 inhibition on the morphology of MHCIIIB (-/-) fibroblasts and on Rac1 and cortactin distribution. Page 187.

**Figure 9.** Effect of blebbistatin and NSC23766 on GTP-Rac levels in wild type and MHCIIIB (-/-) fibroblasts. Page 189.

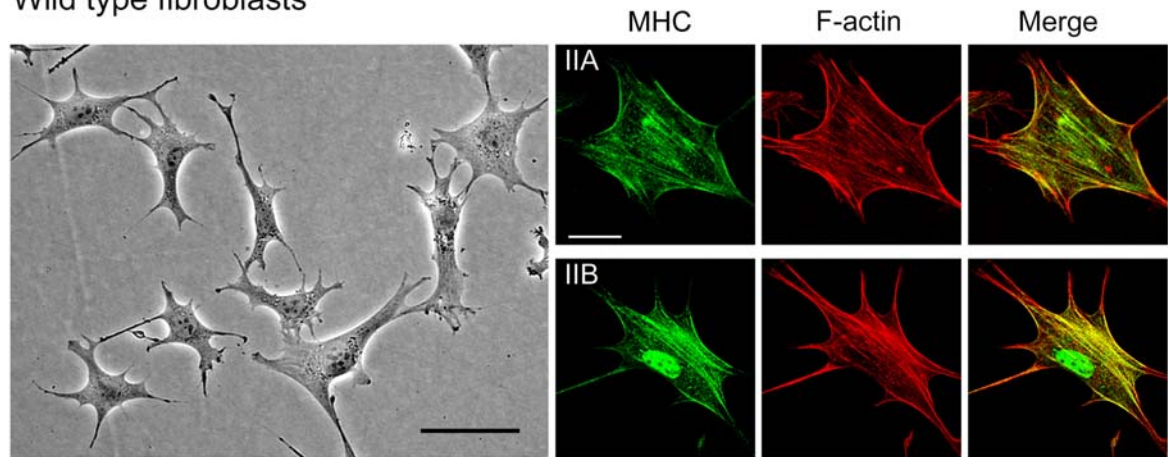
**Figure 8.** Effect of blebbistatin on the cell morphology, and on cortactin and Rac1 distribution in wild type fibroblasts. Page 191.

**Figure 10.** Effect of bFGF on the morphology of wild type and MHCIIIB (-/-) fibroblasts. Page 193.

**Figure 11.** Activation of the Erk1/2 signaling pathway in the wild type and in the MHCIIIB (-/-) fibroblasts. Page 195.

**Figure 12.** Immunofluorescence studies on the distribution of cortactin in bFGF-treated wild type and MHCIIIB (-/-) fibroblasts. Page 197.

## Wild type fibroblasts



## MHCIIB (-/-) fibroblasts

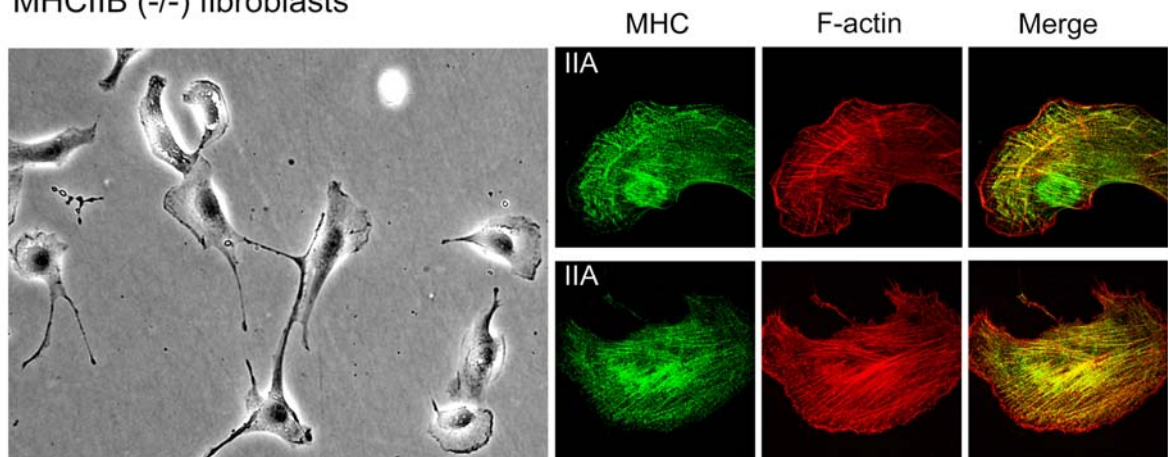


Figure 1

**Figure 1. Morphological differences between wild type and MHCII B (-/-) embryonic fibroblasts. Distribution of actin and isoforms A and B of myosin II.**

Wild type and MHCII B (-/-) embryonic fibroblasts were cultured in serum containing medium. The left panels show phase contrast micrographs of wild type fibroblasts depicting a typical flat morphology with several membrane projections, whereas MHCII B (-/-) fibroblasts displayed a large lamellipodium and none or very few membrane projections. Scale bar: 100  $\mu$ m. The right panels show confocal microscopy images of myosin II isoforms and F-actin distribution in wild type and MHCII B (-/-) fibroblasts. The cells were processed for fluorescence microscopy with MHCII A or MHCII B antibodies followed by FITC-conjugated anti-rabbit IgG and rhodamine-phalloidin. MHCII A and MHCII B labelling in wild type fibroblasts was associated with the plasma membrane and with thin cytoplasmic actin filaments. In MHCII B (-/-) fibroblasts, MHCII A was absent from the cell cortex and was mainly associated with actin filaments. In these cells, MHCII A co-localization with F-actin was particularly evident in the lamella but there was no co-localization at the leading edge of the lamellipodium. Scale bar: 25  $\mu$ m.



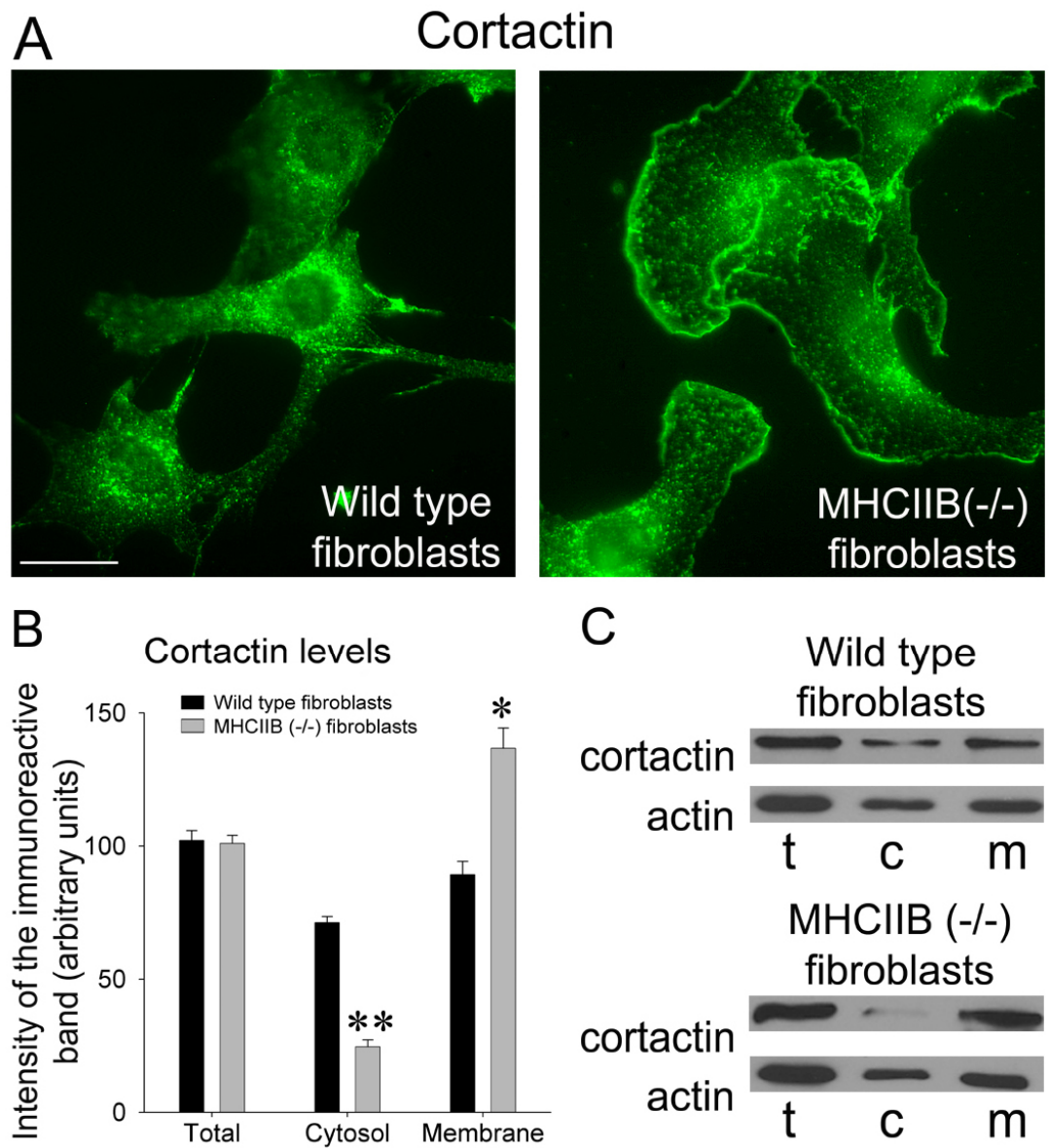
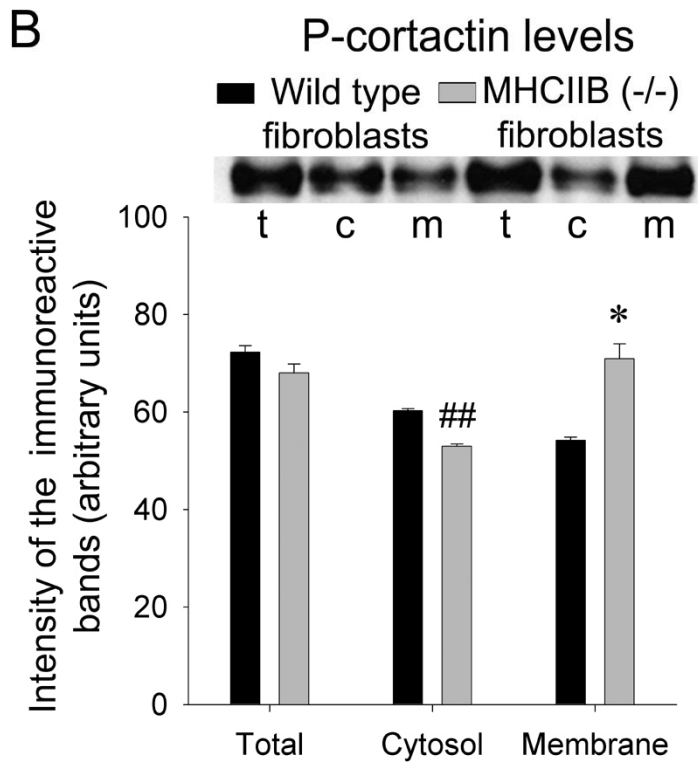
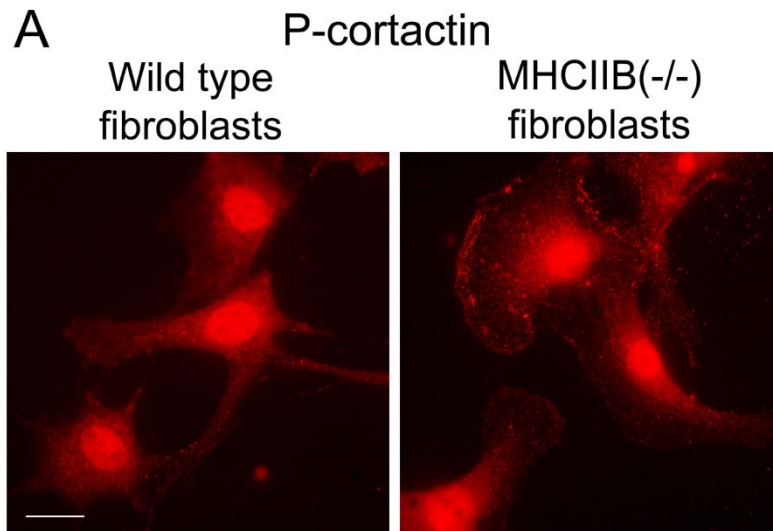


Figure 2

**Figure 2. Cortactin distribution in wild type and MHCIIIB (-/-) fibroblasts.**

**A).** Immunofluorescence studies on cortactin distribution. Cells were cultured in serum containing medium and processed for fluorescence microscopy with cortactin and P-cortactin (shown in Figure 3) antibodies followed by FITC-conjugated anti-mouse IgG and Cy3-conjugated anti-rabbit IgG. In wild type fibroblasts, cortactin depicted a punctate staining that was mainly concentrated in the perinuclear region. The cell processes were also positive for cortactin. Cortactin distribution in MHCIIIB (-/-) fibroblasts was associated to the leading edge of lamellipodia, the punctate cytoplasmic staining was more diffuse than in the wild type fibroblasts. Scale bar: 25  $\mu$ m. **B).** Distribution of cortactin within subcellular fractions. The cells were harvested and membrane- and cytosol-enriched fractions were prepared. Proteins in the subcellular fractions were subjected to SDS-PAGE followed by immunoblotting with the cortactin antibody. Membranes were stripped and reprobed with anti-P(Y421)-cortactin (shown in Figure 3), the membrane area corresponding to proteins of MW around 40 kDa was cut and incubated with anti-actin as a loading control. The immunoreactive bands were scanned and cortactin immunoreactive band intensity values were normalized to the corresponding actin band intensity value. Values shown are the mean  $\pm$  s.e.m. of three independent experiments. Cytosolic cortactin levels were significantly lower (\*\*  $P < 0.0001$ ) in MHCIIIB (-/-) fibroblasts than in wild type fibroblasts. Membrane cortactin levels were significantly higher (\*  $P < 0.01$ ) in MHCIIIB (-/-) fibroblasts than in wild type fibroblasts. Panel **C)** shows representative Western blots of cortactin subcellular distribution: t: total; c: cytosol-enriched fraction; m: membrane-enriched fraction.



**Figure 3**

**Figure 3. P-Cortactin distribution in wild type and MHCIIIB (-/-) fibroblast.**

**A).** Immunofluorescence studies on P-cortactin distribution. Cells were cultured in serum containing medium and processed for fluorescence microscopy with cortactin (shown in Figure 2) and P-cortactin antibodies followed by FITC-conjugated anti-mouse IgG and Cy3-conjugated anti-rabbit IgG. The micrographs correspond to the same cells shown in Figure 2. In wild type fibroblasts, P-cortactin showed a punctate staining that was concentrated in the perinuclear region. P-cortactin distribution in MHCIIIB (-/-) fibroblasts was associated to the leading edge and to the rear of the lamellipodium and the punctate cytoplasmic staining was more diffuse than in the wild type fibroblasts. The nuclear labelling is non-specific. Scale bar: 25  $\mu$ m. **B).** Sub-cellular distribution of cortactin. The cells were harvested and the membrane- and cytosol-enriched fractions were prepared. Proteins in the subcellular fractions were subjected to SDS-PAGE followed by immunoblotting with cortactin antibody (shown in Figure 2), stripped and reprobed with anti-P-cortactin (this figure). The figure shows representative Western blots of the subcellular distribution of P-cortactin. t: total; c: cytosol-enriched fraction; m: membrane-enriched fraction. The immunoreactive bands were scanned and P-cortactin immunoreactive band intensity values were normalized to the corresponding actin band intensity value. Values shown are the mean  $\pm$  S.e.m of three independent experiments. Cytosolic P(Y421)-cortactin levels were significantly lower (###  $P < 0.0005$ ) in MHCIIIB (-/-) fibroblasts than in wild type fibroblasts. Membrane P(Y421)-cortactin levels were significantly higher (\*  $P < 0.01$ ) in MHCIIIB (-/-) fibroblasts than in wild type fibroblasts.

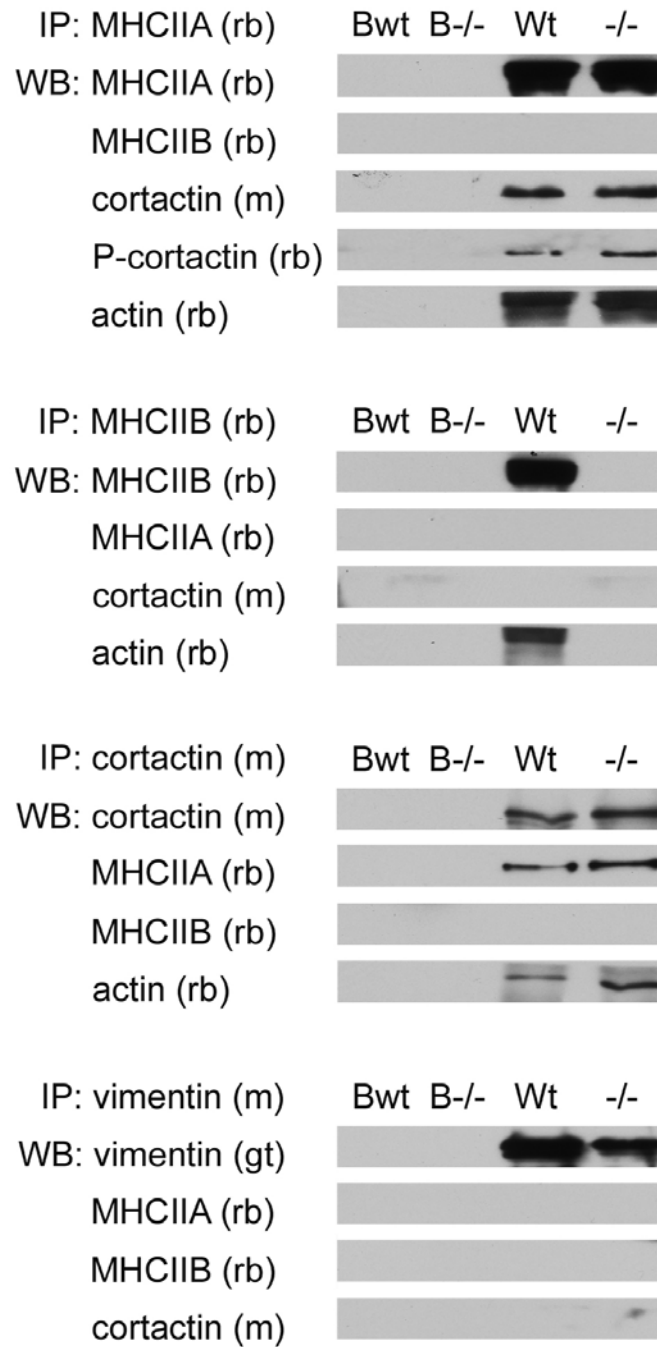


Figure 4

**Figure 4. Co-immunoprecipitation studies on the interaction between cortactin and MHCIIA and MHCIIIB.**

Pre-cleared supernatants from wild type and MHCIIIB (-/-) fibroblasts were incubated with either one of the following antibodies: rabbit (rb) anti-MHCIIA, rabbit (rb) anti-MHCIIIB, mouse (m) anti-cortactin, rabbit (rb) anti-actin or mouse (m) anti-vimentin (referred as to Wt and -/- in the figure) or buffer alone (referred as to Bw and B-/- in the figure). Next, the mixtures were incubated with protein A Sepharose beads. Beads were recovered, rinsed, resuspended and the proteins attached to the beads were subjected to SDS-PAGE with (rb) anti-MHCIIA, (rb) anti-MHCIIIB, (m) anti-cortactin, (rb) anti-P-cortactin, (rb) anti-actin and goat (gt) anti-vimentin. The figure shows representative membranes. The MHCIIA antibody co-immunoprecipitated cortactin, P-cortactin and actin but not MHCIIIB. The MHCIIIB antibody co-immunoprecipitated actin but not cortactin or MHCIIA. Controls included: the incubation of the cell lysates with buffer alone (Bwt and B-/-) the performance of the reciprocal co-immunoprecipitation: MHCIIA-cortactin and cortactin-MHCIIA, and the use of an antibody to a protein (vimentin) that does not interact with both myosin II and cortactin.

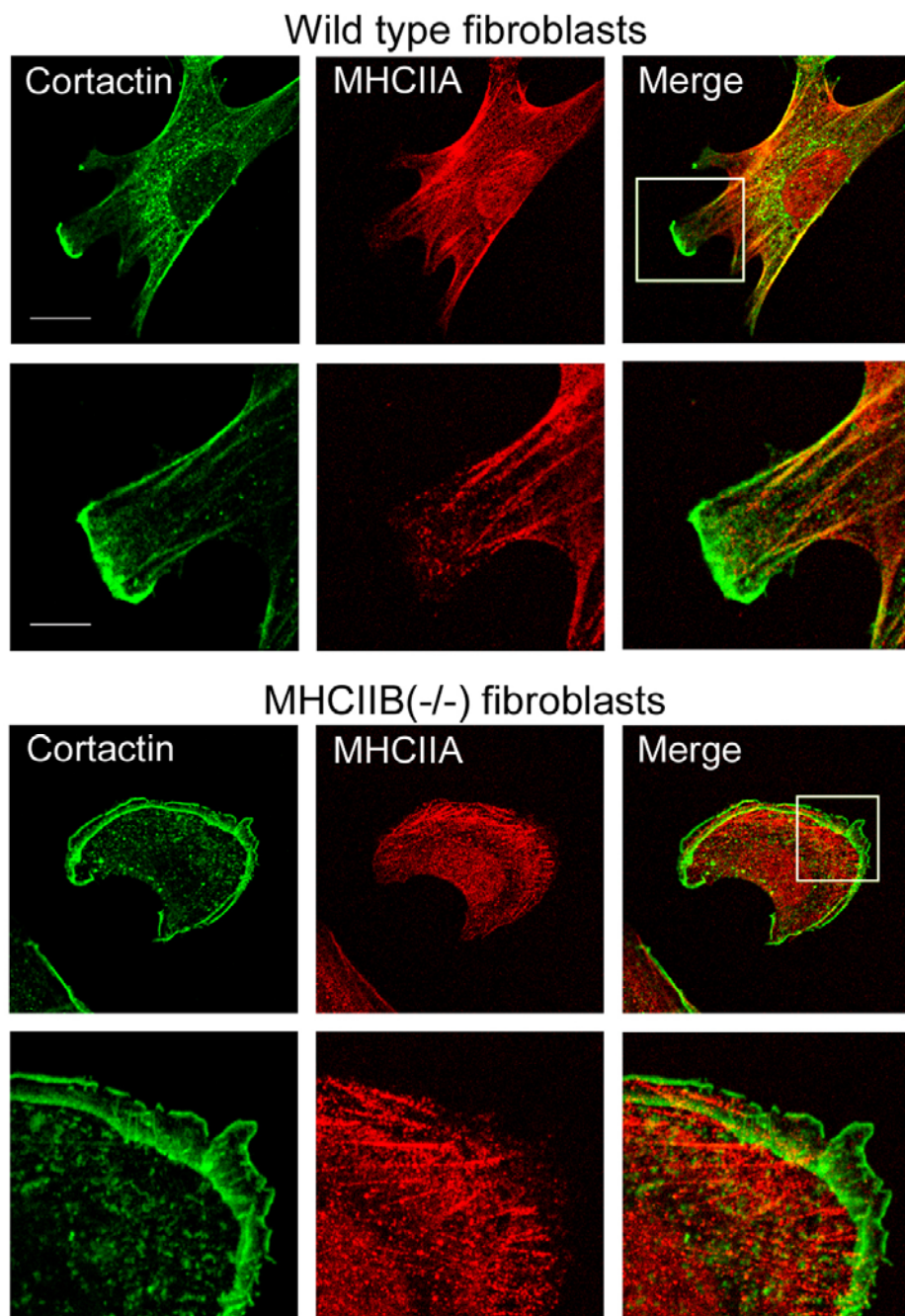


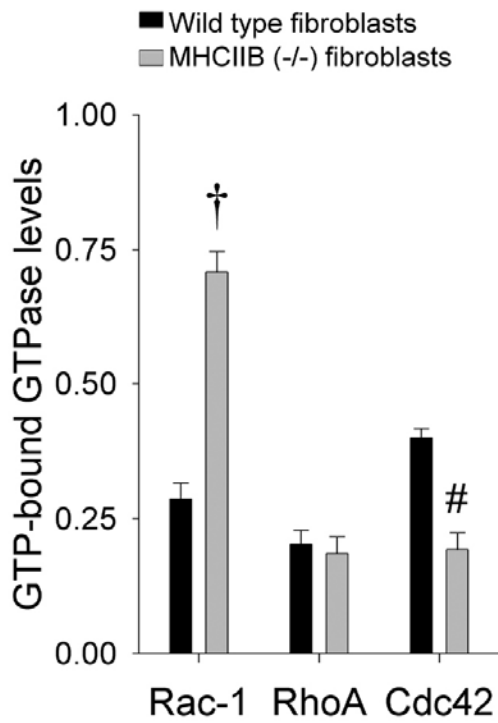
Figure 5

**Figure 5. Confocal microscopy studies on the co-localization of cortactin, and MHCIIA in wild type and MHCIIIB (-/-) fibroblasts.**

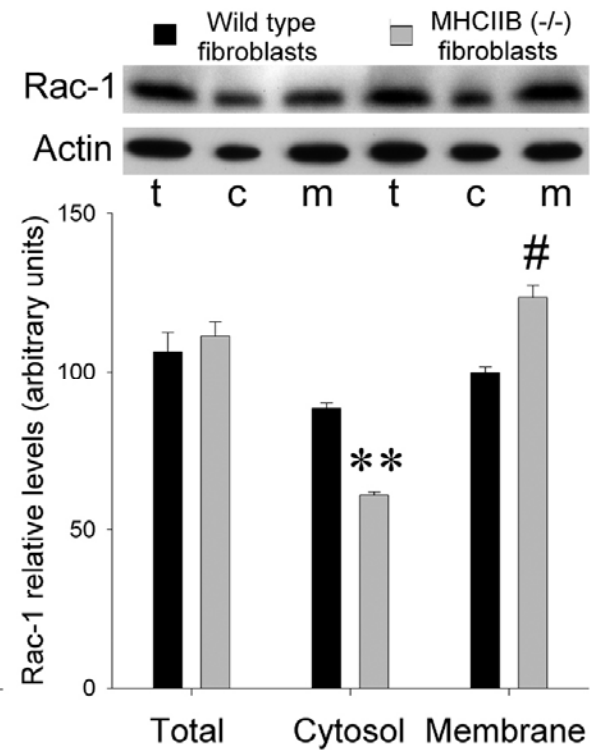
Cells cultured in serum containing medium were processed for fluorescence microscopy and double labelled with cortactin and MHCIIA antibodies. Cells were viewed with a confocal microscope. The figure shows representative micrographs. Cortactin and MHCIIA co-localized on cytoplasmic and cortical areas but not at the leading edge of membrane protrusions in wild type fibroblasts. Co-localization of cortactin and MHCIIA in the lamellipodium of MHCIIIB (-/-) fibroblasts was not evident. Scale bar: 25  $\mu\text{m}$ . Inset scale bar: 5  $\mu\text{m}$ .



### A Rac-1 activation



### B Rac-1 levels



### C Rac-1 distribution

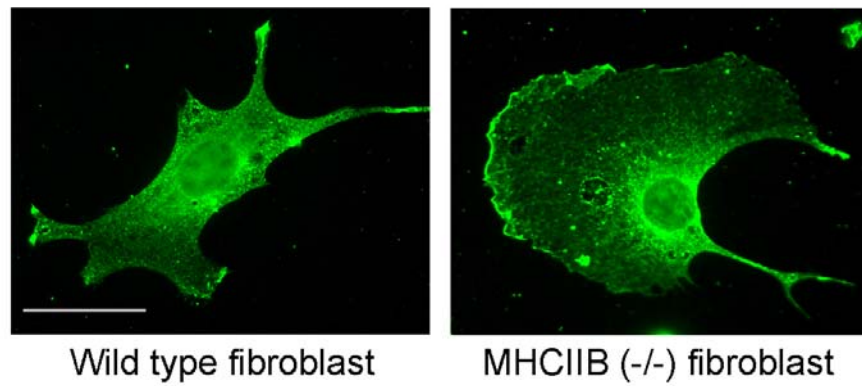


Figure 6

**Figure 6. Rac1 activation and subcellular distribution were affected by the absence of MHCIIB.**

Wild type and MHCIIB (-/-) fibroblasts were incubated in serum-containing medium. **A).** Cell lysates were prepared and quantification of GTP-bound Rac, GTP-bound RhoA and GTP-bound Cdc42 in the lysates was carried out with specific G-LISA kits. Data are expressed in optical density at 490 nm and the bars represent the mean  $\pm$  S.e.m of seven to three independent experiments. GTP-bound Rac levels were significantly higher in MHCIIB (-/-) than in wild type fibroblasts ( $\dagger$   $P < 0.00001$ ). GTP-bound RhoA levels were similar in both cell lines. GTP-bound Cdc42 levels were significantly lower in MHCIIB (-/-) fibroblasts than in wild type fibroblasts ( $\#$   $P < 0.005$ ). **B).** Wild type and MHCIIB (-/-) cell lysates were obtained and total (t), cytosol-enriched (c) and membrane-enriched (m) fractions were prepared. Proteins in the fractions were subjected to SDS-PAGE followed by immunoblotting with a monoclonal Rac1 antibody. Membranes were stripped and reprobbed with anti-actin. Panel B also shows representative Western blots. The bands were scanned and Rac1 immunoreactive band intensity values were normalized to the corresponding actin band intensity value. Values shown are the mean  $\pm$  S.e.m of three independent experiments. **\*\*** $P < 0.0001$  cytosol-enriched fraction in MHCIIB (-/-) vs wild type fibroblasts; **#**  $P < 0.005$  membrane-enriched fraction in MHCIIB (-/-) vs wild type fibroblasts. **C).** Cells were labelled with anti-Rac1 followed by FITC-conjugated anti-mouse IgG. Rac1 was mostly cytoplasmic with some labelling at the tip of membrane projections in wild type fibroblasts whereas there was an increased labelling of the leading edge of the lamellipodium in MHCIIB (-/-) fibroblasts. Scale bar: 50  $\mu$ m.



**Figure 7. Effect of Rac1 inhibition on the morphology of MHCIIIB (-/-) fibroblasts and on Rac1 and cortactin distribution.**

MHCIIIB (-/-) fibroblasts were incubated in the absence (control) or in the presence of 200  $\mu$ M NSC 23766 for 16 hours. Next, the cells were processed for microscopy or for immunofluorescence with monoclonal anti-cortactin and polyclonal anti-Rac1 or with polyclonal anti MHCIIA and monoclonal anti-cortactin. **A)** Phase contrast images of control and NSC23766-treated MHCIIIB fibroblasts. The control cells showed prominent lamellipodia that disappeared with the treatment. Scale bar: 100  $\mu$ m. **B)** The figure shows representative confocal images of treated MHCIIIB (-/-) fibroblasts. Inhibition of Rac1 activation caused the redistribution of cortactin and Rac1 from the leading edge of lamellipodia (distribution seen in non-treated cells, see Figures 2 and 6) to the cytosol. Cortactin and Rac1 did not co-localize in NSC23766 treated cells. MHCIIA was associated with cortical and cytoplasmic filamentous structures. MHCIIA and cortactin colocalize at the cell cortex. Scale bar: 25  $\mu$ m.

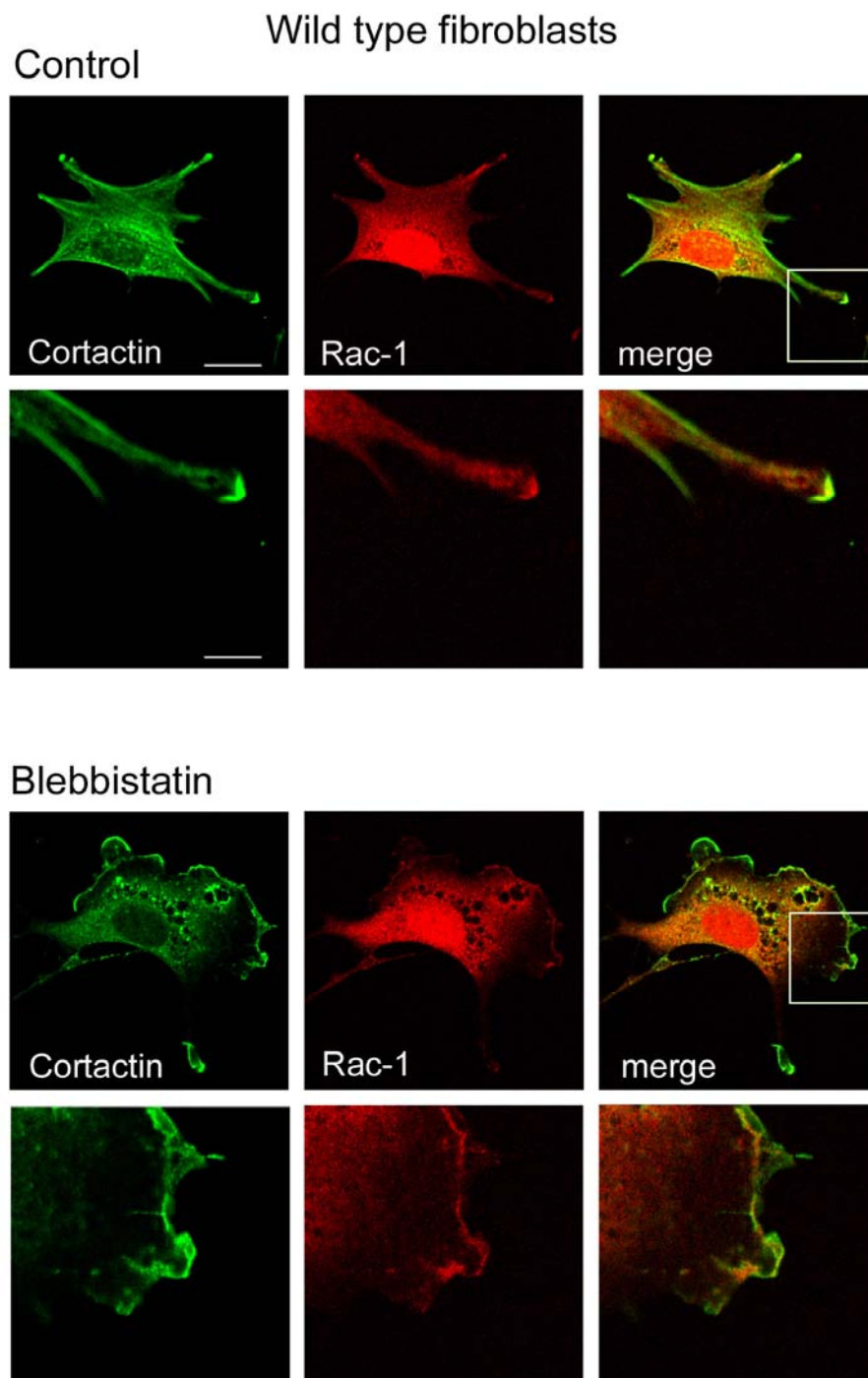


Figure 8

**Figure 8. Effect of blebbistatin on the cell morphology, and on cortactin and Rac1 distribution in wild type fibroblasts.**

Wild type fibroblasts cultured in serum containing medium were treated with medium alone (control) or with 50  $\mu$ M blebbistatin for 90 minutes. Next, the cells were processed for fluorescence microscopy and double labelled with cortactin monoclonal and Rac1 polyclonal antibodies. At the cell membrane, cortactin and Rac1 labelling were associated with the tip of cell projections but they did not overlap. Blebbistatin treatment induced the formation of wide lamellipodia in wild type fibroblasts, and the association of cortactin and Rac1 labelling with the leading edge of lamellipodia. Scale bar: 25  $\mu$ m. Inset scale bar: 5  $\mu$ m.

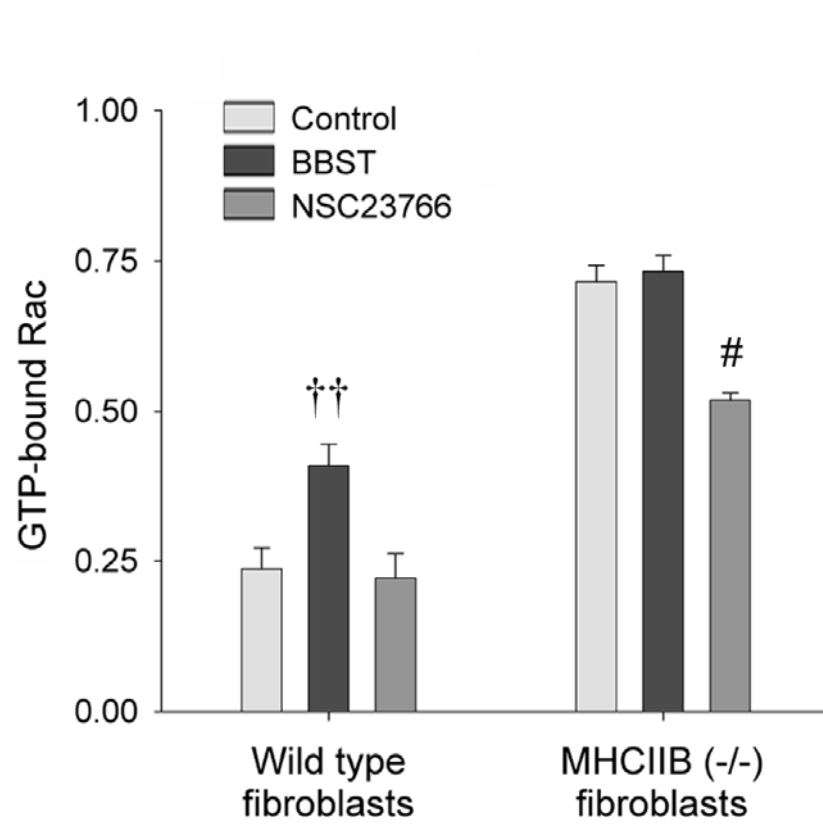


Figure 9

**Figure 9. Effect of blebbistatin and NSC23766 on GTP-Rac levels in wild type and MHCIIIB (-/-) fibroblasts.**

Wild type and MHCIIIB (-/-) fibroblasts were incubated in serum-containing medium (Control) or incubated with 50  $\mu$ M blebbistatin for 90 minutes (BBST) or with 200  $\mu$ M NSC23766 for 16 hours (NSC23766). Next, cell lysates were prepared and quantification of GTP-bound Rac in the lysates was carried out with a specific G-LISA kit. Data are expressed in optical density at 490 nm and the bars represent the mean  $\pm$  S.e.m of three independent experiments. GTP-bound Rac levels were significantly higher in BBST-treated than in control wild type fibroblasts ( $\dagger\dagger$   $P < 0.03$ ). GTP-bound Rac levels were significantly lower in NSC23766-treated than in control MHCIIIB (-/-) fibroblasts ( $\#$   $P < 0.005$ ).



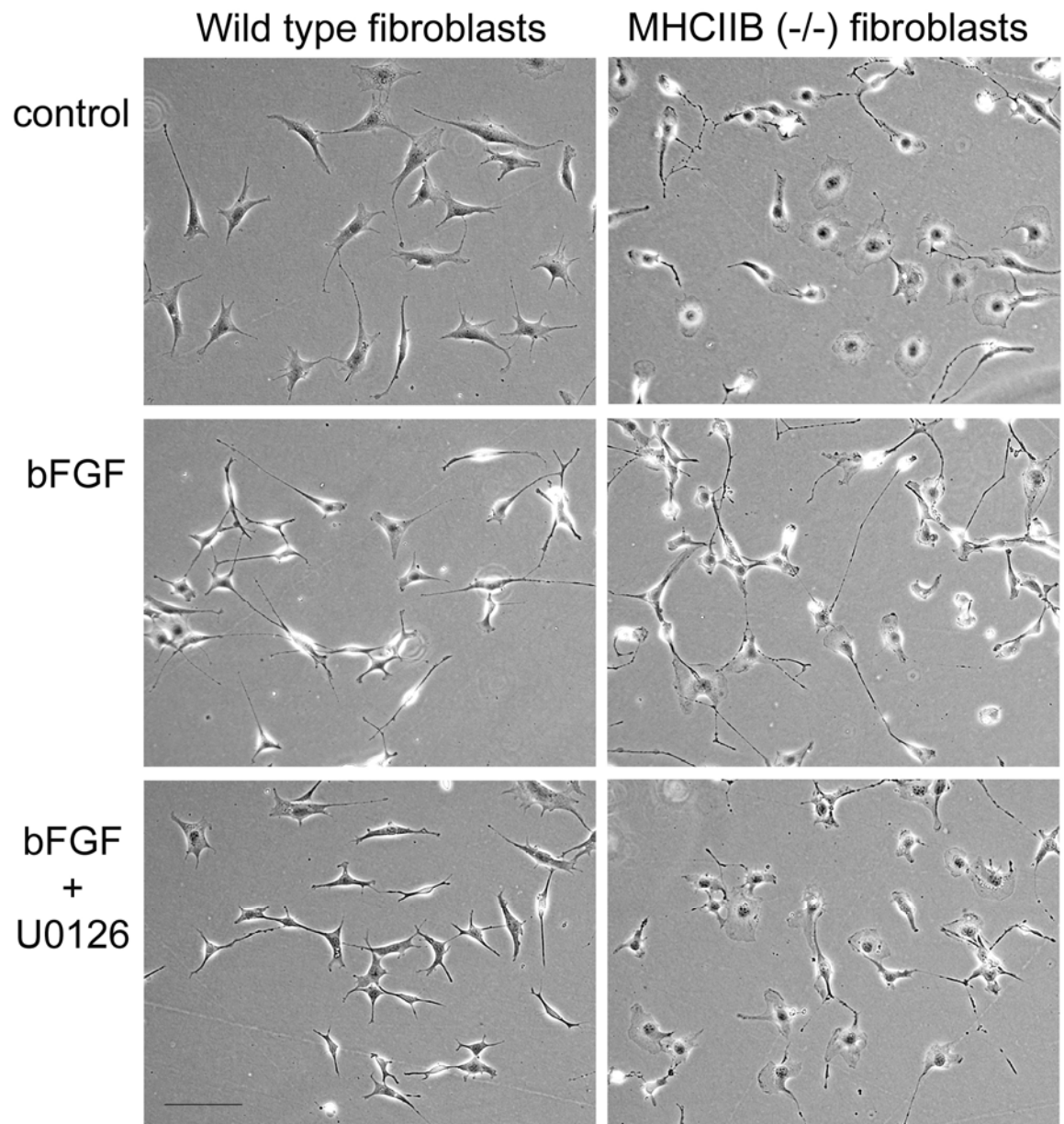


Figure 10

**Figure 10. Effect of bFGF on the morphology of wild type and MHCIIIB (-/-) fibroblasts.**

Wild type and MHCIIIB (-/-) fibroblasts were serum-starved for 16 hours and next they were challenged with 10 ng/ml bFGF for an additional period of 16hs. Serum-starved wild type fibroblasts were flat and possessed membrane projections, most MHCIIIB (-/-) fibroblasts were rounded with none or very few membrane projections. Treatment with bFGF induced the acquisition of an elongated, fusiform shape by the wild type fibroblasts (contracted cytoplasm). In MHCIIIB (-/-) fibroblasts, bFGF induced the formation of a long projection at the opposite site of the lamellipodium. The effect of bFGF was blocked by the MEK inhibitor U0126 (5  $\mu$ M, final concentration) in both cells lines. Scale bar: 100  $\mu$ m.

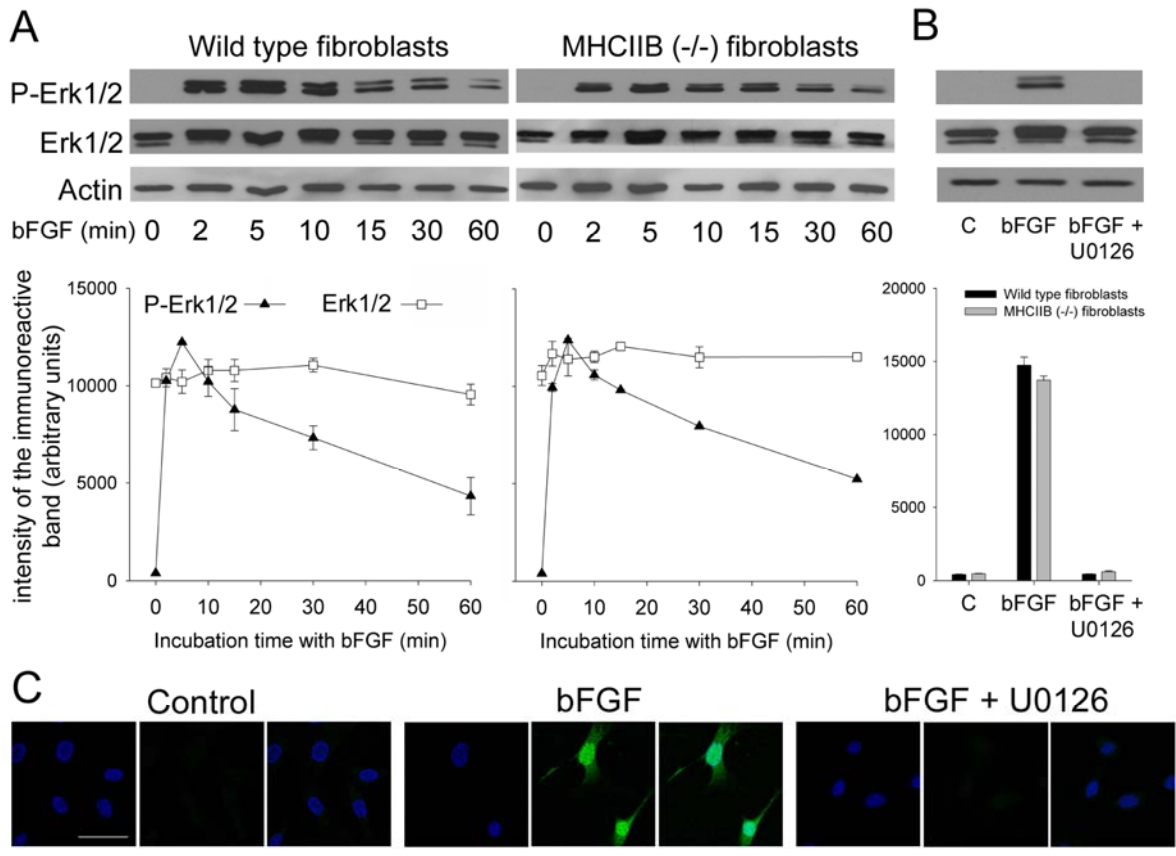


Figure 11

**Figure 11. Activation of the Erk1/2 signaling pathway in the wild type and in the MHCIIB (-/-) fibroblasts.**

Cells were serum deprived for 24 hours before treatment. The cells were incubated with 10 ng/ml bFGF in serum-free medium for 0 to 60 minutes. **A).** Other cultures were preincubated for 30 minutes with medium alone (c) or with bFGF in the absence or in the presence of the MEK inhibitor U0126 (5  $\mu$ M). **B).** Cells were next washed quickly with PBS, lysed in electrophoresis sample buffer to obtain a total-cell lysate. After a brief sonication, the samples were heated, centrifuged and subjected to SDS-PAGE and Western blotting. Membranes were first incubated with an antibody that specifically recognizes the phosphorylated (activated) forms of Erk1/2 (P-Erk1/2); next, the membranes were thoroughly rinsed and incubated with Erk 1/2 antibodies and finally the membranes were re probed with anti-actin as a loading control. Panels A and B show representative Western blots. The bands were scanned and the P-Erk1/2 and Erk1/2 immunoreactive band intensity values were normalized to the corresponding actin band intensity value. Values shown are the mean  $\pm$  S.e.m of three independent experiments. Following bFGF treatment Erk1/2 are rapidly and transiently phosphorylated. The kinetics of Erk activation is similar in both cell lines. The activation of Erk is blocked by inhibition of MEK. **C).** Cells were cultured on glass coverslips in serum-free medium for 16 hours and next treated with bFGF for 5 minutes. Following the treatment, the cells were subjected to immunofluorescence microscopy with anti-P-Erk1/2 and DAPI to identify the nuclei. bFGF treatment caused the MEK-dependent increase in P-Erk1/2 immunoreactivity in the cytoplasm and in the nucleus of both wild type and MHCIIB (-/-) fibroblasts. Scale bar: 75  $\mu$ m.

## Cortactin

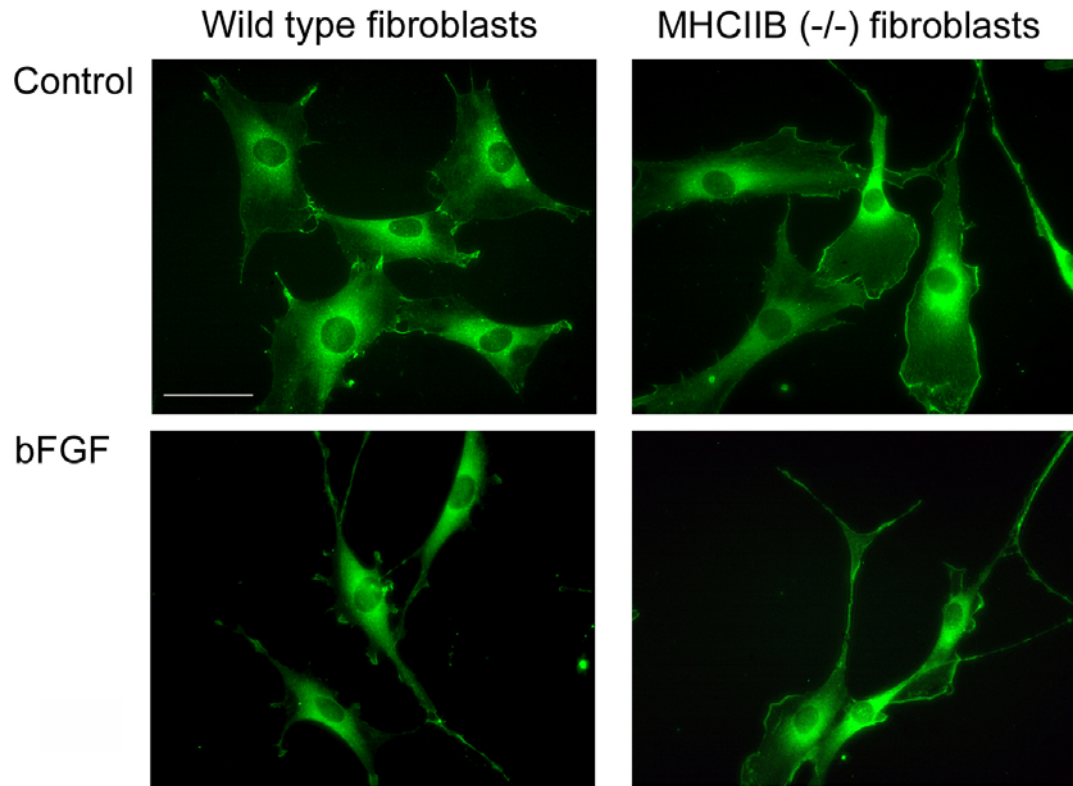


Figure 12

**Figure 12. Immunofluorescence studies on the distribution of cortactin in bFGF-treated wild type and MHCIIIB (-/-) fibroblasts.**

Cells grown in serum-free medium were incubated for 16 hours with 10 ng/ml bFGF. Following treatment, the cells were processed for fluorescence microscopy with the cortactin antibody. In control, wild type fibroblasts, cortactin labelling was associated with the perinuclear area, with the tip of short membrane projections and with the cell-to-cell contact membrane regions. The perinuclear region, the membrane of the flat lamellipodium and of the cell projections were labelled by the cortactin antibody in MHCIIIB (-/-) fibroblasts. In bFGF-treated, wild type fibroblasts, cortactin occupied the whole cytoplasm and also localized to the long membrane processes and to the tip of membrane ruffles. In bFGF-treated MHCIIIB (-/-) fibroblasts, cortactin was associated with the membrane of lamellipodia and with the membrane of the long cell process. Scale bar: 70  $\mu$ m.

## II.9 Supplementary data

**Figure S1.** Effect of blebbistatin on cell morphology, and on paxillin and actin filaments distribution in wild type and MHCIIIB (-/-) fibroblasts. Page 200.

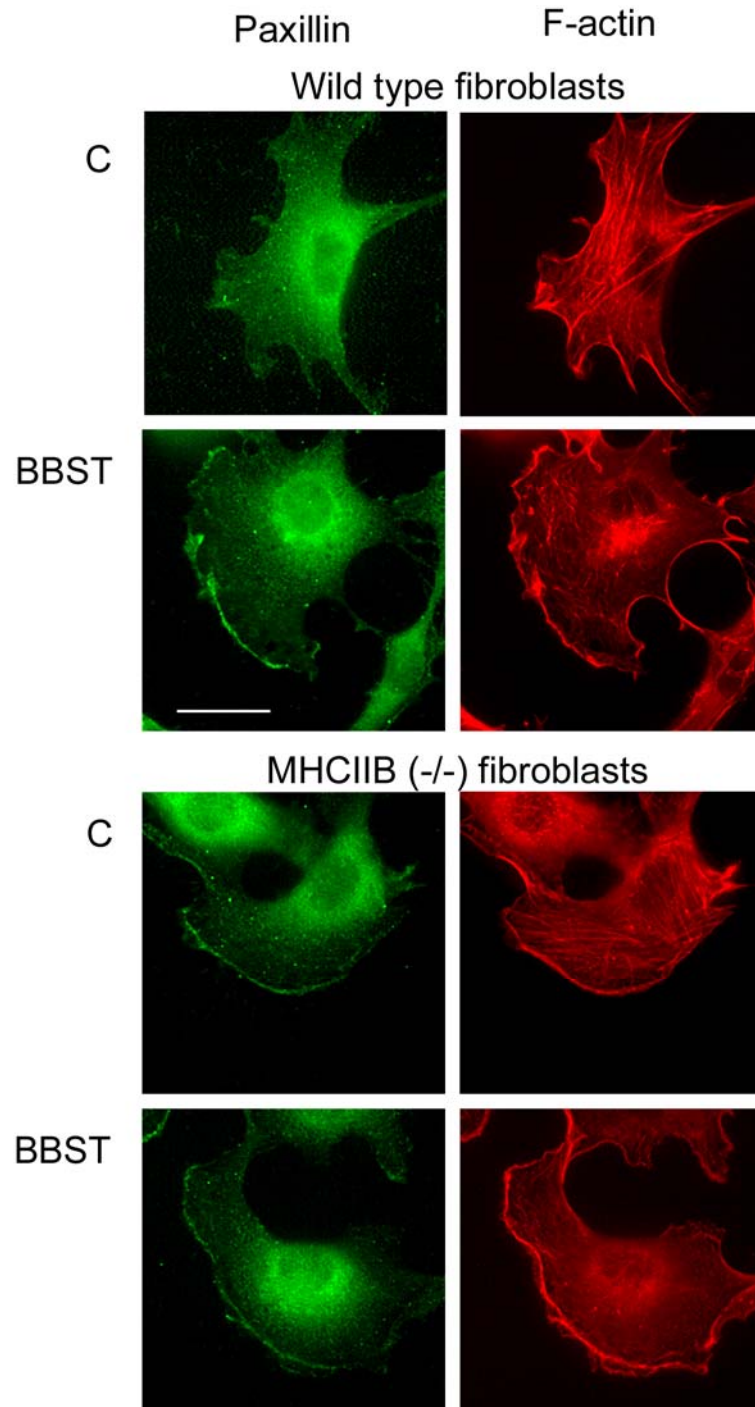


Figure S1



**Figure S1. Effect of blebbistatin on cell morphology, and on paxillin and actin filaments distribution in wild type and MHCIIIB (-/-) fibroblasts.**

Cells cultured in serum containing medium were treated with medium alone (C, control) or with 50  $\mu$ M blebbistatin (BBST) for 90 minutes. Next, the cells were processed for fluorescence microscopy and labelled with paxillin monoclonal antibody followed by FITC-conjugated anti-mouse IgG and rhodamine-phalloidin. The figure shows confocal microscopy images of paxillin and F-actin distribution in wild type and MHCIIIB (-/-) fibroblasts. Paxillin labelling was associated with the leading edge of lamellipodia in control MHCIIIB (-/-) fibroblasts whereas it was diffuse in the cytoplasm of control wild fibroblasts. Blebbistatin treatment induced the formation of wide lamellipodia in wild type fibroblasts, and the association of paxillin with the leading edge of lamellipodia. Blebbistatin has no effect on paxillin localization in MHCIIIB (-/-) fibroblasts. Scale bar: 50  $\mu$ m.

## DISCUSSION

La liste des fonctions attribuées à la myosine II semble s'allonger continuellement (Conti et Adelstein, 2008). Ceci, en partie, du fait qu'un grand nombre d'outils ont été mis à la disposition des chercheurs (siRNAs, animaux knockout) pour étudier et distinguer le rôle de chaque isoforme de myosine II dans la physiologie cellulaire.

La myosine II est un hexamère formé de deux chaînes lourdes, de deux chaînes légères essentielles et de deux chaînes légères régulatrices. C'est la tête globulaire des chaînes lourdes qui détient l'activité ATPasique et le domaine de liaison aux filaments d'actine responsables de la propriété contractile de la myosine II. La tige possède une structure en surenroulement qui permet la dimérisation des deux chaînes lourdes et qui serait responsable des propriétés structurales de la myosine II. La tige contient aussi les sites de phosphorylation qui vont moduler l'activité d'assemblage de la myosine II en filament bipolaire. De plus, les isoformes de MHCs de myosine II, amènent un degré de complexité plus élevé puisque, tout en ayant une localisation intracellulaire et des fonctions qui se chevauchent, elles ont chacune des localisations subcellulaires particulières et des fonctions différentes ce qui contribue à augmenter la spécificité du contrôle spatiotemporel de leur activité. Les isoformes de MHCII sont codées par trois gènes différents chez les mammifères, alors que d'autres organismes n'ont qu'une seule forme de myosines II (*Drosophila*, *C. elegans*, *Acanthamoeba*, *Dictyostelium*). La diversité des isoformes de myosine II serait due à la duplication d'un gène commun. Les différentes mutations subies par les gènes des isoformes de myosine II sont à l'origine des différences de séquences protéiques entre les isoformes de myosine II et ont contribué à donner à chaque isoforme une fonction spécifique.

Nous nous sommes intéressés à étudier les propriétés contractile et structurale potentiellement distinctes des isoformes de la myosine II. Pour ce faire, nous avons choisi d'étudier deux phénomènes physiologiques, l'apoptose et le maintien de la forme cellulaire.

Ces deux processus se sont avérés particulièrement intéressants dans notre recherche. La contraction cellulaire durant l'apoptose met l'emphase sur le rôle contractile de la myosine II ; dans ce cas, la myosine II est associée en filaments bipolaires qui tirent sur les filaments d'actine pour générer la contraction cellulaire. La morphologie cellulaire met l'emphase sur le rôle structural de la myosine II, c'est-à-dire son rôle de stabilisation et de maintien des structures dépendantes des filaments d'actine.

Nos résultats montrent que les deux isoformes A et B de la myosine II ont un rôle bien distinct dans le processus de contraction cellulaire spécifique de la phase tardive de l'apoptose.

Nous avons remarqué que le traitement avec le TNF $\alpha$  seul induit l'apoptose uniquement à des temps longs d'incubation. Le TNF $\alpha$  a une activité duale, c'est-à-dire que le TNF $\alpha$  peut aussi bien induire la survie cellulaire par l'expression de facteurs anti-apoptotiques comme les IAPs (inhibitors of apoptosis), que l'apoptose en fonction de la dose et du temps d'incubation (Baud et Karin, 2001). Pour favoriser la voie apoptotique, certaines équipes utilisent le TNF $\alpha$  en combinaison avec la cycloheximide, qui bloque la synthèse protéique (Smith et coll., 2000; Suarez-Huerta et coll., 2000b; Croft et coll., 2005). En utilisant la combinaison de TNF $\alpha$  avec la cycloheximide (CHX), nous avons obtenu les mêmes changements morphologiques associés à l'apoptose qu'avec un traitement à long terme au TNF $\alpha$  seul, sauf que les changements morphologiques se déroulent beaucoup plus rapidement dans le premier cas.

Durant l'apoptose, un grand nombre de protéines associées au cytosquelette d'actine sont spécifiquement clivées suite à l'activation des caspases alors que d'autres protéines ne sont pas affectées. C'est toute la complexité du processus apoptotique, de fragmenter partiellement la cellule tout en conservant un cytosquelette d'actine fonctionnel pour assurer la contraction de la cellule.

On peut distinguer deux types de protéines qui sont spécifiquement clivées: il y a d'abord les protéines qui ont un rôle structural, comme certaines protéines de liaison à l'actine. Leur clivage par les caspases aboutit à la perte de leur fonction. Par contre, dans le cas de certaines protéines comme les kinases ou d'autres protéines de liaison à l'actine mais qui ont une activité enzymatique comme la gelsoline (Kothakota et coll., 1997), le clivage ne signifie pas l'inactivation de la protéine mais au contraire une augmentation de son activité.

Nous avons montré que l'expression de l'alpha-actinine, une protéine impliquée dans les contacts focaux, diminue drastiquement avec le traitement au TNF $\alpha$ . Par contre, nous n'avons pas observé de diminution significative du taux d'actine-G. Il faut noter que dans la littérature, on trouve des articles qui mentionnent que l'actine-G (Mashima et coll., 1999) et l'alpha-actinine (Communal et coll., 2002) sont aussi clivées durant l'apoptose. Nous n'avons pas observé, par Western blot, de fragments correspondants au clivage de l'alpha-actinine. Une des possibilités est que les fragments issus de son clivage soient très rapidement dégradés et qu'on ne puisse pas les détecter. Comme le processus de contraction cellulaire dépend des filaments d'actine, le clivage de l'actine, s'il a lieu, devrait se produire très tardivement dans l'apoptose. La diminution de l'alpha-actinine, mais aussi des autres protéines des contacts focaux, est concomitant avec le démantèlement des contacts focaux et des fibres de stress associées, ce qui peut expliquer le détachement des cellules du support de culture que nous avons observé. En ce qui concerne la spectrine, suite au traitement avec le TNF $\alpha$ , les deux fragments correspondants au clivage spécifique par la caspase-3 et les calpaïnes sont visualisés par Western blot (Janicke et coll., 1998). Le clivage de la spectrine contribuerait à dissocier le cytosquelette cortical et participerait aux changements morphologiques subis par la cellule apoptotique comme le blebbing (Martin et coll., 1995; Cryns et coll., 1996).

Durant la phase tardive de l'apoptose, le complexe actomyosine génère la force motrice qui assure le processus de contraction cellulaire (Croft et coll., 2005). Deux points

ont été particulièrement bien documentés: l'importance et la nécessité des filaments d'actine (Cotter et coll., 1992; Huot et coll., 1998; Suarez-Huerta et coll., 2000b) et l'augmentation de l'état de phosphorylation de MLC20 (Mills et coll., 1998) par la forme clivée de ROCK1 (Coleman et coll., 2001; Sebbagh et coll., 2001; Minambres et coll., 2006; Orlando et coll., 2006). Ces deux points étant impératifs à l'activité de la myosine II et d'un complexe actomyosine fonctionnel. Nos résultats confirment l'ensemble de ces observations mais ils apportent aussi une information supplémentaire et clef: la caspase-3 sous sa forme clivée/activée, la forme clivée de ROCK1 et la forme phosphorylée de MLC20 sont associées à la fraction enrichie en composante du cytosquelette, ce qui contribue à confirmer leur interaction durant l'apoptose induite par le TNF $\alpha$ .

Si le processus de contraction cellulaire durant l'apoptose avait bien été décrit et que quelques uns des participants étaient connus, l'implication des isoformes des MHCs de myosine II, potentiellement différentes, restait non élucidée.

Notre recherche démontre que la contribution des isoformes MHCIIA et MHCIIIB est différente pendant le processus d'apoptose: en effet, le niveau d'expression de l'isoforme MHCIIA diminue drastiquement alors que l'expression de MHCIIIB reste inchangée et cela durant le traitement des cellules TtT/GF avec le TNF $\alpha$  seul, et durant le traitement des cellules TtT/GF et NIH3T3 avec le TNF $\alpha$  en combinaison avec la cycloheximide. Le choix d'induire l'apoptose de deux lignées cellulaires différentes est pertinent car on peut imaginer que le processus apoptotique est conservé dans plusieurs types cellulaires.

La diminution du taux de MHCIIA, durant l'apoptose induite par TNF $\alpha$ /CHX, pourrait être due au «turnover» plus rapide de cette isoforme par rapport à MHCIIIB. Le traitement avec des concentrations plus élevées de CHX, ou avec l'inhibiteur de la transcription, l'actinomycine D, nous a permis de mettre en évidence la vitesse de dégradation des deux isoformes lorsque leur synthèse de novo est inhibée. L'expression des deux isoformes, MHCIIA et MHCIIIB, est diminuée par l'inhibition de leur synthèse et on

observe que MHCIIA a un «turnover» légèrement plus rapide que MHCIIIB. Cependant, le fait que le traitement avec TNF à long terme, sans CHX, cause uniquement la disparition de MHCIIA suggère que la disparition de MHCIIA fait partie du processus apoptotique et n'est pas la conséquence d'une dégradation plus rapide de MHCIIA.

Le clivage de MHCIIA a été rapporté dans d'autres études (Gerner et coll., 2000; Suarez-Huerta et coll., 2000a; Kato et coll., 2005). Malheureusement, nous n'avons pas pu mettre en évidence les fragments issus du clivage de MHCIIA dans nos conditions expérimentales et cela malgré l'utilisation de deux anticorps différents. Il est probable que les fragments issus du clivage de MHCIIA soient rapidement dégradés.

La dégradation de MHCIIA aurait plusieurs effets, tout d'abord, elle augmenterait l'accessibilité de MHCIIIB sur les filaments d'actine car il n'y a plus de compétition entre MHCIIA et MHCIIIB. Dans la littérature, MHCIIA est plus fortement associée aux fibres de stress alors que MHCIIIB est plus fortement localisé en périphérie cellulaire (Maupin et coll., 1994; Kelley et coll., 1996; Kolega, 1998). Or pendant l'apoptose, il y a un désassemblage des fibres de stress au profit du cytosquelette d'actine cortical (Mills et coll., 1999), ce qui pourrait expliquer que la fonction de MHCIIIB soit maintenue et pas celle de MHCIIA.

Du point de vue bioinformatique, si on soumet la séquence protéique de MHCIIA à un serveur web de prédiction de sites de clivages par les caspases (CASVM: Server for SVM Prediction of Caspase Substrates Cleavage Sites), on obtient une dizaine de sites consensus du type DxxD. Dans la littérature, seuls deux sites ont été identifiés dans la séquence de la tige de MHCIIA, D-1153 et D-1948 (Kato et coll., 2005). Le clivage entre les têtes globulaires et la tige de MHCIIA a pour effet de supprimer la fonction contractile de MHCIIA. En effet, on peut imaginer que les têtes globulaires restent accrochées aux filaments d'actine après le clivage, mais sans les tiges, l'activité d'assemblage de la MHCIIA est supprimée et de ce fait sa fonction contractile.

Curieusement, les deux sites sont aussi présents dans la séquence de MHCIIIB (et MHCIIIC), le site D-1153 est très bien conservé alors que le site D-1948 présente des différences.

Prédiction des sites de clivage par les protéases de la famille des caspases (CASVM: Server for SVM Prediction of Caspase Substrates Cleavage Sites).

Le site Asp-1153 est à l'origine du fragment de 95-97 KDa et se situe au début de la queue de MHCIIA.

MHCIIA	1144	LKTELEDTLDSTAAQQELRSKREQEVSILKKTLEDEAKTHEAQIQEMRQ	1193
MHCIIIB	1151	LKTELEDTLDTTAAQQELRTKREQEVAELKKALEDETKNHEAQIQDMRQ	1200
MHCIIIC	1149	LRGELEDTLDSTNAQQELRSKREQEVTTELKKALEEEESRAHEVSMQELRQ	1198

Pourtant, nous ne possédons aucune évidence expérimentale sur le clivage de MHCIIIB, ce qui est moins surprenant pour MHCIIIC, car le clivage de l'isoforme MHCIIIC, s'il a lieu, n'a sûrement pas été encore rapporté. Il serait donc vraiment très intéressant de savoir comment MHCIIIB échappe au clivage par les caspases durant l'apoptose. On peut émettre quelques hypothèses: le site de clivage est situé au niveau la tige, là où ont lieu les interactions qui mènent à la dimérisation des deux chaînes lourdes. On pourrait imaginer que dans cette conformation le site de clivage est masqué dans le cas de MHCIIIB et au contraire accessible dans le cas de MHCIIA. On sait aussi que l'activité des caspases est bien compartimentée à l'intérieur de la cellule apoptotique, car le clivage et la dégradation des protéines, faisant suite à l'activation des caspases, sont ciblés et il n'y a pas de clivage aléatoire. On peut émettre l'hypothèse qu'à cause de la compartimentation des caspases et de la localisation cellulaire différente des deux isoformes, MHCIIA et MHCIIIB n'interagiraient pas avec les mêmes protéines et que seule MHCIIA interagirait avec la caspase-3.

L'implication de l'isoforme B de la myosine II dans le processus de contraction d'une cellule apoptotique est appuyée par les résultats que nous avons obtenus dans une lignée déficiente pour MHCIB. Les fibroblastes embryonnaires de souris présentaient un avantage certain car ils n'expriment pas MHCIC au stade embryonnaire. Les fibroblastes embryonnaires de souris de type sauvage traités avec TNF $\alpha$ /CHX, se contractent, rétrécissent, s'arrondissent pour finalement se détacher comme ce que nous avons observé auparavant. Par contre, les fibroblastes MHCIB (-/-) traités avec TNF $\alpha$ /CHX, restent plus longtemps adhérentes et présentent un retard dans le processus de contraction cellulaire. Cette observation pourrait être expliquée selon deux hypothèses: Soit la lignée de fibroblastes MHCIB (-/-) est plus résistante au stimulus apoptotique TNF $\alpha$ /CHX que la lignée Wt, soit l'absence de l'isoforme MHCIB cause une altération de la contraction des cellules apoptotiques. La cinétique d'activation de la caspase-3 est identique dans les fibroblastes Wt et MHCIB (-/-) et la caspase-3 est bien activée dans les fibroblastes MHCIB (-/-) restés adhérents donc cela nous permet de confirmer que c'est l'absence de MHCIB qui altère la contraction cellulaire durant l'apoptose.

Nos études sur la participation de l'isoforme  $\zeta$  de PKC, PKC $\zeta$ , ont donné plus de support à notre hypothèse de recherche de l'implication préférentielle de l'isoforme B de la myosine II dans la contraction des cellules apoptotiques. Il avait été démontré que PKC $\zeta$  phosphorylait préférentiellement MHCIB (Even-Faitelson et Ravid, 2006) et que PKC $\zeta$  clivée, durant l'apoptose, devenait constitutivement active (Smith et coll., 2000). Le rôle de PKC $\zeta$  dans l'apoptose n'est pas élucidé, il a seulement été rapporté que sa forme clivée est plus rapidement dégradée que la forme complète (Smith et coll., 2003). Nos résultats montrent que PKC $\zeta$  interagit avec MHCIB dans les fibroblastes contrôles et traitées avec TNF $\alpha$ /CHX donc que l'interaction a lieu aussi dans les cellules apoptotiques. De plus, nos résultats montrent que l'inhibiteur spécifique de PKC $\zeta$  bloque et retarde le détachement des cellules traitées avec TNF $\alpha$ /CHX, suggérant que l'activité de PKC $\zeta$ , sous sa forme entière ou clivée, est nécessaire au processus de contraction cellulaire. Comme l'effet de



l'inhibiteur est plus prononcé dans les fibroblastes Wt qu'avec les fibroblastes MHCIIB (-/-), cela contribue à confirmer que PKC $\zeta$  interagit plus préférentiellement avec MHCIIB pendant l'apoptose.

Par contre, comme la phosphorylation de PKC au niveau de la tige des MHCs induit un désassemblage de la myosine II dans la plupart des modèles étudiés (Abu-Elneel et coll., 1996; Murakami et coll., 1998), cela aurait pour conséquence de dissocier le complexe actomyosine. Comme l'activité de PKC $\zeta$  semble au contraire nécessaire à la contraction cellulaire dans notre modèle, cela suggère que l'interaction PKC $\zeta$ /MHCIIB doit plutôt favoriser l'assemblage de la myosine II en filament bipolaire. Dans notre modèle, si l'interaction PKC $\zeta$ /MHCIIB induit un désassemblage des filaments de myosine II, alors cette interaction doit avoir lieu une fois la contraction cellulaire terminée.

Nous avons mis en évidence que MHCIIB est l'isoforme de myosine II impliquée dans la formation du complexe actomyosine durant l'apoptose. La différence d'implication entre MHCIIA et MHCIIB durant l'apoptose, ressort d'autant plus que MHCIIA est clivée et perd sa fonction contractile.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés au rôle structural de la myosine II lors de la modulation de la morphologie cellulaire par les isoformes de myosine II.

Nos résultats montrent que les fibroblastes MHCIIB (-/-) ont une forme et une dynamique membranaire, caractérisée par un large lamellipode, très différente des fibroblastes Wt. La formation du lamellipode semble due uniquement à l'absence de MHCIIB (Lo et coll., 2004). La différence de morphologie entre les fibroblastes Wt et MHCIIB (-/-) est très évidente, ce qui signifie que MHCIIA ne peut pas compenser la perte de MHCIIB. On aurait aussi pu imaginer que la perte de MHCIIB, induirait une augmentation de la contraction cellulaire via MHCIIA pour conserver la forme cellulaire, mais ce n'est pas le cas. MHCIIA ne peut assurer à elle-seule le rôle structural des deux

isoformes et maintenir la forme cellulaire. Cette information est très importante car ce qui elle l'accent sur le rôle structural spécifique de MHCIIB. D'ailleurs, la redondance de fonction entre MHCIIA et MHCIIB n'a été mis en évidence que lors de la cytocinèse (Bao et coll., 2005) et lors de l'adressage des protéines d'adhésions cellule-cellule (Bao et coll., 2007).

On peut facilement comprendre que la perte d'une des isoformes de myosine II affecte la morphologie cellulaire. Comme les isoformes de myosine II ont un rôle structural, de stabilisation des filaments d'actine, la perte d'une des isoformes peut modifier le cytosquelette d'actine et donc la morphologie cellulaire. Comme les isoformes de myosine II sont impliquées aussi dans la contraction cellulaire, on peut s'attendre à ce que la perte d'une des deux isoformes aboutisse à une morphologie cellulaire «dé-contractée», relâchée et donc plus étalée ce qui pourrait expliquer la formation du lamellipode.

Ce qui est plus surprenant est que l'absence de MHCIIB induit l'activation de Rac1 suggérant que Rac1 répond à des stimuli physiques comme la perte partielle de la contraction cellulaire et donc la diminution de la tension dans la cellule. D'autres études ont montré que Rac1 est activé lorsque la tension de la membrane plasmique est modifiée par des stress physiques (Birukov et coll., 2002; Di Ciano et coll., 2002; Katsumi et coll., 2002), ce qui peut expliquer ce qu'on observe. Rac est plus fortement activé dans les cellules dont la polarité cellulaire est altérée et de ce fait lorsque la migration cellulaire est aléatoire, que dans les cellules qui présente une migration cellulaire dirigée (Even-Ram et Yamada, 2005). Ceci est concordant avec nos observations d'une augmentation de l'activité de Rac est élevée dans les fibroblastes MHCIIB (-/-), dont la polarité et la migration cellulaire sont altérées (Lo et coll., 2004).

Il était clair dans la littérature que Rac1 influence l'activité du complexe actomyosine via les kinases PAKs (Obermeier et coll., 1998), mais très peu de données ont montré qu'en retour, une altération du complexe actomyosine pouvait moduler l'activation de Rac1. Comme on obtient aussi une activation de Rac1 avec la blebbistatine, cela semble

confirmer que l'activation de Rac1 est stimulée par la déstabilisation du complexe actomyosine. Le fait que la blebbistatine augmente l'activation de Rac1 avait été suggéré par une étude mais les données n'étaient pas montrées dans l'article (Even-Ram et coll., 2007). Par contre, la blebbistatine ne peut pas induire de lamellipode dans des cellules qui ont perdu l'expression de Rac1, suggérant que c'est bien l'activation de Rac1 qui induit la formation du lamellipode et non pas la relaxation du complexe actomyosine seule (Vidali et coll., 2006). L'absence de MHCIIIB pourrait provoquer le relâchement de certains facteurs d'échange (GEF) spécifiques de Rac1, ce qui expliquerait pourquoi l'inhibition de l'interaction GEF/Rac1 par l'inhibiteur NSC23766 inhibe la formation des lamellipodes. Il faut noter que les cellules déficientes en MHCIIA présentent aussi un taux élevé de Rac1 activé et une forte localisation membranaire du facteur d'échange Tiam, ce qui conforterait notre hypothèse (Even-Ram et coll., 2007). Cette étude démontre aussi une relation étroite entre l'absence de MHCIIA et l'activation de Rac ce qui nous indique que n'est pas spécifique à l'isoforme MHCIIIB mais plutôt à la conformation du cytosquelette d'actomyosine.

Nos résultats montrent que l'activation de la GTPase Rac1 qui est accompagnée d'une forte relocalisation vers la membrane plasmique, de la cortactine sous sa forme totale et phosphorylée en Tyr-421. La cortactine est une protéine clef du cytosquelette d'actine impliquée dans un grand nombre de processus. Le fait que la cortactine co-immunoprécipite avec MHCIIA avait été décrit dans un seul article (He et coll., 1998). Dans cet article, le complexe cortactine/MHCIIA s'associe dans les cellules où l'activation de Rac1 est faible. Par contre le complexe est complètement dissocié par l'activation de Rac1 suggérant que Rac1 contrôle la dynamique du complexe. Mais dans ce modèle, les cellules subissent un changement de morphologie drastique: les cellules contrôles sont rondes et contractées alors que les cellules, dans lesquelles Rac1 est activé, sont très étalées et présentent un lamellipode aberrant. Dans nos conditions expérimentales, malgré le fait que la différence de morphologie entre les fibroblastes Wt et MHCIIIB (-/-) soit évidente et que Rac1 soit fortement activé dans les fibroblastes MHCIIIB (-/-), le complexe

cortactine/MHCIIA n'est pas dissocié dans les fibroblastes MHCIIB (-/-). Il paraît difficile d'utiliser l'immunoprécipitation quantitativement pour mettre en évidence que le complexe cortactine/MHCIIA est plus présent dans les fibroblastes Wt que dans les fibroblastes MHCIIB (-/-), peut être à cause du fait que les interactions protéiques peuvent se faire pendant la lyse des cellules. Par contre en microscopie confocale, l'interaction cortactine/MHCIIA dans les fibroblastes MHCIIB (-/-) est minime par rapport aux fibroblastes Wt nous indiquant que l'activation de Rac1 pourrait influencer la dynamique du complexe cortactine/MHCIIA. De plus, cela est concordant avec le fait que la cortactine est fortement localisée au niveau du front externe du lamellipode des fibroblastes MHCIIB (-/-), justement là où sont exclues les isoformes de myosine II (Vicente-Manzanares et coll., 2007).

En perspectives, il serait très intéressant d'étudier le complexe cortactine/MHCIIA:

- pour savoir si cette interaction est impliquée dans le transport de la cortactine, car on sait que les isoformes de myosines II participent à la localisation spécifique de certaines protéines d'adhésion au niveau de la membrane plasmique (Goodwin et Yap, 2004).

- pour savoir si ce complexe est impliqué dans la séquestration et l'inactivation de la cortactine, c'est-à-dire en empêchant la cortactine d'être relocalisée à la membrane.

Et bien sûr, il serait très intéressant d'étudier la localisation subcellulaire de la cortactine dans des cellules déficientes pour MHCIIA, où le complexe MHCIIA/cortactine ne pourrait se former.

En fin, le traitement avec le bFGF nous donne quelques informations complémentaires. Tout d'abord, le bFGF affecte la morphologie des cellules mais surtout celle des fibroblastes MHCIIB (-/-): le bFGF induit la conversion d'une morphologie arrondie, caractérisée par un large lamellipode, à une morphologie allongée avec des prolongements cellulaires aberrants. Ce changement de forme s'accompagne d'une

réduction des lamellipodes et de la diminution de la localisation membranaire de la cortactine. Les changements morphologiques induits par le bFGF sont moins flagrants dans les fibroblastes Wt, car ces derniers ont déjà une forme fusiforme et étoilée avec des prolongements cytoplasmiques. Et de même, la différence d'association de la cortactine avec la membrane plasmique entre les fibroblastes Wt contrôles et traités au bFGF, est moins visible que dans les fibroblastes MHCIIIB (-/-) non traités et traités au bFGF. Le fait que le bFGF induise des changements morphologiques plus marqués dans les fibroblastes MHCIIIB (-/-) que dans les fibroblastes Wt, nous indique que la fonction structurale de MHCIIIB influence la morphologie cellulaire.

Nous avons démontré que cet effet du bFGF est médié par la voie Erk1/2. Nous avons étudié la possibilité que l'absence de MHCIIIB affecte cette voie, tout comme elle affecte l'activation de Rac1. Cependant, nos résultats ont montré que la cinétique d'activation de Erk1/2 par le bFGF est identique dans les fibroblastes Wt et MHCIIIB (-/-). La voie de signalisation induite par le bFGF, via Erk1/2, ne semble pas être affectée par la perte de MHCIIIB. Donc l'absence de MHCIIIB affecterait seulement l'activation de Rac1 mais n'aurait pas d'effet sur la voie de signalisation Erk1/2.

Pour conclure, même si les isoformes de myosine II partagent des fonctions communes, nous avons mis en évidence qu'elles ont aussi des fonctions qui diffèrent en plusieurs points. Premièrement, au niveau des protéines d'interaction: MHCIIA interagit avec la cortactine et pas avec MHCIIIB alors que MHCIIIB interagit avec la PKC $\zeta$  mais pas MHCIIA, suggérant deux hypothèses: soit les séquences protéiques sont suffisamment différentes entre les deux isoformes, pour qu'elles ne portent pas les mêmes domaines d'interactions, c'est le cas pour Mts1 qui n'interagit qu'avec MHCIIA (Li et coll., 2003). Soit, du fait de que leurs localisations cellulaires ne sont pas identiques, les deux isoformes ne seraient pas en contact avec les mêmes partenaires, malgré le fait de porter des domaines d'interactions communs. Dans nos travaux, il n'apparaît pas de différence évidente entre la localisation cellulaire de MHCIIA et celle de MHCIIIB, ce qui favoriserait l'hypothèse

d'hétérogénéité entre les séquences protéiques des deux isoformes. Le fait que les isoformes interagissent spécifiquement avec des partenaires différents met l'accent sur le fait que la spécificité de fonction de MHCIIIB qui ne pourrait pas être remplacée par MHCIIA, et vice et versa.

Deuxièmement, les fonctions de MHCIIA et MHCIIIB dans l'apoptose sont bien différentes. MHCIIA est dégradée par la caspase-3 durant l'apoptose alors que MHCIIIB est conservée. La séquence protéique de MHCIIIB contient pourtant le même site consensus que MHCIIA mais MHCIIIB échappe au clivage d'une façon qui reste encore non élucidée. Donc nos résultats suggèrent que la fonction contractile des isoformes de myosines II n'est pas sollicitée de la même façon selon le processus cellulaire et que c'est l'isoforme MHCIIIB qui assure la contraction cellulaire pendant l'apoptose.

Finalement, l'absence de MHCIIIB et donc de la perte de sa fonction structurale de stabilisation du cytosquelette d'actine, induit une activation de Rac1 ce qui suggère une relation étroite entre la dynamique du complexe actomyosine et l'activation de la GTPase Rac1. Il resterait à savoir si les isoformes de myosine II ont un rôle structural spécifique ou commun dans cette relation. On s'attend à ce que l'absence de MHCIIA et donc de la perte de sa fonction structurale de stabilisation du cytosquelette d'actine, aie tout autant de répercutions sur la morphologie cellulaire.

## Bibliographie

- Abu-Elneel, K., Karchi, M. et Ravid, S. (1996). Dictyostelium myosin II is regulated during chemotaxis by a novel protein kinase C. *J Biol Chem* 271: 977-84.
- Adams, J.C. (2004). Fascin protrusions in cell interactions. *Trends Cardiovasc Med* 14: 221-6.
- Adelstein, R.S., Beaven, M.A., Bengur, A.R., Kawamoto, S., Ludowyke, R.I., Peleg, I. et Sellers, J.R. (1989). In situ phosphorylation of human platelet and rat basophilic leukemia cell (RBL-2H3) myosin heavy chain and light chain. *Adv Exp Med Biol* 255: 289-97.
- Adelstein, R.S. et Conti, M.A. (1975). Phosphorylation of platelet myosin increases actin-activated myosin ATPase activity. *Nature* 256: 597-8.
- Alessi, D., MacDougall, L.K., Sola, M.M., Ikebe, M. et Cohen, P. (1992). The control of protein phosphatase-1 by targetting subunits. The major myosin phosphatase in avian smooth muscle is a novel form of protein phosphatase-1. *Eur J Biochem* 210: 1023-35.
- Allaerts, W., Fluitsma, D.M., Hoefsmit, E.C., Jeucken, P.H., Morreau, H., Bosman, F.T. et Drexhage, H.A. (1996). Immunohistochemical, morphological and ultrastructural resemblance between dendritic cells and folliculo-stellate cells in normal human and rat anterior pituitaries. *J Neuroendocrinol* 8: 17-29.
- Allaerts, W., Tijssen, A.M., Jeucken, P.H., Drexhage, H.A. et de Koning, J. (1994). Influence of folliculo-stellate cells on biphasic luteinizing hormone secretion response to gonadotropin-releasing hormone in rat pituitary cell aggregates. *Eur J Endocrinol* 130: 530-9.
- Allan, V.J., Thompson, H.M. et McNiven, M.A. (2002). Motoring around the Golgi. *Nat Cell Biol* 4: E236-42.
- Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W. et Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87: 171.
- Amano, M., Ito, M., Kimura, K., Fukata, Y., Chihara, K., Nakano, T., Matsuura, Y. et Kaibuchi, K. (1996). Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem* 271: 20246-9.
- Andre, E., Lottspeich, F., Schleicher, M. et Noegel, A. (1988). Severin, gelsolin, and villin share a homologous sequence in regions presumed to contain F-actin severing domains. *J Biol Chem* 263: 722-7.
- Ashkenazi, A. et Dixit, V.M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281: 1305-8.
- Baes, M., Allaerts, W. et Denef, C. (1987). Evidence for functional communication between folliculo-stellate cells and hormone-secreting cells in perfused anterior pituitary cell aggregates. *Endocrinology* 120: 685-91.
- Baines, I.C. et Korn, E.D. (1990). Localization of myosin IC and myosin II in *Acanthamoeba castellanii* by indirect immunofluorescence and immunogold electron microscopy. *J Cell Biol* 111: 1895-904.
- Bala, K.K. et Moudgil, K.D. (2006). Induction and maintenance of self tolerance: the role of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 54: 307-21.

- Bamburg, J.R., McGough, A. et Ono, S. (1999). Putting a new twist on actin: ADF/cofilins modulate actin dynamics. *Trends Cell Biol* 9: 364-70.
- Bao, J., Jana, S.S. et Adelstein, R.S. (2005). Vertebrate nonmuscle myosin II isoforms rescue small interfering RNA-induced defects in COS-7 cell cytokinesis. *J Biol Chem* 280: 19594-9.
- Bao, J., Ma, X., Liu, C. et Adelstein, R.S. (2007). Replacement of nonmuscle myosin II-B with II-A rescues brain but not cardiac defects in mice. *J Biol Chem* 282: 22102-11.
- Barnes, P.J. et Karin, M. (1997). Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 336: 1066-71.
- Baud, V. et Karin, M. (2001). Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol* 11: 372-7.
- Beningo, K.A., Dembo, M., Kaverina, I., Small, J.V. et Wang, Y.L. (2001). Nascent focal adhesions are responsible for the generation of strong propulsive forces in migrating fibroblasts. *J Cell Biol* 153: 881-8.
- Bernard, O. (2007). Lim kinases, regulators of actin dynamics. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 1071-6.
- Birukov, K.G., Birukova, A.A., Dudek, S.M., Verin, A.D., Crow, M.T., Zhan, X., DePaola, N. et Garcia, J.G. (2002). Shear stress-mediated cytoskeletal remodeling and cortactin translocation in pulmonary endothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 26: 453-64.
- Boguslavsky, S., Grosheva, I., Landau, E., Shtutman, M., Cohen, M., Arnold, K., Feinstein, E., Geiger, B. et Bershadsky, A. (2007). p120 catenin regulates lamellipodial dynamics and cell adhesion in cooperation with cortactin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 10882-7.
- Borrione, A.C., Zanellato, A.M., Giuriato, L., Scannapieco, G., Pauletto, P. et Sartore, S. (1990). Nonmuscle and smooth muscle myosin isoforms in bovine endothelial cells. *Exp Cell Res* 190: 1-10.
- Bosgraaf, L. et van Haastert, P.J. (2006). The regulation of myosin II in Dictyostelium. *Eur J Cell Biol* 85: 969-79.
- Bras, M., Yuste, V.J., Roue, G., Barbier, S., Sancho, P., Virely, C., Rubio, M., Baudet, S., Esquerda, J.E., Merle-Beral, H., Sarfati, M. et Susin, S.A. (2007). Drp1 mediates caspase-independent type III cell death in normal and leukemic cells. *Mol Cell Biol* 27: 7073-88.
- Bresnick, A.R. (1999). Molecular mechanisms of nonmuscle myosin-II regulation. *Curr Opin Cell Biol* 11: 26-33.
- Bretscher, A. (1981). Fimbrin is a cytoskeletal protein that crosslinks F-actin in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 6849-53.
- Bretscher, A. (1991). Microfilament structure and function in the cortical cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol* 7: 337-74.
- Bretscher, A., Edwards, K. et Fehon, R.G. (2002). ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 586-99.
- Broers, J.L., Ramaekers, F.C., Bonne, G., Yaou, R.B. et Hutchison, C.J. (2006). Nuclear lamins: laminopathies and their role in premature ageing. *Physiol Rev* 86: 967-1008.



- Bryce, N.S., Clark, E.S., Leysath, J.L., Currie, J.D., Webb, D.J. et Weaver, A.M. (2005). Cortactin promotes cell motility by enhancing lamellipodial persistence. *Curr Biol* 15: 1276-85.
- Brzeska, H. et Korn, E.D. (1996). Regulation of class I and class II myosins by heavy chain phosphorylation. *J Biol Chem* 271: 16983-6.
- Burridge, K. et Wennerberg, K. (2004). Rho and Rac take center stage. *Cell* 116: 167-79.
- Buxton, D.B., Golomb, E. et Adelstein, R.S. (2003). Induction of nonmuscle myosin heavy chain II-C by butyrate in RAW 264.7 mouse macrophages. *J Biol Chem* 278: 15449-55.
- Cai, Y., Biais, N., Giannone, G., Tanase, M., Jiang, G., Hofman, J.M., Wiggins, C.H., Silberzan, P., Buguin, A., Ladoux, B. et Sheetz, M.P. (2006). Nonmuscle myosin IIA-dependent force inhibits cell spreading and drives F-actin flow. *Biophys J* 91: 3907-20.
- Calderwood, D.A. (2004). Talin controls integrin activation. *Biochem Soc Trans* 32: 434-7.
- Calinisan, V., Gravem, D., Chen, R.P., Brittin, S., Mohandas, N., Lecomte, M.C. et Gascard, P. (2006). New insights into potential functions for the protein 4.1 superfamily of proteins in kidney epithelium. *Front Biosci* 11: 1646-66.
- Campbell, D.H., Sutherland, R.L. et Daly, R.J. (1999). Signaling pathways and structural domains required for phosphorylation of EMS1/cortactin. *Cancer Res* 59: 5376-85.
- Cardin, J., Carbajal, M.E. et Vitale, M.L. (2000). Biochemical and morphological diversity among folliculo-stellate cells of the mink (*Mustela vison*) anterior pituitary. *Gen Comp Endocrinol* 120: 75-87.
- Carrington, P.E., Sandu, C., Wei, Y., Hill, J.M., Morisawa, G., Huang, T., Gavathiotis, E., Wei, Y. et Werner, M.H. (2006). The structure of FADD and its mode of interaction with procaspase-8. *Mol Cell* 22: 599-610.
- Carswell, E.A., Old, L.J., Kassel, R.L., Green, S., Fiore, N. et Williamson, B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72: 3666-70.
- Cassimeris, L.U., Walker, R.A., Pryer, N.K. et Salmon, E.D. (1987). Dynamic instability of microtubules. *Bioessays* 7: 149-54.
- Chang, H.Y. et Yang, X. (2000). Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 821-46.
- Chantler, P.D. et Wylie, S.R. (2003). Elucidation of the separate roles of myosins IIA and IIB during neurite outgrowth, adhesion and retraction. *IEE Proc Nanobiotechnol* 150: 111-25.
- Cheng, T.P., Murakami, N. et Elzinga, M. (1992). Localization of myosin IIB at the leading edge of growth cones from rat dorsal root ganglionic cells. *FEBS Lett* 311: 91-4.
- Chew, T.L., Masaracchia, R.A., Goekeler, Z.M. et Wysolmerski, R.B. (1998). Phosphorylation of non-muscle myosin II regulatory light chain by p21-activated kinase (gamma-PAK). *J Muscle Res Cell Motil* 19: 839-54.

- Chisholm, R.L., Rushforth, A.M., Pollenz, R.S., Kuczmarski, E.R. et Tafuri, S.R. (1988). Dictyostelium discoideum myosin: isolation and characterization of cDNAs encoding the essential light chain. *Mol Cell Biol* 8: 794-801.
- Choi, O.H., Park, C.S., Itoh, K., Adelstein, R.S. et Beaven, M.A. (1996). Cloning of the cDNA encoding rat myosin heavy chain-A and evidence for the absence of myosin heavy chain-B in cultured rat mast (RBL-2H3) cells. *J Muscle Res Cell Motil* 17: 69-77.
- Chou, Y.H., Bischoff, J.R., Beach, D. et Goldman, R.D. (1990). Intermediate filament reorganization during mitosis is mediated by p34cdc2 phosphorylation of vimentin. *Cell* 62: 1063-71.
- Coleman, M.L., Sahai, E.A., Yeo, M., Bosch, M., Dewar, A. et Olson, M.F. (2001). Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol* 3: 339-45.
- Coley, W.B. (1893). II. Hawkins on Tubercular Peritonitis. *Ann Surg* 17: 462-4.
- Collier, N.C., Sheetz, M.P. et Schlesinger, M.J. (1993). Concomitant changes in mitochondria and intermediate filaments during heat shock and recovery of chicken embryo fibroblasts. *J Cell Biochem* 52: 297-307.
- Communal, C., Sumandea, M., de Tombe, P., Narula, J., Solaro, R.J. et Hajjar, R.J. (2002). Functional consequences of caspase activation in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 6252-6.
- Conboy, J.G. (1993). Structure, function, and molecular genetics of erythroid membrane skeletal protein 4.1 in normal and abnormal red blood cells. *Semin Hematol* 30: 58-73.
- Condeelis, J. (1993). Life at the leading edge: the formation of cell protrusions. *Annu Rev Cell Biol* 9: 411-44.
- Conrad, A.H., Jaffredo, T. et Conrad, G.W. (1995). Differential localization of cytoplasmic myosin II isoforms A and B in avian interphase and dividing embryonic and immortalized cardiomyocytes and other cell types in vitro. *Cell Motil Cytoskeleton* 31: 93-112.
- Conti, M.A. et Adelstein, R.S. (2008). Nonmuscle myosin II moves in new directions. *J Cell Sci* 121: 11-8.
- Conti, M.A., Even-Ram, S., Liu, C., Yamada, K.M. et Adelstein, R.S. (2004). Defects in cell adhesion and the visceral endoderm following ablation of nonmuscle myosin heavy chain II-A in mice. *J Biol Chem* 279: 41263-6.
- Conti, M.A., Sellers, J.R., Adelstein, R.S. et Elzinga, M. (1991). Identification of the serine residue phosphorylated by protein kinase C in vertebrate nonmuscle myosin heavy chains. *Biochemistry* 30: 966-70.
- Cosen-Binker, L.I. et Kapus, A. (2006). Cortactin: the gray eminence of the cytoskeleton. *Physiology (Bethesda)* 21: 352-61.
- Coso, O.A., Chiariello, M., Yu, J.C., Teramoto, H., Crespo, P., Xu, N., Miki, T. et Gutkind, J.S. (1995). The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell* 81: 1137-46.

- Cotter, T.G., Lennon, S.V., Glynn, J.M. et Green, D.R. (1992). Microfilament-disrupting agents prevent the formation of apoptotic bodies in tumor cells undergoing apoptosis. *Cancer Res* 52: 997-1005.
- Coulombe, P.A. et Omary, M.B. (2002). 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Curr Opin Cell Biol* 14: 110-22.
- Coulombe, P.A. et Wong, P. (2004). Cytoplasmic intermediate filaments revealed as dynamic and multipurpose scaffolds. *Nat Cell Biol* 6: 699-706.
- Cox, D., Condeelis, J., Wessels, D., Soll, D., Kern, H. et Knecht, D.A. (1992). Targeted disruption of the ABP-120 gene leads to cells with altered motility. *J Cell Biol* 116: 943-55.
- Cox, D., Ridsdale, J.A., Condeelis, J. et Hartwig, J. (1995). Genetic deletion of ABP-120 alters the three-dimensional organization of actin filaments in Dictyostelium pseudopods. *J Cell Biol* 128: 819-35.
- Cramer, L.P., Mitchison, T.J. et Theriot, J.A. (1994). Actin-dependent motile forces and cell motility. *Curr Opin Cell Biol* 6: 82-6.
- Crisp, M., Liu, Q., Roux, K., Rattner, J.B., Shanahan, C., Burke, B., Stahl, P.D. et Hodzic, D. (2006). Coupling of the nucleus and cytoplasm: role of the LINC complex. *J Cell Biol* 172: 41-53.
- Critchley, D.R. (2000). Focal adhesions - the cytoskeletal connection. *Curr Opin Cell Biol* 12: 133-9.
- Croft, D.R., Coleman, M.L., Li, S., Robertson, D., Sullivan, T., Stewart, C.L. et Olson, M.F. (2005). Actin-myosin-based contraction is responsible for apoptotic nuclear disintegration. *J Cell Biol* 168: 245-55.
- Crostella, L., Lidder, S., Williams, R. et Skouteris, G.G. (2001). Hepatocyte Growth Factor/scatter factor-induces phosphorylation of cortactin in A431 cells in a Src kinase-independent manner. *Oncogene* 20: 3735-45.
- Cryns, V.L., Bergeron, L., Zhu, H., Li, H. et Yuan, J. (1996). Specific cleavage of alpha-fodrin during Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is mediated by an interleukin-1beta-converting enzyme/Ced-3 protease distinct from the poly(ADP-ribose) polymerase protease. *J Biol Chem* 271: 31277-82.
- Cunningham, C.C., Gorlin, J.B., Kwiatkowski, D.J., Hartwig, J.H., Janmey, P.A., Byers, H.R. et Stossel, T.P. (1992). Actin-binding protein requirement for cortical stability and efficient locomotion. *Science* 255: 325-7.
- Daly, R.J. (2004). Cortactin signalling and dynamic actin networks. *Biochem J* 382: 13-25.
- Danowski, B.A. (1989). Fibroblast contractility and actin organization are stimulated by microtubule inhibitors. *J Cell Sci* 93 (Pt 2): 255-66.
- Davis, J.E., Smyth, M.J. et Trapani, J.A. (2001). Granzyme A and B-deficient killer lymphocytes are defective in eliciting DNA fragmentation but retain potent in vivo anti-tumor capacity. *Eur J Immunol* 31: 39-47.

- De Lozanne, A. et Spudich, J.A. (1987). Disruption of the Dictyostelium myosin heavy chain gene by homologous recombination. *Science* 236: 1086-91.
- Dehmelt, L. et Halpain, S. (2005). The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol* 6: 204.
- Dembinsky, A., Rubin, H. et Ravid, S. (1996). Chemoattractant-mediated increases in cGMP induce changes in Dictyostelium myosin II heavy chain-specific protein kinase C activities. *J Cell Biol* 134: 911-21.
- Derry, J.M., Ochs, H.D. et Francke, U. (1994). Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell* 79: following 922.
- Desai, A., Verma, S., Mitchison, T.J. et Walczak, C.E. (1999). Kin I kinesins are microtubule-destabilizing enzymes. *Cell* 96: 69-78.
- Deveraux, Q.L. et Reed, J.C. (1999). IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 13: 239-52.
- Dhermy, D. (1991). The spectrin super-family. *Biol Cell* 71: 249-54.
- Di Ciano, C., Nie, Z., Szaszi, K., Lewis, A., Uruno, T., Zhan, X., Rotstein, O.D., Mak, A. et Kapus, A. (2002). Osmotic stress-induced remodeling of the cortical cytoskeleton. *Am J Physiol Cell Physiol* 283: C850-65.
- Djabali, K., de Nechaud, B., Landon, F. et Portier, M.M. (1997). AlphaB-crystallin interacts with intermediate filaments in response to stress. *J Cell Sci* 110 ( Pt 21): 2759-69.
- Doxsey, S. (2001). Re-evaluating centrosome function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 688-98.
- Duran, J.M., Valderrama, F., Castel, S., Magdalena, J., Tomas, M., Hosoya, H., Renau-Piqueras, J., Malhotra, V. et Egea, G. (2003). Myosin motors and not actin comets are mediators of the actin-based Golgi-to-endoplasmic reticulum protein transport. *Mol Biol Cell* 14: 445-59.
- Earnshaw, W.C., Martins, L.M. et Kaufmann, S.H. (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 68: 383-424.
- Eden, S., Rohatgi, R., Podtelejnikov, A.V., Mann, M. et Kirschner, M.W. (2002). Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature* 418: 790-3.
- Edmonds, B.T. (1993). ABP50: an actin-binding elongation factor 1 alpha from Dictyostelium discoideum. *J Cell Biochem* 52: 134-9.
- Edwards, D.C., Sanders, L.C., Bokoch, G.M. et Gill, G.N. (1999). Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nat Cell Biol* 1: 253-9.
- Egelhoff, T.T., Lee, R.J. et Spudich, J.A. (1993). Dictyostelium myosin heavy chain phosphorylation sites regulate myosin filament assembly and localization in vivo. *Cell* 75: 363-71.
- El Sayegh, T.Y., Arora, P.D., Laschinger, C.A., Lee, W., Morrison, C., Overall, C.M., Kapus, A. et McCulloch, C.A. (2004). Cortactin associates with N-cadherin adhesions and mediates intercellular adhesion strengthening in fibroblasts. *J Cell Sci* 117: 5117-31.

- Espreafico, E.M., Cheney, R.E., Matteoli, M., Nascimento, A.A., De Camilli, P.V., Larson, R.E. et Mooseker, M.S. (1992). Primary structure and cellular localization of chicken brain myosin-V (p190), an unconventional myosin with calmodulin light chains. *J Cell Biol* *119*: 1541-57.
- Evangelista, M., Zigmond, S. et Boone, C. (2003). Formins: signaling effectors for assembly and polarization of actin filaments. *J Cell Sci* *116*: 2603-11.
- Even-Faitelson, L. et Ravid, S. (2006). PAK1 and aPKCzeta regulate myosin II-B phosphorylation: a novel signaling pathway regulating filament assembly. *Mol Biol Cell* *17*: 2869-81.
- Even-Faitelson, L., Rosenberg, M. et Ravid, S. (2005). PAK1 regulates myosin II-B phosphorylation, filament assembly, localization and cell chemotaxis. *Cell Signal* *17*: 1137-48.
- Even-Ram, S., Doyle, A.D., Conti, M.A., Matsumoto, K., Adelstein, R.S. et Yamada, K.M. (2007). Myosin IIA regulates cell motility and actomyosin-microtubule crosstalk. *Nat Cell Biol* *9*: 299-309.
- Even-Ram, S. et Yamada, K.M. (2005). Cell migration in 3D matrix. *Curr Opin Cell Biol* *17*: 524-32.
- Fackler, O.T. et Grosse, R. (2008). Cell motility through plasma membrane blebbing. *J Cell Biol* *181*: 879-84.
- Fath, K.R. (2005). Characterization of myosin-II binding to Golgi stacks in vitro. *Cell Motil Cytoskeleton* *60*: 222-35.
- Fauquier, T., Guerineau, N.C., McKinney, R.A., Bauer, K. et Mollard, P. (2001). Folliculostellate cell network: a route for long-distance communication in the anterior pituitary. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*: 8891-6.
- Ferrara, N. et Henzel, W.J. (1989). Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* *161*: 851-8.
- Ferrara, N., Schweigerer, L., Neufeld, G., Mitchell, R. et Gospodarowicz, D. (1987). Pituitary follicular cells produce basic fibroblast growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* *84*: 5773-7.
- Ferrara, N., Winer, J. et Henzel, W.J. (1992). Pituitary follicular cells secrete an inhibitor of aortic endothelial cell growth: identification as leukemia inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*: 698-702.
- Fievet, B., Louvard, D. et Arpin, M. (2007). ERM proteins in epithelial cell organization and functions. *Biochim Biophys Acta* *1773*: 653-60.
- Ford, H.L., Silver, D.L., Kachar, B., Sellers, J.R. et Zain, S.B. (1997). Effect of Mts1 on the structure and activity of nonmuscle myosin II. *Biochemistry* *36*: 16321-7.
- Fortin, M.E., Pelletier, R.M., Meilleur, M.A. et Vitale, M.L. (2006). Modulation of GJA1 turnover and intercellular communication by proinflammatory cytokines in the anterior pituitary folliculostellate cell line TtT/GF. *Biol Reprod* *74*: 2-12.

- Friederich, E., Vancompernelle, K., Louvard, D. et Vandekerckhove, J. (1999). Villin function in the organization of the actin cytoskeleton. Correlation of in vivo effects to its biochemical activities in vitro. *J Biol Chem* 274: 26751-60.
- Frisch, S.M., Vuori, K., Ruoslahti, E. et Chan-Hui, P.Y. (1996). Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase. *J Cell Biol* 134: 793-9.
- Gallet, C., Rosa, J.P., Habib, A., Lebret, M., Levy-Toledano, S. et Maclouf, J. (1999). Tyrosine phosphorylation of cortactin associated with Syk accompanies thromboxane analogue-induced platelet shape change. *J Biol Chem* 274: 23610-6.
- Garcia, J.G., Verin, A.D., Schaphorst, K., Siddiqui, R., Patterson, C.E., Csontos, C. et Natarajan, V. (1999). Regulation of endothelial cell myosin light chain kinase by Rho, cortactin, and p60(src). *Am J Physiol* 276: L989-98.
- Gavet, O., Ozon, S., Manceau, V., Lawler, S., Curmi, P. et Sobel, A. (1998). The stathmin phosphoprotein family: intracellular localization and effects on the microtubule network. *J Cell Sci* 111 (Pt 22): 3333-46.
- Geisler, N., Hatzfeld, M. et Weber, K. (1989). Phosphorylation in vitro of vimentin by protein kinases A and C is restricted to the head domain. Identification of the phosphoserine sites and their influence on filament formation. *Eur J Biochem* 183: 441-7.
- Georgatos, S.D. et Marchesi, V.T. (1985). The binding of vimentin to human erythrocyte membranes: a model system for the study of intermediate filament-membrane interactions. *J Cell Biol* 100: 1955-61.
- Gerner, C., Frohwein, U., Gotzmann, J., Bayer, E., Gelbmann, D., Bursch, W. et Schulte-Hermann, R. (2000). The Fas-induced apoptosis analyzed by high throughput proteome analysis. *J Biol Chem* 275: 39018-26.
- Gilyarov, A.V. (2008). Nestin in central nervous system cells. *Neurosci Behav Physiol* 38: 165-9.
- Girod, C., Trouillas, J. et Dubois, M.P. (1985). Immunocytochemical localization of S-100 protein in stellate cells (folliculo-stellate cells) of the anterior lobe of the normal human pituitary. *Cell Tissue Res* 241: 505-11.
- Goeckeler, Z.M., Masaracchia, R.A., Zeng, Q., Chew, T.L., Gallagher, P. et Wysolmerski, R.B. (2000). Phosphorylation of myosin light chain kinase by p21-activated kinase PAK2. *J Biol Chem* 275: 18366-74.
- Golomb, E., Ma, X., Jana, S.S., Preston, Y.A., Kawamoto, S., Shoham, N.G., Goldin, E., Conti, M.A., Sellers, J.R. et Adelstein, R.S. (2004). Identification and characterization of nonmuscle myosin II-C, a new member of the myosin II family. *J Biol Chem* 279: 2800-8.
- Goode, B.L. et Eck, M.J. (2007). Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. *Annu Rev Biochem* 76: 593-627.
- Goodwin, M. et Yap, A.S. (2004). Classical cadherin adhesion molecules: coordinating cell adhesion, signaling and the cytoskeleton. *J Mol Histol* 35: 839-44.
- Gospodarowicz, D. et Lau, K. (1989). Pituitary follicular cells secrete both vascular endothelial growth factor and follistatin. *Biochem Biophys Res Commun* 165: 292-8.

- Goto, H., Tanabe, K., Manser, E., Lim, L., Yasui, Y. et Inagaki, M. (2002). Phosphorylation and reorganization of vimentin by p21-activated kinase (PAK). *Genes Cells* 7: 91-7.
- Gotz, J. et Ittner, L.M. (2008). Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Nat Rev Neurosci* 9: 532-44.
- Green, K.J., Bohringer, M., Gocken, T. et Jones, J.C. (2005). Intermediate filament associated proteins. *Adv Protein Chem* 70: 143-202.
- Green, K.J. et Jones, J.C. (1996). Desmosomes and hemidesmosomes: structure and function of molecular components. *Faseb J* 10: 871-81.
- Green, K.J., Parry, D.A., Steinert, P.M., Virata, M.L., Wagner, R.M., Angst, B.D. et Nilles, L.A. (1990). Structure of the human desmoplakins. Implications for function in the desmosomal plaque. *J Biol Chem* 265: 11406-7.
- Gumbiner, B.M. (2005). Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 622-34.
- Gumbiner, B.M. (2000). Regulation of cadherin adhesive activity. *J Cell Biol* 148: 399-404.
- Gundersen, G.G. et Bulinski, J.C. (1986). Microtubule arrays in differentiated cells contain elevated levels of a post-translationally modified form of tubulin. *Eur J Cell Biol* 42: 288-94.
- Gundersen, G.G. et Bulinski, J.C. (1988). Selective stabilization of microtubules oriented toward the direction of cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 5946-50.
- Gundersen, G.G., Kalnoski, M.H. et Bulinski, J.C. (1984). Distinct populations of microtubules: tyrosinated and nontyrosinated alpha tubulin are distributed differently in vivo. *Cell* 38: 779-89.
- Gundersen, G.G., Khawaja, S. et Bulinski, J.C. (1989). Generation of a stable, posttranslationally modified microtubule array is an early event in myogenic differentiation. *J Cell Biol* 109: 2275-88.
- Gurland, G. et Gundersen, G.G. (1995). Stable, detyrosinated microtubules function to localize vimentin intermediate filaments in fibroblasts. *J Cell Biol* 131: 1275-90.
- Gutjahr, M.C., Rossy, J. et Niggli, V. (2005). Role of Rho, Rac, and Rho-kinase in phosphorylation of myosin light chain, development of polarity, and spontaneous migration of Walker 256 carcinosarcoma cells. *Exp Cell Res* 308: 422-38.
- Haataja, L., Groffen, J. et Heisterkamp, N. (1997). Characterization of RAC3, a novel member of the Rho family. *J Biol Chem* 272: 20384-8.
- Hagmann, J., Burger, M.M. et Dagan, D. (1999). Regulation of plasma membrane blebbing by the cytoskeleton. *J Cell Biochem* 73: 488-99.
- Hall, A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279: 509-14.
- Halpain, S. et Dehmelt, L. (2006). The MAP1 family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol* 7: 224.

- Haque, F., Lloyd, D.J., Smallwood, D.T., Dent, C.L., Shanahan, C.M., Fry, A.M., Trembath, R.C. et Shackleton, S. (2006). SUN1 interacts with nuclear lamin A and cytoplasmic nesprins to provide a physical connection between the nuclear lamina and the cytoskeleton. *Mol Cell Biol* 26: 3738-51.
- Harrisson, F., Van Hoof, J. et Vakaet, L. (1982). The relationship between the folliculo-stellate network and the thyrotropic cells of the avian adenohypophysis. *Cell Tissue Res* 226: 97-111.
- Hartman, J.J., Mahr, J., McNally, K., Okawa, K., Iwamatsu, A., Thomas, S., Cheesman, S., Heuser, J., Vale, R.D. et McNally, F.J. (1998). Katanin, a microtubule-severing protein, is a novel AAA ATPase that targets to the centrosome using a WD40-containing subunit. *Cell* 93: 277-87.
- Hartshorne, D.J., Ito, M. et Erdodi, F. (1998). Myosin light chain phosphatase: subunit composition, interactions and regulation. *J Muscle Res Cell Motil* 19: 325-41.
- Hartwig, J.H., Bokoch, G.M., Carpenter, C.L., Janmey, P.A., Taylor, L.A., Toker, A. et Stossel, T.P. (1995). Thrombin receptor ligation and activated Rac uncap actin filament barbed ends through phosphoinositide synthesis in permeabilized human platelets. *Cell* 82: 643-53.
- Hayden, J.H., Bowser, S.S. et Rieder, C.L. (1990). Kinetochores capture astral microtubules during chromosome attachment to the mitotic spindle: direct visualization in live newt lung cells. *J Cell Biol* 111: 1039-45.
- He, H., Watanabe, T., Zhan, X., Huang, C., Schuurig, E., Fukami, K., Takenawa, T., Kumar, C.C., Simpson, R.J. et Maruta, H. (1998). Role of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in Ras/Rac-induced disruption of the cortactin-actomyosin II complex and malignant transformation. *Mol Cell Biol* 18: 3829-37.
- Head, J.A., Jiang, D., Li, M., Zorn, L.J., Schaefer, E.M., Parsons, J.T. et Weed, S.A. (2003). Cortactin tyrosine phosphorylation requires Rac1 activity and association with the cortical actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell* 14: 3216-29.
- Heasman, S.J. et Ridley, A.J. (2008). Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 690-701.
- Helfand, B.T., Chang, L. et Goldman, R.D. (2003). The dynamic and motile properties of intermediate filaments. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19: 445-67.
- Helfand, B.T., Chang, L. et Goldman, R.D. (2004). Intermediate filaments are dynamic and motile elements of cellular architecture. *J Cell Sci* 117: 133-41.
- Helwani, F.M., Kovacs, E.M., Paterson, A.D., Verma, S., Ali, R.G., Fanning, A.S., Weed, S.A. et Yap, A.S. (2004). Cortactin is necessary for E-cadherin-mediated contact formation and actin reorganization. *J Cell Biol* 164: 899-910.
- Herrmann, H. et Aebi, U. (1998). Intermediate filament assembly: fibrillogenesis is driven by decisive dimer-dimer interactions. *Curr Opin Struct Biol* 8: 177-85.



- Herrmann, H. et Aebi, U. (2000). Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. *Curr Opin Cell Biol* *12*: 79-90.
- Hersey, P. et Zhang, X.D. (2003). Overcoming resistance of cancer cells to apoptosis. *J Cell Physiol* *196*: 9-18.
- Hesse, M., Magin, T.M. et Weber, K. (2001). Genes for intermediate filament proteins and the draft sequence of the human genome: novel keratin genes and a surprisingly high number of pseudogenes related to keratin genes 8 and 18. *J Cell Sci* *114*: 2569-75.
- Higgs, H.N., Blanchoin, L. et Pollard, T.D. (1999). Influence of the C terminus of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) and the Arp2/3 complex on actin polymerization. *Biochemistry* *38*: 15212-22.
- Higgs, H.N. et Pollard, T.D. (2001). Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of proteins. *Annu Rev Biochem* *70*: 649-76.
- Hildebrandt, E.R. et Hoyt, M.A. (2000). Mitotic motors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* *1496*: 99-116.
- Hirai, T. et Chida, K. (2003). Protein kinase Czeta (PKCzeta): activation mechanisms and cellular functions. *J Biochem* *133*: 1-7.
- Hirokawa, N., Noda, Y. et Okada, Y. (1998). Kinesin and dynein superfamily proteins in organelle transport and cell division. *Curr Opin Cell Biol* *10*: 60-73.
- Howard, J. et Hyman, A.A. (2003). Dynamics and mechanics of the microtubule plus end. *Nature* *422*: 753-8.
- Hsu, H., Huang, J., Shu, H.B., Baichwal, V. et Goeddel, D.V. (1996a). TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity* *4*: 387-96.
- Hsu, H., Shu, H.B., Pan, M.G. et Goeddel, D.V. (1996b). TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* *84*: 299-308.
- Huang, T.Y., DerMardirossian, C. et Bokoch, G.M. (2006). Cofilin phosphatases and regulation of actin dynamics. *Curr Opin Cell Biol* *18*: 26-31.
- Huber, A.H. et Weis, W.I. (2001). The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin. *Cell* *105*: 391-402.
- Huot, J., Houle, F., Rousseau, S., Deschesnes, R.G., Shah, G.M. et Landry, J. (1998). SAPK2/p38-dependent F-actin reorganization regulates early membrane blebbing during stress-induced apoptosis. *J Cell Biol* *143*: 1361-73.
- Ibarra, N., Pollitt, A. et Insall, R.H. (2005). Regulation of actin assembly by SCAR/WAVE proteins. *Biochem Soc Trans* *33*: 1243-6.
- Ikebe, M., Hartshorne, D.J. et Elzinga, M. (1986). Identification, phosphorylation, and dephosphorylation of a second site for myosin light chain kinase on the 20,000-dalton light chain of smooth muscle myosin. *J Biol Chem* *261*: 36-9.

- Ikebe, M., Komatsu, S., Woodhead, J.L., Mabuchi, K., Ikebe, R., Saito, J., Craig, R. et Higashihara, M. (2001). The tip of the coiled-coil rod determines the filament formation of smooth muscle and nonmuscle myosin. *J Biol Chem* 276: 30293-300.
- Ikebe, M. et Reardon, S. (1990). Phosphorylation of bovine platelet myosin by protein kinase C. *Biochemistry* 29: 2713-20.
- Illes, A., Enyedi, B., Tamas, P., Balazs, A., Bogel, G. et Buday, L. (2006). Inducible phosphorylation of cortactin is not necessary for cortactin-mediated actin polymerisation. *Cell Signal* 18: 830-40.
- Inoue, K., Matsumoto, H., Koyama, C., Shibata, K., Nakazato, Y. et Ito, A. (1992). Establishment of a folliculo-stellate-like cell line from a murine thyrotropic pituitary tumor. *Endocrinology* 131: 3110-6.
- Inoue, S. et Salmon, E.D. (1995). Force generation by microtubule assembly/disassembly in mitosis and related movements. *Mol Biol Cell* 6: 1619-40.
- Ishizaki, T., Maekawa, M., Fujisawa, K., Okawa, K., Iwamatsu, A., Fujita, A., Watanabe, N., Saito, Y., Kakizuka, A., Morii, N. et Narumiya, S. (1996). The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase. *Embo J* 15: 1885-93.
- Ito, M., Nakano, T., Erdodi, F. et Hartshorne, D.J. (2004). Myosin phosphatase: structure, regulation and function. *Mol Cell Biochem* 259: 197-209.
- Itoh, K. et Adelstein, R.S. (1995). Neuronal cell expression of inserted isoforms of vertebrate nonmuscle myosin heavy chain II-B. *J Biol Chem* 270: 14533-40.
- Itoh, N. et Nagata, S. (1993). A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem* 268: 10932-7.
- Ivanov, A.I., Bachar, M., Babbin, B.A., Adelstein, R.S., Nusrat, A. et Parkos, C.A. (2007). A unique role for nonmuscle myosin heavy chain IIA in regulation of epithelial apical junctions. *PLoS ONE* 2: e658.
- Ivanov, A.I., Hunt, D., Utech, M., Nusrat, A. et Parkos, C.A. (2005). Differential roles for actin polymerization and a myosin II motor in assembly of the epithelial apical junctional complex. *Mol Biol Cell* 16: 2636-50.
- Jana, S.S., Kawamoto, S. et Adelstein, R.S. (2006). A specific isoform of nonmuscle myosin II-C is required for cytokinesis in a tumor cell line. *J Biol Chem* 281: 24662-70.
- Janicke, R.U., Ng, P., Sprengart, M.L. et Porter, A.G. (1998). Caspase-3 is required for alpha-fodrin cleavage but dispensable for cleavage of other death substrates in apoptosis. *J Biol Chem* 273: 15540-5.
- Janmey, P.A., Chaponnier, C., Lind, S.E., Zaner, K.S., Stossel, T.P. et Yin, H.L. (1985). Interactions of gelsolin and gelsolin-actin complexes with actin. Effects of calcium on actin nucleation, filament severing, and end blocking. *Biochemistry* 24: 3714-23.
- Jay, P.Y., Pham, P.A., Wong, S.A. et Elson, E.L. (1995). A mechanical function of myosin II in cell motility. *J Cell Sci* 108 (Pt 1): 387-93.

- Jellinger, K.A. (2001). Cell death mechanisms in neurodegeneration. *J Cell Mol Med* 5: 1-17.
- Jellinger, K.A. et Stadelmann, C. (2001). Problems of cell death in neurodegeneration and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 3: 31-40.
- Jennings, L.K., Fox, J.E., Edwards, H.H. et Phillips, D.R. (1981). Changes in the cytoskeletal structure of human platelets following thrombin activation. *J Biol Chem* 256: 6927-32.
- Jones, J.C., Goldman, A.E., Yang, H.Y. et Goldman, R.D. (1985). The organizational fate of intermediate filament networks in two epithelial cell types during mitosis. *J Cell Biol* 100: 93-102.
- Kamm, K.E. et Stull, J.T. (1989). Regulation of smooth muscle contractile elements by second messengers. *Annu Rev Physiol* 51: 299-313.
- Kanner, S.B., Reynolds, A.B., Vines, R.R. et Parsons, J.T. (1990). Monoclonal antibodies to individual tyrosine-phosphorylated protein substrates of oncogene-encoded tyrosine kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 3328-32.
- Karin, M., Liu, Z. et Zandi, E. (1997). AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9: 240-6.
- Kato, M., Fukuda, H., Nonaka, T. et Imajoh-Ohmi, S. (2005). Cleavage of nonmuscle myosin heavy chain-A during apoptosis in human Jurkat T cells. *J Biochem (Tokyo)* 137: 157-66.
- Kato, M., Nonaka, T., Maki, M., Kikuchi, H. et Imajoh-Ohmi, S. (2000). Caspases cleave the amino-terminal calpain inhibitory unit of calpastatin during apoptosis in human Jurkat T cells. *J Biochem* 127: 297-305.
- Katsube, T., Takahisa, M., Ueda, R., Hashimoto, N., Kobayashi, M. et Togashi, S. (1998). Cortactin associates with the cell-cell junction protein ZO-1 in both *Drosophila* and mouse. *J Biol Chem* 273: 29672-7.
- Katsumi, A., Milanini, J., Kiosses, W.B., del Pozo, M.A., Kaunas, R., Chien, S., Hahn, K.M. et Schwartz, M.A. (2002). Effects of cell tension on the small GTPase Rac. *J Cell Biol* 158: 153-64.
- Katsuragawa, Y., Yanagisawa, M., Inoue, A. et Masaki, T. (1989). Two distinct nonmuscle myosin-heavy-chain mRNAs are differentially expressed in various chicken tissues. Identification of a novel gene family of vertebrate non-sarcomeric myosin heavy chains. *Eur J Biochem* 184: 611-6.
- Kawamoto, S. et Adelstein, R.S. (1991). Chicken nonmuscle myosin heavy chains: differential expression of two mRNAs and evidence for two different polypeptides. *J Cell Biol* 112: 915-24.
- Kawamoto, S., Bengur, A.R., Sellers, J.R. et Adelstein, R.S. (1989). In situ phosphorylation of human platelet myosin heavy and light chains by protein kinase C. *J Biol Chem* 264: 2258-65.
- Kawano, Y., Fukata, Y., Oshiro, N., Amano, M., Nakamura, T., Ito, M., Matsumura, F., Inagaki, M. et Kaibuchi, K. (1999). Phosphorylation of myosin-binding subunit (MBS) of myosin phosphatase by Rho-kinase in vivo. *J Cell Biol* 147: 1023-38.

- Kelley, C.A. et Adelstein, R.S. (1990). The 204-kDa smooth muscle myosin heavy chain is phosphorylated in intact cells by casein kinase II on a serine near the carboxyl terminus. *J Biol Chem* 265: 17876-82.
- Kelley, C.A., Sellers, J.R., Gard, D.L., Bui, D., Adelstein, R.S. et Baines, I.C. (1996). Xenopus nonmuscle myosin heavy chain isoforms have different subcellular localizations and enzymatic activities. *J Cell Biol* 134: 675-87.
- Kempiak, S.J., Yamaguchi, H., Sarmiento, C., Sidani, M., Ghosh, M., Eddy, R.J., Desmarais, V., Way, M., Condeelis, J. et Segall, J.E. (2005). A neural Wiskott-Aldrich Syndrome protein-mediated pathway for localized activation of actin polymerization that is regulated by cortactin. *J Biol Chem* 280: 5836-42.
- Kim, L. et Wong, T.W. (1998). Growth factor-dependent phosphorylation of the actin-binding protein cortactin is mediated by the cytoplasmic tyrosine kinase FER. *J Biol Chem* 273: 23542-8.
- Kimura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., Yamamori, B., Feng, J., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A. et Kaibuchi, K. (1996). Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* 273: 245-8.
- Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H. et Peter, M.E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J* 14: 5579-88.
- Kitamura, Y., Shibagaki, K., Takata, K., Tsuchiya, D., Taniguchi, T., Gebicke-Haerter, P.J., Miki, H., Takenawa, T. et Shimohama, S. (2003). Involvement of Wiskott-Aldrich syndrome protein family verprolin-homologous protein (WAVE) and Rac1 in the phagocytosis of amyloid-beta(1-42) in rat microglia. *J Pharmacol Sci* 92: 115-23.
- Knepper-Nicolai, B., Savill, J. et Brown, S.B. (1998). Constitutive apoptosis in human neutrophils requires synergy between calpains and the proteasome downstream of caspases. *J Biol Chem* 273: 30530-6.
- Kobayashi, H., Fukata, J., Murakami, N., Usui, T., Ebisui, O., Muro, S., Hanaoka, I., Inoue, K., Imura, H. et Nakao, K. (1997). Tumor necrosis factor receptors in the pituitary cells. *Brain Res* 758: 45-50.
- Kobayashi, N., Karisola, P., Pena-Cruz, V., Dorfman, D.M., Jinushi, M., Umetsu, S.E., Butte, M.J., Nagumo, H., Chernova, I., Zhu, B., Sharpe, A.H., Ito, S., Dranoff, G., Kaplan, G.G., Casanovas, J.M., Umetsu, D.T., Dekruyff, R.H. et Freeman, G.J. (2007). TIM-1 and TIM-4 glycoproteins bind phosphatidylserine and mediate uptake of apoptotic cells. *Immunity* 27: 927-40.
- Koch, A.W., Bozic, D., Pertz, O. et Engel, J. (1999). Homophilic adhesion by cadherins. *Curr Opin Struct Biol* 9: 275-81.
- Kolega, J. (1998). Cytoplasmic dynamics of myosin IIA and IIB: spatial 'sorting' of isoforms in locomoting cells. *J Cell Sci* 111 (Pt 15): 2085-95.

- Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K., McGarry, T.J., Kirschner, M.W., Kohts, K., Kwiatkowski, D.J. et Williams, L.T. (1997). Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 278: 294-8.
- Kovacs, M., Toth, J., Hetenyi, C., Malnasi-Csizmadia, A. et Sellers, J.R. (2004). Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II. *J Biol Chem* 279: 35557-63.
- Kovacs, M., Wang, F., Hu, A., Zhang, Y. et Sellers, J.R. (2003). Functional divergence of human cytoplasmic myosin II: kinetic characterization of the non-muscle IIA isoform. *J Biol Chem* 278: 38132-40.
- Kovar, D.R. (2006). Molecular details of formin-mediated actin assembly. *Curr Opin Cell Biol* 18: 11-7.
- Koyama, M., Ito, M., Feng, J., Seko, T., Shiraki, K., Takase, K., Hartshorne, D.J. et Nakano, T. (2000). Phosphorylation of CPI-17, an inhibitory phosphoprotein of smooth muscle myosin phosphatase, by Rho-kinase. *FEBS Lett* 475: 197-200.
- Kreitzer, G., Liao, G. et Gundersen, G.G. (1999). Detyrosination of tubulin regulates the interaction of intermediate filaments with microtubules in vivo via a kinesin-dependent mechanism. *Mol Biol Cell* 10: 1105-18.
- Krendel, M., Gloushankova, N.A., Bonder, E.M., Feder, H.H., Vasiliev, J.M. et Gelfand, I.M. (1999). Myosin-dependent contractile activity of the actin cytoskeleton modulates the spatial organization of cell-cell contacts in cultured epitheliocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 9666-70.
- Krendel, M. et Mooseker, M.S. (2005). Myosins: tails (and heads) of functional diversity. *Physiology (Bethesda)* 20: 239-51.
- Kriajevska, M., Bronstein, I.B., Scott, D.J., Tarabykina, S., Fischer-Larsen, M., Issinger, O. et Lukanidin, E. (2000). Metastasis-associated protein Mts1 (S100A4) inhibits CK2-mediated phosphorylation and self-assembly of the heavy chain of nonmuscle myosin. *Biochim Biophys Acta* 1498: 252-63.
- Kriajevska, M., Tarabykina, S., Bronstein, I., Maitland, N., Lomonosov, M., Hansen, K., Georgiev, G. et Lukanidin, E. (1998). Metastasis-associated Mts1 (S100A4) protein modulates protein kinase C phosphorylation of the heavy chain of nonmuscle myosin. *J Biol Chem* 273: 9852-6.
- Ku, N.O., Liao, J., Chou, C.F. et Omary, M.B. (1996). Implications of intermediate filament protein phosphorylation. *Cancer Metastasis Rev* 15: 429-44.
- Kuczmarski, E.R. et Spudich, J.A. (1980). Regulation of myosin self-assembly: phosphorylation of Dictyostelium heavy chain inhibits formation of thick filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77: 7292-6.
- Kumar, S. (1999). Mechanisms mediating caspase activation in cell death. *Cell Death Differ* 6: 1060-6.

- Kureishi, Y., Kobayashi, S., Amano, M., Kimura, K., Kanaide, H., Nakano, T., Kaibuchi, K. et Ito, M. (1997). Rho-associated kinase directly induces smooth muscle contraction through myosin light chain phosphorylation. *J Biol Chem* 272: 12257-60.
- Lai, F.P., Szczodrak, M., Block, J., Faix, J., Breitsprecher, D., Mannherz, H.G., Stradal, T.E., Dunn, G.A., Small, J.V. et Rottner, K. (2008). Arp2/3 complex interactions and actin network turnover in lamellipodia. *Embo J* 27: 982-92.
- Lamkanfi, M., Festjens, N., Declercq, W., Vanden Berghe, T. et Vandenabeele, P. (2007). Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death Differ* 14: 44-55.
- Landsverk, M.L. et Epstein, H.F. (2005). Genetic analysis of myosin II assembly and organization in model organisms. *Cell Mol Life Sci* 62: 2270-82.
- Lauffenburger, D.A. et Horwitz, A.F. (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84: 359-69.
- Lavastre, V., Binet, F., Moisan, E., Chiasson, S. et Girard, D. (2007). *Viscum album* agglutinin-I induces degradation of cytoskeletal proteins in leukaemia PLB-985 cells differentiated toward neutrophils: cleavage of non-muscle myosin heavy chain-IIA by caspases. *Br J Haematol* 138: 545-54.
- Lee, C., Ferguson, M. et Chen, L.B. (1989). Construction of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 109: 2045-55.
- Lee, J.H., Koh, H., Kim, M., Kim, Y., Lee, S.Y., Karess, R.E., Lee, S.H., Shong, M., Kim, J.M., Kim, J. et Chung, J. (2007). Energy-dependent regulation of cell structure by AMP-activated protein kinase. *Nature* 447: 1017-20.
- Leung, T., Chen, X.Q., Manser, E. et Lim, L. (1996). The p160 RhoA-binding kinase ROK alpha is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton. *Mol Cell Biol* 16: 5313-27.
- Leverrier, Y. et Ridley, A.J. (2001). Apoptosis: caspases orchestrate the ROCK 'n' bleb. *Nat Cell Biol* 3: E91-3.
- Li, E., Bestor, T.H. et Jaenisch, R. (1992). Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69: 915-26.
- Li, Z.H., Spektor, A., Varlamova, O. et Bresnick, A.R. (2003). Mts1 regulates the assembly of nonmuscle myosin-IIA. *Biochemistry* 42: 14258-66.
- Litchfield, D.W. et Luscher, B. (1993). Casein kinase II in signal transduction and cell cycle regulation. *Mol Cell Biochem* 127-128: 187-99.
- Lo, C.M., Buxton, D.B., Chua, G.C., Dembo, M., Adelstein, R.S. et Wang, Y.L. (2004). Nonmuscle myosin IIb is involved in the guidance of fibroblast migration. *Mol Biol Cell* 15: 982-9.
- Lo, C.M., Wang, H.B., Dembo, M. et Wang, Y.L. (2000). Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys J* 79: 144-52.
- Lohrer, P., Gloddek, J., Nagashima, A.C., Korali, Z., Hopfner, U., Pereda, M.P., Arzt, E., Stalla, G.K. et Renner, U. (2000). Lipopolysaccharide directly stimulates the intrapituitary

- interleukin-6 production by folliculostellate cells via specific receptors and the p38alpha mitogen-activated protein kinase/nuclear factor-kappaB pathway. *Endocrinology* 141: 4457-65.
- Lontay, B., Kiss, A., Gergely, P., Hartshorne, D.J. et Erdodi, F. (2005). Okadaic acid induces phosphorylation and translocation of myosin phosphatase target subunit 1 influencing myosin phosphorylation, stress fiber assembly and cell migration in HepG2 cells. *Cell Signal* 17: 1265-75.
- Los, M., Stroh, C., Janicke, R.U., Engels, I.H. et Schulze-Osthoff, K. (2001). Caspases: more than just killers? *Trends Immunol* 22: 31-4.
- Lynch, D.K., Winata, S.C., Lyons, R.J., Hughes, W.E., Lehrbach, G.M., Wasinger, V., Corthals, G., Cordwell, S. et Daly, R.J. (2003). A Cortactin-CD2-associated protein (CD2AP) complex provides a novel link between epidermal growth factor receptor endocytosis and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 278: 21805-13.
- Ma, X., Bao, J. et Adelstein, R.S. (2007). Loss of cell adhesion causes hydrocephalus in nonmuscle myosin II-B-ablated and mutated mice. *Mol Biol Cell* 18: 2305-12.
- Mabuchi, I. et Okuno, M. (1977). The effect of myosin antibody on the division of starfish blastomeres. *J Cell Biol* 74: 251-63.
- Machesky, L.M., Atkinson, S.J., Ampe, C., Vandekerckhove, J. et Pollard, T.D. (1994). Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from *Acanthamoeba* by affinity chromatography on profilin-agarose. *J Cell Biol* 127: 107-15.
- Maciver, S.K. (1998). How ADF/cofilin depolymerizes actin filaments. *Curr Opin Cell Biol* 10: 140-4.
- Maciver, S.K., Pope, B.J., Whytock, S. et Weeds, A.G. (1998). The effect of two actin depolymerizing factors (ADF/cofilins) on actin filament turnover: pH sensitivity of F-actin binding by human ADF, but not of *Acanthamoeba* actophorin. *Eur J Biochem* 256: 388-97.
- Maciver, S.K., Zot, H.G. et Pollard, T.D. (1991). Characterization of actin filament severing by actophorin from *Acanthamoeba castellanii*. *J Cell Biol* 115: 1611-20.
- Madkour, M.H. et Mayer, F. (2007). Intracellular cytoskeletal elements and cytoskeletons in bacteria. *Sci Prog* 90: 73-102.
- Maekawa, M., Ishizaki, T., Boku, S., Watanabe, N., Fujita, A., Iwamatsu, A., Obinata, T., Ohashi, K., Mizuno, K. et Narumiya, S. (1999). Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science* 285: 895-8.
- Maney, T., Wagenbach, M. et Wordeman, L. (2001). Molecular dissection of the microtubule depolymerizing activity of mitotic centromere-associated kinesin. *J Biol Chem* 276: 34753-8.
- Marchand, J.B., Kaiser, D.A., Pollard, T.D. et Higgs, H.N. (2001). Interaction of WASP/Scar proteins with actin and vertebrate Arp2/3 complex. *Nat Cell Biol* 3: 76-82.
- Marettova, E. et Marett, M. (2004). Immunohistochemical localization of S-100 protein in the pig pituitary gland. *Anat Histol Embryol* 33: 344-7.

- Martin, S.J. et Green, D.R. (1995). Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell* 82: 349-52.
- Martin, S.J., O'Brien, G.A., Nishioka, W.K., McGahon, A.J., Mahboubi, A., Saido, T.C. et Green, D.R. (1995). Proteolysis of fodrin (non-erythroid spectrin) during apoptosis. *J Biol Chem* 270: 6425-8.
- Martinez-Quiles, N., Ho, H.Y., Kirschner, M.W., Ramesh, N. et Geha, R.S. (2004). Erk/Src phosphorylation of cortactin acts as a switch on-switch off mechanism that controls its ability to activate N-WASP. *Mol Cell Biol* 24: 5269-80.
- Martinez, M.C., Ochiishi, T., Majewski, M. et Kosik, K.S. (2003). Dual regulation of neuronal morphogenesis by a delta-catenin-cortactin complex and Rho. *J Cell Biol* 162: 99-111.
- Mashima, T., Naito, M. et Tsuruo, T. (1999). Caspase-mediated cleavage of cytoskeletal actin plays a positive role in the process of morphological apoptosis. *Oncogene* 18: 2423-30.
- Matsui, T., Amano, M., Yamamoto, T., Chihara, K., Nakafuku, M., Ito, M., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A. et Kaibuchi, K. (1996). Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. *Embo J* 15: 2208-16.
- Matsui, T., Maeda, M., Doi, Y., Yonemura, S., Amano, M., Kaibuchi, K., Tsukita, S. et Tsukita, S. (1998). Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association. *J Cell Biol* 140: 647-57.
- Matsumura, F. (2005). Regulation of myosin II during cytokinesis in higher eukaryotes. *Trends Cell Biol* 15: 371-7.
- Matsumura, F., Totsukawa, G., Yamakita, Y. et Yamashiro, S. (2001). Role of myosin light chain phosphorylation in the regulation of cytokinesis. *Cell Struct Funct* 26: 639-44.
- Matto-Yelin, M., Aitken, A. et Ravid, S. (1997). 14-3-3 inhibits the Dictyostelium myosin II heavy-chain-specific protein kinase C activity by a direct interaction: identification of the 14-3-3 binding domain. *Mol Biol Cell* 8: 1889-99.
- Maupin, P., Phillips, C.L., Adelstein, R.S. et Pollard, T.D. (1994). Differential localization of myosin-II isozymes in human cultured cells and blood cells. *J Cell Sci* 107 ( Pt 11): 3077-90.
- Mayer-Jaekel, R.E., Ohkura, H., Ferrigno, P., Andjelkovic, N., Shiomi, K., Uemura, T., Glover, D.M. et Hemmings, B.A. (1994). Drosophila mutants in the 55 kDa regulatory subunit of protein phosphatase 2A show strongly reduced ability to dephosphorylate substrates of p34cdc2. *J Cell Sci* 107 ( Pt 9): 2609-16.
- McGough, A. et Chiu, W. (1999). ADF/cofilin weakens lateral contacts in the actin filament. *J Mol Biol* 291: 513-9.
- McLachlan, A.D. et Karn, J. (1982). Periodic charge distributions in the myosin rod amino acid sequence match cross-bridge spacings in muscle. *Nature* 299: 226-31.
- McNiven, M.A., Kim, L., Krueger, E.W., Orth, J.D., Cao, H. et Wong, T.W. (2000). Regulated interactions between dynamin and the actin-binding protein cortactin modulate cell shape. *J Cell Biol* 151: 187-98.



- Meads, T. et Schroer, T.A. (1995). Polarity and nucleation of microtubules in polarized epithelial cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 32: 273-88.
- Meilleur, M.A., Akpovi, C.D., Pelletier, R.M. et Vitale, M.L. (2007). Tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced anterior pituitary folliculostellate TtT/GF cell uncoupling is mediated by connexin 43 dephosphorylation. *Endocrinology* 148: 5913-24.
- Miki, H., Suetsugu, S. et Takenawa, T. (1998). WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *Embo J* 17: 6932-41.
- Millard, T.H., Sharp, S.J. et Machesky, L.M. (2004). Signalling to actin assembly via the WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein)-family proteins and the Arp2/3 complex. *Biochem J* 380: 1-17.
- Miller, M., Bower, E., Levitt, P., Li, D. et Chantler, P.D. (1992). Myosin II distribution in neurons is consistent with a role in growth cone motility but not synaptic vesicle mobilization. *Neuron* 8: 25-44.
- Mills, J.C., Stone, N.L., Erhardt, J. et Pittman, R.N. (1998). Apoptotic membrane blebbing is regulated by myosin light chain phosphorylation. *J Cell Biol* 140: 627-36.
- Mills, J.C., Stone, N.L. et Pittman, R.N. (1999). Extranuclear apoptosis. The role of the cytoplasm in the execution phase. *J Cell Biol* 146: 703-8.
- Mimori-Kiyosue, Y., Grigoriev, I., Lansbergen, G., Sasaki, H., Matsui, C., Severin, F., Galjart, N., Grosveld, F., Vorobjev, I., Tsukita, S. et Akhmanova, A. (2005). CLASP1 and CLASP2 bind to EB1 and regulate microtubule plus-end dynamics at the cell cortex. *J Cell Biol* 168: 141-53.
- Mimori-Kiyosue, Y., Shiina, N. et Tsukita, S. (2000). The dynamic behavior of the APC-binding protein EB1 on the distal ends of microtubules. *Curr Biol* 10: 865-8.
- Minambres, R., Guasch, R.M., Perez-Arago, A. et Guerri, C. (2006). The RhoA/ROCK-I/MLC pathway is involved in the ethanol-induced apoptosis by anoikis in astrocytes. *J Cell Sci* 119: 271-82.
- Mitchison, T. et Kirschner, M. (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312: 237-42.
- Mitchison, T.J. et Cramer, L.P. (1996). Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell* 84: 371-9.
- Mockrin, S.C. et Korn, E.D. (1980). Acanthamoeba profilin interacts with G-actin to increase the rate of exchange of actin-bound adenosine 5'-triphosphate. *Biochemistry* 19: 5359-62.
- Morton, N.E. (1956). The detection and estimation of linkage between the genes for elliptocytosis and the Rh blood type. *Am J Hum Genet* 8: 80-96.
- Moubarak, R.S., Yuste, V.J., Artus, C., Bouharrou, A., Greer, P.A., Menissier-de Murcia, J. et Susin, S.A. (2007). Sequential activation of poly(ADP-ribose) polymerase 1, calpains, and Bax is essential in apoptosis-inducing factor-mediated programmed necrosis. *Mol Cell Biol* 27: 4844-62.

- Moussavi, R.S., Kelley, C.A. et Adelstein, R.S. (1993). Phosphorylation of vertebrate nonmuscle and smooth muscle myosin heavy chains and light chains. *Mol Cell Biochem* 127-128: 219-27.
- Mullins, R.D., Heuser, J.A. et Pollard, T.D. (1998). The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 6181-6.
- Murakami, N., Chauhan, V.P. et Elzinga, M. (1998). Two nonmuscle myosin II heavy chain isoforms expressed in rabbit brains: filament forming properties, the effects of phosphorylation by protein kinase C and casein kinase II, and location of the phosphorylation sites. *Biochemistry* 37: 1989-2003.
- Murakami, N. et Elzinga, M. (1992). Immunohistochemical studies on the distribution of cellular myosin II isoforms in brain and aorta. *Cell Motil Cytoskeleton* 22: 281-95.
- Murakami, N., Elzinga, M., Singh, S.S. et Chauhan, V.P. (1994). Direct binding of myosin II to phospholipid vesicles via tail regions and phosphorylation of the heavy chains by protein kinase C. *J Biol Chem* 269: 16082-90.
- Murakami, N., Healy-Louie, G. et Elzinga, M. (1990). Amino acid sequence around the serine phosphorylated by casein kinase II in brain myosin heavy chain. *J Biol Chem* 265: 1041-7.
- Murakami, N., Kotula, L. et Hwang, Y.W. (2000). Two distinct mechanisms for regulation of nonmuscle myosin assembly via the heavy chain: phosphorylation for MIIB and mts 1 binding for MIIA. *Biochemistry* 39: 11441-51.
- Murakami, N., Matsumura, S. et Kumon, A. (1984). Purification and identification of myosin heavy chain kinase from bovine brain. *J Biochem (Tokyo)* 95: 651-60.
- Murakami, N., Mehta, P. et Elzinga, M. (1991). Studies on the distribution of cellular myosin with antibodies to isoform-specific synthetic peptides. *FEBS Lett* 288: 247.
- Murakami, N., Singh, S.S., Chauhan, V.P. et Elzinga, M. (1995). Phospholipid binding, phosphorylation by protein kinase C, and filament assembly of the COOH terminal heavy chain fragments of nonmuscle myosin II isoforms MIIA and MIIB. *Biochemistry* 34: 16046-55.
- Murakami, N., Trenkner, E. et Elzinga, M. (1993). Changes in expression of nonmuscle myosin heavy chain isoforms during muscle and nonmuscle tissue development. *Dev Biol* 157: 19-27.
- Murphy, M.B. et Egelhoff, T.T. (1999). Biochemical characterization of a Dictyostelium myosin II heavy-chain phosphatase that promotes filament assembly. *Eur J Biochem* 264: 582-90.
- Murphy, M.B., Levi, S.K. et Egelhoff, T.T. (1999). Molecular characterization and immunolocalization of Dictyostelium discoideum protein phosphatase 2A. *FEBS Lett* 456: 7-12.
- Nakajima, T., Yamaguchi, H. et Takahashi, K. (1980). S100 protein in folliculostellate cells of the rat pituitary anterior lobe. *Brain Res* 191: 523-31.

- Nakasawa, T., Takahashi, M., Matsuzawa, F., Aikawa, S., Togashi, Y., Saitoh, T., Yamagishi, A. et Yazawa, M. (2005). Critical regions for assembly of vertebrate nonmuscle myosin II. *Biochemistry* 44: 174-83.
- Nelson, W.J. (2008). Regulation of cell-cell adhesion by the cadherin-catenin complex. *Biochem Soc Trans* 36: 149-55.
- Nguyen, B., Carbajal, M.E. et Vitale, M.L. (1999). Intracellular mechanisms involved in dopamine-induced actin cytoskeleton organization and maintenance of a round phenotype in cultured rat lactotrope cells. *Endocrinology* 140: 3467-77.
- Nieznanski, K. et Sobieszek, A. (1997). Telokin (kinase-related protein) modulates the oligomeric state of smooth-muscle myosin light-chain kinase and its interaction with myosin filaments. *Biochem J* 322 (Pt 1): 65-71.
- Niggli, V. et Rossy, J. (2008). Ezrin/radixin/moesin: versatile controllers of signaling molecules and of the cortical cytoskeleton. *Int J Biochem Cell Biol* 40: 344-9.
- Nobes, C.D. et Hall, A. (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81: 53-62.
- O'Halloran, T.J., Ravid, S. et Spudich, J.A. (1990). Expression of Dictyostelium myosin tail segments in Escherichia coli: domains required for assembly and phosphorylation. *J Cell Biol* 110: 63-70.
- Obermeier, A., Ahmed, S., Manser, E., Yen, S.C., Hall, C. et Lim, L. (1998). PAK promotes morphological changes by acting upstream of Rac. *Embo J* 17: 4328-39.
- Ohoka, Y. et Takai, Y. (1998). Isolation and characterization of cortactin isoforms and a novel cortactin-binding protein, CBP90. *Genes Cells* 3: 603-12.
- Omary, M.B., Ku, N.O., Liao, J. et Price, D. (1998). Keratin modifications and solubility properties in epithelial cells and in vitro. *Subcell Biochem* 31: 105-40.
- Orlando, K.A., Stone, N.L. et Pittman, R.N. (2006). Rho kinase regulates fragmentation and phagocytosis of apoptotic cells. *Exp Cell Res* 312: 5-15.
- Osmanagic-Myers, S., Gregor, M., Walko, G., Burgstaller, G., Reipert, S. et Wiche, G. (2006). Plectin-controlled keratin cytoarchitecture affects MAP kinases involved in cellular stress response and migration. *J Cell Biol* 174: 557-68.
- Panetti, T.S. (2002). Tyrosine phosphorylation of paxillin, FAK, and p130CAS: effects on cell spreading and migration. *Front Biosci* 7: 143-50.
- Pantaloni, D., Le Clainche, C. et Carlier, M.F. (2001). Mechanism of actin-based motility. *Science* 292: 1502-6.
- Pasternak, C., Flicker, P.F., Ravid, S. et Spudich, J.A. (1989). Intermolecular versus intramolecular interactions of Dictyostelium myosin: possible regulation by heavy chain phosphorylation. *J Cell Biol* 109: 203-10.

- Pearson, R.B., Jakes, R., John, M., Kendrick-Jones, J. et Kemp, B.E. (1984). Phosphorylation site sequence of smooth muscle myosin light chain (Mr = 20 000). *FEBS Lett* 168: 108-12.
- Pelham, R.J., Jr. et Wang, Y. (1997). Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 13661-5.
- Pelham, R.J., Jr. et Wang, Y. (1999). High resolution detection of mechanical forces exerted by locomoting fibroblasts on the substrate. *Mol Biol Cell* 10: 935-45.
- Perez, F., Diamantopoulos, G.S., Stalder, R. et Kreis, T.E. (1999). CLIP-170 highlights growing microtubule ends in vivo. *Cell* 96: 517-27.
- Perrin, B.J., Amann, K.J. et Huttenlocher, A. (2006). Proteolysis of cortactin by calpain regulates membrane protrusion during cell migration. *Mol Biol Cell* 17: 239-50.
- Pestonjamasp, K.N., Pope, R.K., Wulfkühle, J.D. et Luna, E.J. (1997). Supervillin (p205): A novel membrane-associated, F-actin-binding protein in the villin/gelsolin superfamily. *J Cell Biol* 139: 1255-69.
- Plastino, J. et Sykes, C. (2005). The actin slingshot. *Curr Opin Cell Biol* 17: 62-6.
- Pollard, T.D. et Borisy, G.G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112: 453-65.
- Rajfur, Z., Roy, P., Otey, C., Romer, L. et Jacobson, K. (2002). Dissecting the link between stress fibres and focal adhesions by CALI with GFP fusion proteins. *Nat Cell Biol* 4: 286-93.
- Rath, P.C. et Aggarwal, B.B. (1999). TNF-induced signaling in apoptosis. *J Clin Immunol* 19: 350-64.
- Ravid, S. et Spudich, J.A. (1992). Membrane-bound Dictyostelium myosin heavy chain kinase: a developmentally regulated substrate-specific member of the protein kinase C family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 5877-81.
- Ravid, S. et Spudich, J.A. (1989). Myosin heavy chain kinase from developed Dictyostelium cells. Purification and characterization. *J Biol Chem* 264: 15144-50.
- Redowicz, M.J. (2001). Regulation of nonmuscle myosins by heavy chain phosphorylation. *J Muscle Res Cell Motil* 22: 163-73.
- Reibel, L., Dorseuil, O., Stancou, R., Bertoglio, J. et Gacon, G. (1991). A hemopoietic specific gene encoding a small GTP binding protein is overexpressed during T cell activation. *Biochem Biophys Res Commun* 175: 451-8.
- Rhee, D., Sanger, J.M. et Sanger, J.W. (1994). The premyofibril: evidence for its role in myofibrillogenesis. *Cell Motil Cytoskeleton* 28: 1-24.
- Ridley, A.J. (2006). Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends Cell Biol* 16: 522-9.
- Ridley, A.J. et Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70: 389-99.

- Ridley, A.J., Paterson, H.F., Johnston, C.L., Diekmann, D. et Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 70: 401-10.
- Rieder, C.L. et Salmon, E.D. (1998). The vertebrate cell kinetochore and its roles during mitosis. *Trends Cell Biol* 8: 310-8.
- Riedl, S.J. et Salvesen, G.S. (2007). The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 405-13.
- Rimm, D.L., Koslov, E.R., Kebriaei, P., Cianci, C.D. et Morrow, J.S. (1995). Alpha 1(E)-catenin is an actin-binding and -bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 8813-7.
- Rinehart, J.F. et Farquhar, M.G. (1953). Electron microscopic studies of the anterior pituitary gland. *J Histochem Cytochem* 1: 93-113.
- Robinson, D.N. et Spudich, J.A. (2000). Towards a molecular understanding of cytokinesis. *Trends Cell Biol* 10: 228-37.
- Rochlin, M.W., Itoh, K., Adelstein, R.S. et Bridgman, P.C. (1995). Localization of myosin II A and B isoforms in cultured neurons. *J Cell Sci* 108 (Pt 12): 3661-70.
- Rodriguez-Viciano, P., Warne, P.H., Khwaja, A., Marte, B.M., Pappin, D., Das, P., Waterfield, M.D., Ridley, A. et Downward, J. (1997). Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras. *Cell* 89: 457-67.
- Rodriguez Fernandez, J.L., Geiger, B., Salomon, D. et Ben-Ze'ev, A. (1992). Overexpression of vinculin suppresses cell motility in BALB/c 3T3 cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 22: 127-34.
- Rogat, A.D. et Miller, K.G. (2002). A role for myosin VI in actin dynamics at sites of membrane remodeling during *Drosophila* spermatogenesis. *J Cell Sci* 115: 4855-65.
- Roger, B., Al-Bassam, J., Dehmelt, L., Milligan, R.A. et Halpain, S. (2004). MAP2c, but not tau, binds and bundles F-actin via its microtubule binding domain. *Curr Biol* 14: 363-71.
- Rosenberg, M. et Ravid, S. (2006). Protein kinase Cgamma regulates myosin IIB phosphorylation, cellular localization, and filament assembly. *Mol Biol Cell* 17: 1364-74.
- Rosenfeld, S.S., Xing, J., Chen, L.Q. et Sweeney, H.L. (2003). Myosin Iib is unconventionally conventional. *J Biol Chem* 278: 27449-55.
- Rothe, M., Sarma, V., Dixit, V.M. et Goeddel, D.V. (1995). TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40. *Science* 269: 1424-7.
- Rudel, T. et Bokoch, G.M. (1997). Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science* 276: 1571-4.
- Saez, C.G., Myers, J.C., Shows, T.B. et Leinwand, L.A. (1990). Human nonmuscle myosin heavy chain mRNA: generation of diversity through alternative polyadenylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 1164-8.
- Salhia, B., Hwang, J.H., Smith, C.A., Nakada, M., Rutka, F., Symons, M. et Rutka, J.T. (2008). Role of myosin II activity and the regulation of myosin light chain phosphorylation in astrocytomas. *Cell Motil Cytoskeleton* 65: 12-24.

- Salinas, S., Carazo-Salas, R.E., Proukakis, C., Cooper, J.M., Weston, A.E., Schiavo, G. et Warner, T.T. (2005). Human spastin has multiple microtubule-related functions. *J Neurochem* 95: 1411-20.
- Salinas, S., Carazo-Salas, R.E., Proukakis, C., Schiavo, G. et Warner, T.T. (2007). Spastin and microtubules: Functions in health and disease. *J Neurosci Res* 85: 2778-82.
- Sanders, L.C., Matsumura, F., Bokoch, G.M. et de Lanerolle, P. (1999). Inhibition of myosin light chain kinase by p21-activated kinase. *Science* 283: 2083-5.
- Sanders, M.C., Goldstein, A.L. et Wang, Y.L. (1992). Thymosin beta 4 (Fx peptide) is a potent regulator of actin polymerization in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 4678-82.
- Sandquist, J.C., Swenson, K.I., Demali, K.A., Burrridge, K. et Means, A.R. (2006). Rho kinase differentially regulates phosphorylation of nonmuscle myosin II isoforms A and B during cell rounding and migration. *J Biol Chem* 281: 35873-83.
- Schluter, K., Jockusch, B.M. et Rothkegel, M. (1997). Profilins as regulators of actin dynamics. *Biochim Biophys Acta* 1359: 97-109.
- Schuyler, S.C. et Pellman, D. (2001). Microtubule "plus-end-tracking proteins": The end is just the beginning. *Cell* 105: 421-4.
- Schwartz, M.A. et Shattil, S.J. (2000). Signaling networks linking integrins and rho family GTPases. *Trends Biochem Sci* 25: 388-91.
- Sebbagh, M., Hamelin, J., Bertoglio, J., Solary, E. et Breard, J. (2005). Direct cleavage of ROCK II by granzyme B induces target cell membrane blebbing in a caspase-independent manner. *J Exp Med* 201: 465-71.
- Sebbagh, M., Renvoize, C., Hamelin, J., Riche, N., Bertoglio, J. et Breard, J. (2001). Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat Cell Biol* 3: 346-52.
- Selbach, M. et Backert, S. (2005). Cortactin: an Achilles' heel of the actin cytoskeleton targeted by pathogens. *Trends Microbiol* 13: 181-9.
- Sellers, J.R. (2000). Myosins: a diverse superfamily. *Biochim Biophys Acta* 1496: 3-22.
- Sellers, J.R. (1991). Regulation of cytoplasmic and smooth muscle myosin. *Curr Opin Cell Biol* 3: 98-104.
- Sells, M.A. et Chernoff, J. (1997). Emerging from the Pak: the p21-activated protein kinase family. *Trends Cell Biol* 7: 162-7.
- Sheetz, M.P., Felsenfeld, D.P. et Galbraith, C.G. (1998). Cell migration: regulation of force on extracellular-matrix-integrin complexes. *Trends Cell Biol* 8: 51-4.
- Shewan, A.M., Maddugoda, M., Kraemer, A., Stehbens, S.J., Verma, S., Kovacs, E.M. et Yap, A.S. (2005). Myosin 2 is a key Rho kinase target necessary for the local concentration of E-cadherin at cell-cell contacts. *Mol Biol Cell* 16: 4531-42.
- Shi, Y. (2004). Caspase activation: revisiting the induced proximity model. *Cell* 117: 855-8.

- Shi, Y. (2002). Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* 9: 459-70.
- Shimizu, H., Ito, M., Miyahara, M., Ichikawa, K., Okubo, S., Konishi, T., Naka, M., Tanaka, T., Hirano, K., Hartshorne, D.J. et al. (1994). Characterization of the myosin-binding subunit of smooth muscle myosin phosphatase. *J Biol Chem* 269: 30407-11.
- Shirazi, A., Iizuka, K., Fadden, P., Mosse, C., Somlyo, A.P., Somlyo, A.V. et Haystead, T.A. (1994). Purification and characterization of the mammalian myosin light chain phosphatase holoenzyme. The differential effects of the holoenzyme and its subunits on smooth muscle. *J Biol Chem* 269: 31598-606.
- Simon, J.P., Shen, T.H., Ivanov, I.E., Gravotta, D., Morimoto, T., Adesnik, M. et Sabatini, D.D. (1998). Coatmer, but not P200/myosin II, is required for the in vitro formation of trans-Golgi network-derived vesicles containing the envelope glycoprotein of vesicular stomatitis virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 1073-8.
- Simons, M., Wang, M., McBride, O.W., Kawamoto, S., Yamakawa, K., Gdula, D., Adelstein, R.S. et Weir, L. (1991). Human nonmuscle myosin heavy chains are encoded by two genes located on different chromosomes. *Circ Res* 69: 530-9.
- Singh, V.P. et McNiven, M.A. (2008). Src-mediated cortactin phosphorylation regulates actin localization and injurious blebbing in acinar cells. *Mol Biol Cell* 19: 2339-47.
- Small, J.V. et Kaverina, I. (2003). Microtubules meet substrate adhesions to arrange cell polarity. *Curr Opin Cell Biol* 15: 40-7.
- Smith, L., Chen, L., Reyland, M.E., DeVries, T.A., Talanian, R.V., Omura, S. et Smith, J.B. (2000). Activation of atypical protein kinase C zeta by caspase processing and degradation by the ubiquitin-proteasome system. *J Biol Chem* 275: 40620-7.
- Smith, L., Wang, Z. et Smith, J.B. (2003). Caspase processing activates atypical protein kinase C zeta by relieving autoinhibition and destabilizes the protein. *Biochem J* 375: 663-71.
- Sobieszek, A., Andruchov, O.Y. et Nieznanski, K. (1997). Kinase-related protein (telokin) is phosphorylated by smooth-muscle myosin light-chain kinase and modulates the kinase activity. *Biochem J* 328 (Pt 2): 425-30.
- Soji, T., Mabuchi, Y., Kurono, C. et Herbert, D.C. (1997). Folliculo-stellate cells and intercellular communication within the rat anterior pituitary gland. *Microsc Res Tech* 39: 138-49.
- Song, Y., Hoang, B.Q. et Chang, D.D. (2002). ROCK-II-induced membrane blebbing and chromatin condensation require actin cytoskeleton. *Exp Cell Res* 278: 45-52.
- Sonnenberg, A. et Liem, R.K. (2007). Plakins in development and disease. *Exp Cell Res* 313: 2189-203.
- Steinert, P.M. et Marekov, L.N. (1995). The proteins elafin, filaggrin, keratin intermediate filaments, loricrin, and small proline-rich proteins 1 and 2 are isopeptide cross-linked components of the human epidermal cornified cell envelope. *J Biol Chem* 270: 17702-11.
- Stojilkovic, S.S. (2001). A novel view of the function of pituitary folliculo-stellate cell network. *Trends Endocrinol Metab* 12: 378-80.

- Stow, J.L., Fath, K.R. et Burgess, D.R. (1998). Budding roles for myosin II on the Golgi. *Trends Cell Biol* 8: 138-41.
- Straight, A.F., Cheung, A., Limouze, J., Chen, I., Westwood, N.J., Sellers, J.R. et Mitchison, T.J. (2003). Dissecting temporal and spatial control of cytokinesis with a myosin II inhibitor. *Science* 299: 1743-7.
- Straussman, R., Even, L. et Ravid, S. (2001). Myosin II heavy chain isoforms are phosphorylated in an EGF-dependent manner: involvement of protein kinase C. *J Cell Sci* 114: 3047-57.
- Strelkov, S.V., Herrmann, H. et Aebi, U. (2003). Molecular architecture of intermediate filaments. *Bioessays* 25: 243-51.
- Suarez-Huerta, N., Lecocq, R., Mosselmans, R., Galand, P., Dumont, J.E. et Robaye, B. (2000a). Myosin heavy chain degradation during apoptosis in endothelial cells. *Cell Prolif* 33: 101-14.
- Suarez-Huerta, N., Mosselmans, R., Dumont, J.E. et Robaye, B. (2000b). Actin depolymerization and polymerization are required during apoptosis in endothelial cells. *J Cell Physiol* 184: 239-45.
- Suetsugu, S., Yamazaki, D., Kurisu, S. et Takenawa, T. (2003). Differential roles of WAVE1 and WAVE2 in dorsal and peripheral ruffle formation for fibroblast cell migration. *Dev Cell* 5: 595-609.
- Sun, H.Q., Yamamoto, M., Mejillano, M. et Yin, H.L. (1999). Gelsolin, a multifunctional actin regulatory protein. *J Biol Chem* 274: 33179-82.
- Suzuki, A., Maeda, T. et Ito, T. (1991). Formation of liquid crystalline phase of actin filament solutions and its dependence on filament length as studied by optical birefringence. *Biophys J* 59: 25-30.
- Svitkina, T.M., Verkhovsky, A.B., McQuade, K.M. et Borisy, G.G. (1997). Analysis of the actin-myosin II system in fish epidermal keratocytes: mechanism of cell body translocation. *J Cell Biol* 139: 397-415.
- Tafari, S.R., Rushforth, A.M., Kuczmarski, E.R. et Chisholm, R.L. (1989). Dictyostelium discoideum myosin: isolation and characterization of cDNAs encoding the regulatory light chain. *Mol Cell Biol* 9: 3073-80.
- Takahashi, M., Kawamoto, S. et Adelstein, R.S. (1992). Evidence for inserted sequences in the head region of nonmuscle myosin specific to the nervous system. Cloning of the cDNA encoding the myosin heavy chain-B isoform of vertebrate nonmuscle myosin. *J Biol Chem* 267: 17864-71.
- Tan, J.L., Ravid, S. et Spudich, J.A. (1992). Control of nonmuscle myosins by phosphorylation. *Annu Rev Biochem* 61: 721-59.
- Tapon, N. et Hall, A. (1997). Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 9: 86-92.



- Tartaglia, L.A. et Goeddel, D.V. (1992). Tumor necrosis factor receptor signaling. A dominant negative mutation suppresses the activation of the 55-kDa tumor necrosis factor receptor. *J Biol Chem* 267: 4304-7.
- Tartaglia, L.A., Rothe, M., Hu, Y.F. et Goeddel, D.V. (1993). Tumor necrosis factor's cytotoxic activity is signaled by the p55 TNF receptor. *Cell* 73: 213-6.
- Tassin, A.M. et Bornens, M. (1999). Centrosome structure and microtubule nucleation in animal cells. *Biol Cell* 91: 343-54.
- Terasaki, M., Chen, L.B. et Fujiwara, K. (1986). Microtubules and the endoplasmic reticulum are highly interdependent structures. *J Cell Biol* 103: 1557-68.
- Thoma, B., Grell, M., Pfizenmaier, K. et Scheurich, P. (1990). Identification of a 60-kD tumor necrosis factor (TNF) receptor as the major signal transducing component in TNF responses. *J Exp Med* 172: 1019-23.
- Thornberry, N.A. et Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science* 281: 1312-6.
- Tierney, T., Patel, R., Stead, C.A., Leng, L., Bucala, R. et Buckingham, J.C. (2005). Macrophage migration inhibitory factor is released from pituitary folliculo-stellate-like cells by endotoxin and dexamethasone and attenuates the steroid-induced inhibition of interleukin 6 release. *Endocrinology* 146: 35-43.
- Tilghman, R.W. et Hoover, R.L. (2002). The Src-cortactin pathway is required for clustering of E-selectin and ICAM-1 in endothelial cells. *Faseb J* 16: 1257-9.
- Todarò, G.J. et Green, H. (1963). Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol* 17: 299-313.
- Togel, M., Wiche, G. et Propst, F. (1998). Novel features of the light chain of microtubule-associated protein MAP1B: microtubule stabilization, self interaction, actin filament binding, and regulation by the heavy chain. *J Cell Biol* 143: 695-707.
- Togo, T. et Steinhardt, R.A. (2004). Nonmuscle myosin IIA and IIB have distinct functions in the exocytosis-dependent process of cell membrane repair. *Mol Biol Cell* 15: 688-95.
- Toothaker, L.E., Gonzalez, D.A., Tung, N., Lemons, R.S., Le Beau, M.M., Arnaout, M.A., Clayton, L.K. et Tenen, D.G. (1991). Cellular myosin heavy chain in human leukocytes: isolation of 5' cDNA clones, characterization of the protein, chromosomal localization, and upregulation during myeloid differentiation. *Blood* 78: 1826-33.
- Totsukawa, G., Wu, Y., Sasaki, Y., Hartshorne, D.J., Yamakita, Y., Yamashiro, S. et Matsumura, F. (2004). Distinct roles of MLCK and ROCK in the regulation of membrane protrusions and focal adhesion dynamics during cell migration of fibroblasts. *J Cell Biol* 164: 427-39.
- Totsukawa, G., Yamakita, Y., Yamashiro, S., Hartshorne, D.J., Sasaki, Y. et Matsumura, F. (2000). Distinct roles of ROCK (Rho-kinase) and MLCK in spatial regulation of MLC phosphorylation for assembly of stress fibers and focal adhesions in 3T3 fibroblasts. *J Cell Biol* 150: 797-806.
- Tracey, K.J. et Cerami, A. (1993). Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. *Annu Rev Cell Biol* 9: 317-43.

- Trifaro, J.M., Gasman, S. et Gutierrez, L.M. (2008). Cytoskeletal control of vesicle transport and exocytosis in chromaffin cells. *Acta Physiol (Oxf)* 192: 165-72.
- Tullio, A.N., Accili, D., Ferrans, V.J., Yu, Z.X., Takeda, K., Grinberg, A., Westphal, H., Preston, Y.A. et Adelstein, R.S. (1997). Nonmuscle myosin II-B is required for normal development of the mouse heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 12407-12.
- Turner, C.E. (1998). Paxillin. *Int J Biochem Cell Biol* 30: 955-9.
- Turner, C.E. (2000). Paxillin interactions. *J Cell Sci* 113 Pt 23: 4139-40.
- Unsworth, K.E., Way, M., McNiven, M., Machesky, L. et Holden, D.W. (2004). Analysis of the mechanisms of Salmonella-induced actin assembly during invasion of host cells and intracellular replication. *Cell Microbiol* 6: 1041-55.
- Urano, T., Liu, J., Zhang, P., Fan, Y., Egile, C., Li, R., Mueller, S.C. et Zhan, X. (2001). Activation of Arp2/3 complex-mediated actin polymerization by cortactin. *Nat Cell Biol* 3: 259-66.
- Vale, R.D. et Milligan, R.A. (2000). The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins. *Science* 288: 88-95.
- Vallee, R.B., Williams, J.C., Varma, D. et Barnhart, L.E. (2004). Dynein: An ancient motor protein involved in multiple modes of transport. *J Neurobiol* 58: 189-200.
- Van Aelst, L., Joneson, T. et Bar-Sagi, D. (1996). Identification of a novel Rac1-interacting protein involved in membrane ruffling. *Embo J* 15: 3778-86.
- van der Flier, A. et Sonnenberg, A. (2001). Structural and functional aspects of filamins. *Biochim Biophys Acta* 1538: 99-117.
- van Leeuwen, F.N., van Delft, S., Kain, H.E., van der Kammen, R.A. et Collard, J.G. (1999). Rac regulates phosphorylation of the myosin-II heavy chain, actinomyosin disassembly and cell spreading. *Nat Cell Biol* 1: 242-8.
- Van Nassauw, L., Harrison, F., Cras, P. et Callebaut, M. (1987). Immunohistochemical localization of S-100 protein, glial fibrillary acidic protein, and neuron-specific enolase in the pars distalis of quail, rat, and human hypophyses. *Histochemistry* 86: 353-8.
- Vandenabeele, P., Declercq, W., Beyaert, R. et Fiers, W. (1995). Two tumour necrosis factor receptors: structure and function. *Trends Cell Biol* 5: 392-9.
- Vankelecom, H., Carmeliet, P., Van Damme, J., Billiau, A. et Denef, C. (1989). Production of interleukin-6 by folliculo-stellate cells of the anterior pituitary gland in a histiotypic cell aggregate culture system. *Neuroendocrinology* 49: 102-6.
- Varfolomeev, E., Maecker, H., Sharp, D., Lawrence, D., Renz, M., Vucic, D. et Ashkenazi, A. (2005). Molecular determinants of kinase pathway activation by Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *J Biol Chem* 280: 40599-608.
- Varfolomeev, E.E., Schuchmann, M., Luria, V., Chiannikulchai, N., Beckmann, J.S., Mett, I.L., Rebrikov, D., Brodianski, V.M., Kemper, O.C., Kollet, O., Lapidot, T., Soffer, D., Sobe, T., Avraham, K.B., Goncharov, T., Holtmann, H., Lonai, P. et Wallach, D. (1998). Targeted

- disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity* 9: 267-76.
- Vicente-Manzanares, M., Zareno, J., Whitmore, L., Choi, C.K. et Horwitz, A.F. (2007). Regulation of protrusion, adhesion dynamics, and polarity by myosins IIA and IIB in migrating cells. *J Cell Biol* 176: 573-80.
- Vidal, C., Geny, B., Melle, J., Jandrot-Perrus, M. et Fontenay-Roupie, M. (2002). Cdc42/Rac1-dependent activation of the p21-activated kinase (PAK) regulates human platelet lamellipodia spreading: implication of the cortical-actin binding protein cortactin. *Blood* 100: 4462-9.
- Vidali, L., Chen, F., Cicchetti, G., Ohta, Y. et Kwiatkowski, D.J. (2006). Rac1-null mouse embryonic fibroblasts are motile and respond to platelet-derived growth factor. *Mol Biol Cell* 17: 2377-90.
- Vila-Porcile, E. (1972). [The network of the folliculo-stellate cells and the follicles of the adenohypophysis in the rat (pars distalis)]. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 129: 328-69.
- Vitale, M.L. et Carbajal, M.E. (2004). Involvement of myosin II in dopamine-induced reorganization of the lactotroph cell's actin cytoskeleton. *J Histochem Cytochem* 52: 517-27.
- Vitale, M.L., Cardin, J., Gilula, N.B., Carbajal, M.E. et Pelletier, R.M. (2001). Dynamics of connexin 43 levels and distribution in the mink (*Mustela vison*) anterior pituitary are associated with seasonal changes in anterior pituitary prolactin content. *Biol Reprod* 64: 625-33.
- Waller, B.J. et Alberts, A.S. (2003). The formins: active scaffolds that remodel the cytoskeleton. *Trends Cell Biol* 13: 435-46.
- Wang, H.H., Tanaka, H., Qin, X., Zhao, T., Ye, L.H., Okagaki, T., Katayama, T., Nakamura, A., Ishikawa, R., Thatcher, S.E., Wright, G.L. et Kohama, K. (2008a). Blebbistatin inhibits the chemotaxis of vascular smooth muscle cells by disrupting the myosin II-actin interaction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294: 2060-8.
- Wang, K.K., Posmantur, R., Nadimpalli, R., Nath, R., Mohan, P., Nixon, R.A., Talanian, R.V., Keegan, M., Herzog, L. et Allen, H. (1998). Caspase-mediated fragmentation of calpain inhibitor protein calpastatin during apoptosis. *Arch Biochem Biophys* 356: 187-96.
- Wang, W., Chen, L., Ding, Y., Jin, J. et Liao, K. (2008b). Centrosome separation driven by actin-microfilaments during mitosis is mediated by centrosome-associated tyrosine-phosphorylated cortactin. *J Cell Sci* 121: 1334-43.
- Wang, W., Eddy, R. et Condeelis, J. (2007). The cofilin pathway in breast cancer invasion and metastasis. *Nat Rev Cancer* 7: 429-40.
- Warrick, H.M., De Lozanne, A., Leinwand, L.A. et Spudich, J.A. (1986). Conserved protein domains in a myosin heavy chain gene from *Dictyostelium discoideum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 9433-7.
- Warrick, H.M. et Spudich, J.A. (1987). Myosin structure and function in cell motility. *Annu Rev Cell Biol* 3: 379-421.

- Waterhouse, N.J., Sedelies, K.A., Browne, K.A., Wowk, M.E., Newbold, A., Sutton, V.R., Clarke, C.J., Oliaro, J., Lindemann, R.K., Bird, P.I., Johnstone, R.W. et Trapani, J.A. (2005). A central role for Bid in granzyme B-induced apoptosis. *J Biol Chem* 280: 4476-82.
- Waterman-Storer, C.M., Gregory, J., Parsons, S.F. et Salmon, E.D. (1995). Membrane/microtubule tip attachment complexes (TACs) allow the assembly dynamics of plus ends to push and pull membranes into tubulovesicular networks in interphase *Xenopus* egg extracts. *J Cell Biol* 130: 1161-9.
- Weaver, A.M., Karginov, A.V., Kinley, A.W., Weed, S.A., Li, Y., Parsons, J.T. et Cooper, J.A. (2001). Cortactin promotes and stabilizes Arp2/3-induced actin filament network formation. *Curr Biol* 11: 370-4.
- Weber, K., Plessmann, U. et Ulrich, W. (1989). Cytoplasmic intermediate filament proteins of invertebrates are closer to nuclear lamins than are vertebrate intermediate filament proteins; sequence characterization of two muscle proteins of a nematode. *Embo J* 8: 3221-7.
- Weed, S.A., Du, Y. et Parsons, J.T. (1998). Translocation of cortactin to the cell periphery is mediated by the small GTPase Rac1. *J Cell Sci* 111 (Pt 16): 2433-43.
- Weed, S.A., Karginov, A.V., Schafer, D.A., Weaver, A.M., Kinley, A.W., Cooper, J.A. et Parsons, J.T. (2000). Cortactin localization to sites of actin assembly in lamellipodia requires interactions with F-actin and the Arp2/3 complex. *J Cell Biol* 151: 29-40.
- Weed, S.A. et Parsons, J.T. (2001). Cortactin: coupling membrane dynamics to cortical actin assembly. *Oncogene* 20: 6418-34.
- Wei, Q. et Adelstein, R.S. (2000). Conditional expression of a truncated fragment of nonmuscle myosin II-A alters cell shape but not cytokinesis in HeLa cells. *Mol Biol Cell* 11: 3617-27.
- Weidinger, S., Illig, T., Baurecht, H., Irvine, A.D., Rodriguez, E., Diaz-Lacava, A., Klopp, N., Wagenpfeil, S., Zhao, Y., Liao, H., Lee, S.P., Palmer, C.N., Jenneck, C., Maintz, L., Hagemann, T., Behrendt, H., Ring, J., Nothen, M.M., McLean, W.H. et Novak, N. (2006). Loss-of-function variations within the filaggrin gene predispose for atopic dermatitis with allergic sensitizations. *J Allergy Clin Immunol* 118: 214-9.
- Wells, C.M., Walmsley, M., Ooi, S., Tybulewicz, V. et Ridley, A.J. (2004). Rac1-deficient macrophages exhibit defects in cell spreading and membrane ruffling but not migration. *J Cell Sci* 117: 1259-68.
- Wen, Y., Eng, C.H., Schmoranzler, J., Cabrera-Poch, N., Morris, E.J., Chen, M., Wallar, B.J., Alberts, A.S. et Gundersen, G.G. (2004). EB1 and APC bind to mDia to stabilize microtubules downstream of Rho and promote cell migration. *Nat Cell Biol* 6: 820-30.
- Wessels, D., Soll, D.R., Knecht, D., Loomis, W.F., De Lozanne, A. et Spudich, J. (1988). Cell motility and chemotaxis in *Dictyostelium* amoebae lacking myosin heavy chain. *Dev Biol* 128: 164-77.
- Westermann, S. et Weber, K. (2003). Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 938-47.

- Westwick, J.K., Lambert, Q.T., Clark, G.J., Symons, M., Van Aelst, L., Pestell, R.G. et Der, C.J. (1997). Rac regulation of transformation, gene expression, and actin organization by multiple, PAK-independent pathways. *Mol Cell Biol* *17*: 1324-35.
- Wiche, G. (1998). Role of plectin in cytoskeleton organization and dynamics. *J Cell Sci* *111* ( Pt *17*): 2477-86.
- Wu, H., Reynolds, A.B., Kanner, S.B., Vines, R.R. et Parsons, J.T. (1991). Identification and characterization of a novel cytoskeleton-associated pp60src substrate. *Mol Cell Biol* *11*: 5113-24.
- Wylie, S.R. et Chantler, P.D. (2003). Myosin IIA drives neurite retraction. *Mol Biol Cell* *14*: 4654-66.
- Wylie, S.R. et Chantler, P.D. (2008). Myosin IIC: a third molecular motor driving neuronal dynamics. *Mol Biol Cell* *19*: 3956-68.
- Wylie, S.R. et Chantler, P.D. (2001). Separate but linked functions of conventional myosins modulate adhesion and neurite outgrowth. *Nat Cell Biol* *3*: 88-92.
- Wyllie, A.H., Kerr, J.F. et Currie, A.R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* *68*: 251-306.
- Xu, W., Coll, J.L. et Adamson, E.D. (1998). Rescue of the mutant phenotype by reexpression of full-length vinculin in null F9 cells; effects on cell locomotion by domain deleted vinculin. *J Cell Sci* *111* ( Pt *11*): 1535-44.
- Yarmola, E.G. et Bubb, M.R. (2006). Profilin: emerging concepts and lingering misconceptions. *Trends Biochem Sci* *31*: 197-205.
- Yeh, W.C., Pompa, J.L., McCurrach, M.E., Shu, H.B., Elia, A.J., Shahinian, A., Ng, M., Wakeham, A., Khoo, W., Mitchell, K., El-Deiry, W.S., Lowe, S.W., Goeddel, D.V. et Mak, T.W. (1998). FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. *Science* *279*: 1954-8.
- Yoneda, A., Multhaupt, H.A. et Couchman, J.R. (2005). The Rho kinases I and II regulate different aspects of myosin II activity. *J Cell Biol* *170*: 443-53.
- Yumura, S. et Fukui, Y. (1985). Reversible cyclic AMP-dependent change in distribution of myosin thick filaments in Dictyostelium. *Nature* *314*: 194-6.
- Yumura, S. et Kitanishi-Yumura, T. (1990). Immunoelectron microscopic studies of the ultrastructure of myosin filaments in Dictyostelium discoideum. *Cell Struct Funct* *15*: 343-54.
- Zackroff, R.V. et Goldman, R.D. (1979). In vitro assembly of intermediate filaments from baby hamster kidney (BHK-21) cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *76*: 6226-30.
- Zhao, Z.S. et Manser, E. (2005). PAK and other Rho-associated kinases--effectors with surprisingly diverse mechanisms of regulation. *Biochem J* *386*: 201-14.

- Zheng, G., Solinet, S., Pelletier, R.M. et Vitale, M.L. (2006). Actin cytoskeleton remodelling in the anterior pituitary folliculostellate cell line TtT/GF: participation of the actin-binding protein cortactin. *J Mol Histol* 36: 461-74.
- Zheng, T.S., Schlosser, S.F., Dao, T., Hingorani, R., Crispe, I.N., Boyer, J.L. et Flavell, R.A. (1998). Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 13618-23.
- Ziegler, W.H., Liddington, R.C. et Critchley, D.R. (2006). The structure and regulation of vinculin. *Trends Cell Biol* 16: 453-60.
- Zigmond, S.H. (1996). Signal transduction and actin filament organization. *Curr Opin Cell Biol* 8: 66-73.

## Annexe 1: Publication en second auteur.

### Actin cytoskeleton remodelling in the anterior pituitary folliculostellate cell line TtT/GF: participation of the actin-binding protein cortactin

Guifu Zheng · Sara Solinet · R.-Marc. Pelletier ·  
María Leiza Vitale

Received: 9 July 2005 / Accepted: 17 February 2006 / Published online: 21 April 2006  
© Springer Science+Business Media B.V. 2006

**Abstract** We have previously shown that the folliculostellate (FS) cells of the anterior pituitary change their shape from stellate (type I) to polygonal (type II) coincidentally with variations in the secretory activity of the pituitary. To elucidate the mechanisms involved in this switch in phenotypes, here we studied the impact of serum factors on the morphology of the FS cell line TtT/GF. TtT/GF cells cultured in serum-containing medium displayed elongated shapes and membrane ruffles similarly to type I cells. Serum deprivation caused the loss of plasma membrane activity and the acquisition by the cells of a sedentary phenotype and of a polygonal shape typical of type II FS cells. Addition of serum to the starved cells induced the reappearance of membrane ruffles and lamellipodia. The switch in phenotypes and the maintenance of a motile phenotype depended on tyrosine kinase but not on Erk activity. Because the transition between phenotypes involved the tyrosine kinase-dependent reorganization of cortical actin filaments, we studied the participation of the actin-binding protein, cortactin, a tyrosine kinase substrate. Cortactin and its tyrosine-phosphorylated form, pY421-cortactin, localized to membrane ruffles and lamellipodia in serum-cultured TtT/GF cells, while they were evenly distributed over the whole cell cortex in serum-starved cells. Serum treatment of starved cells induced a transient increase in pY421-cortactin levels and the clustering of pY421-cortactin in membrane regions where protrusions were developing. Both serum responses were blocked by a tyrosine kinase inhibitor. Together, the results indicate that the transition from a polygonal to an elongated shape

entails the acquisition of a dynamic cortical actin cytoskeleton that involves the tyrosine kinase-dependent phosphorylation of cortactin and the translocation of cortical pY421-cortactin to sites of ruffle formation at the plasma membrane.

**Keywords** Folliculostellate cells · Actin · Cortactin · Tyrosine phosphorylation · Cell morphology

#### Introduction

The folliculostellate (FS) cells located among the endocrine cells of the anterior pituitary are agranular, non-endocrine cells involved in the paracrine control of anterior pituitary endocrine and immunological responses (Vila-Porcile 1972; Allaerts and Vankelecom 2005). Our principal aim is to study the relationship between the morphology and the physiology of the FS cells. Here we evaluated the role of the actin cytoskeleton in the morphological changes we had previously observed in the folliculostellate (FS) cells of the anterior pituitary (Cardin et al. 2000). The FS cells have been described as star shaped cells with cytoplasmic processes extending between other anterior pituitary cells (Soji and Herbert 1989; Inoue et al. 1999; Stojilkovic 2002). However, we and others have shown the presence of at least two morphologically distinct types of FS cells (Kagayama 1965; Orgnero de Gaisán et al. 1993; Cardin et al. 2000). The type I refers to stellate shaped cells with cytoplasmic processes surrounding adjacent cells. In the type II, the cells are rounded or polygonal showing no evidence of cytoplasmic projections. This distinctive morphology may represent different physiological states of the same cell. Our observation that the proportion between these two FS cell types depended

---

G. Zheng · S. Solinet · R.-M. Pelletier · M. L. Vitale (✉)  
Department of Pathology and Cell Biology, Faculty of Medicine,  
Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada  
e-mail: maria.leiza.vitale@umontreal.ca

on the physiological status of the anterior pituitary is in support of this view (Cardin et al. 2000).

Because cells are sensitive to the environment, they modify their shape to accommodate to different situations. The actin cytoskeleton is known to be the main determinant of shape changes in cells. Hence, the actin cytoskeleton of FS cells may be the target of environmental factors that command the alteration of FS cells' morphology we observed "in vivo". The organization of the actin cytoskeleton is regulated by a set of actin-binding proteins. Considering that the morphological changes observed in FS cells principally involve the appearance/disappearance of cell membrane projections, we focussed our studies on the participation of cortactin in the FS cell shape changes. Cortactin is an 80 kDa actin-binding protein that modulates cortical actin filament organization. It was first characterized as a Src kinase substrate (Wu et al. 1991, 1993) and later, as a substrate of other tyrosine kinases also modulated by serum factors (Weed et al. 1998; Gallet et al. 1999. Fan et al. 2004) and of serine/threonine kinases such as the extracellular signal-regulated kinases (Erk) and the p21-activated kinase (PAK) (Campbell et al. 1999; Vidal et al. 2002; Martinez-Quiles et al. 2004). Cortactin possess a multidomain structure that allows its interaction with several cytoskeleton regulatory proteins such as the Arp2/3 complex (Weed et al. 2000; Uruno et al. 2001), ZO-1 (Katsube et al. 1998), the large GTPase dynamin2 (McNiven et al. 2000), WASP (Martinez-Quiles et al. 2004; Kowalski et al. 2005), the N-WASP-interacting protein WIP (Kinley et al. 2003) and the RhoGAP BPGAP1a (Lua and Low 2004). Cell stimulation with growth factors causes cortactin relocation from the cytoplasm to membrane ruffles and lamellipodia (Maa et al. 1992; Wu and Parsons 1993; Weed et al. 2001). All these features make cortactin a good candidate for coupling extracellular signals with the rearrangement of the cortical actin network induced by serum factors.

Here, we analysed the FS cell shape changes induced by serum factors in the FS cell line TtT/GF. The TtT/GF cells were obtained from an anterior pituitary tumour (Inoue et al. 1992). These cells possess the morphological and biochemical features of normal FS cells (Inoue et al. 1999; Matsumoto et al. 1993; Jin et al. 2001) and, for this reason, they have been widely used as an experimental model to study FS cells' responses to the changes in the cell environment. We found that the TtT/GF cell morphology was dramatically affected by serum factors, and that the morphological responses observed closely resembled the transition from type I to type II FS cells. This transition implicated the reorganization of the actin cytoskeleton. Moreover, the tyrosine kinase-dependent migration of cortical cortactin to the active actin polymerizing sites near

the plasma membrane was involved in this reorganization process.

## Materials and methods

### Cell culture

The FS cell line TtT/GF was generously provided by Dr. U. Rennel (Max-Planck Institute, Munich, Germany). TtT/GF cells were initially isolated from a murine thyrotropic pituitary tumour (Inoue et al. 1992). TtT/GF cells were cultured in DMEM supplemented with 5% fetal calf serum for 48 h in at 37°C in a 95% air-5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Following this period, the cells were further incubated either in the presence (S+) or absence (S-) of serum for 48h and submitted to different treatments according to the corresponding protocol.

### Source of antibodies and chemicals

Mouse monoclonal anti-cortactin (Clone 4F11), was purchased from Upstate (Lake Placid, NY, USA). Rabbit polyclonal anti-actin, FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG, TRITC-conjugated goat anti-rabbit IgG, DABCO and genistein were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada) Rabbit polyclonal anti-phosphotyrosine-cortactin [pY421] that only recognizes cortactin phosphorylated in tyrosine 421 (Head et al. 2003; Fan et al. 2004), is commercially available from BioSource (Camarillo, CA, USA). Horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-mouse IgG (H+L), horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (H+L), FITC-conjugated donkey anti-mouse IgG (H+L), TRITC-conjugated donkey anti-mouse IgG (H+L), were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc (Mississauga, ON, Canada). Rhodamine-phalloidin was purchased from Molecular Probes (Eugene, OR, USA). Potassium Bisperoxo (1, 10-phenanthroline) oxovanadate (V) [bpV (phen)] and the Erk inhibitor U0126 were purchased from Calbiochem (San Diego, California, USA). The chemiluminescence developer Lumilight was from Roche, Laval, Québec, Canada.

### Subcellular fractionation

TtT/GF cells were rinsed with cold PBS (137 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4). Next, lysis buffer (50 mM TRIS-HCl, pH 7.4, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 2 µg/ml leupeptin, 2 µg/ml aprotinin, 4 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 80 mM NaF, 20 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> and 10 µM bpV (phen)) was added to the dishes and cells were scraped off and homogenized. Homogenates



were centrifuged at 600 rpm (Beckman GS-6R, Beckman Canada, Mississauga, ON, Canada) for 4 min. The pellet P1 was discarded and the supernatant S1 was centrifuged at 15,000×g for 25 min (Beckman microfuge E, Beckman Canada, Mississauga, ON, Canada). The supernatant S2 corresponded to the cytosol-enriched fraction. The pellet P2 was rinsed with lysis buffer containing 1% Triton X-100, to remove the cytoskeleton, and spun down at 15,000×g for 25 min. The supernatant S3 corresponded to the membrane-enriched fraction and the pellet P3 was discarded. To prepare cytoskeleton and non-cytoskeleton fractions, cell cultures were rinsed with cold PBS, next incubated with PBS containing 1% Triton X-100, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM EGTA, 600 mM KCl, 1 mM PMSF, 2 µg/ml leupeptin, 2 µg/ml aprotinin, 4 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 80 mM NaF, 20 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> and 10 µM bpV (phen)). Following incubation, the cells were scraped off and homogenized. Homogenates were centrifuged at 15,000×g for 25 min (Beckman microfuge E). The pellet was considered the cytoskeleton-enriched fraction and the supernatant the non-cytoskeleton-enriched fraction. The cytoskeleton fractions were dissolved in 1.5 volumes of Ripa lysis buffer (150 mM NaCl, 1.0% NP-40, 0.5% DOC, 0.1% SDS, 50 mM Tris, pH 8.0). Proteins in the samples were measured by the Bradford dye binding assay (Bradford 1976). The membrane-enriched fraction contained plasma membrane (scavenger receptor B type I (SR-BI), epidermal growth factor receptor (EGFR)), endoplasmic reticulum (calnexin), Golgi (TGN38), and lysosome (Lamp-1) proteins, yet the cytosolic enzyme hormone sensitive lipase (HSL) was absent. On the other hand, the cytosolic enriched fraction contained HSL and trace amounts of calnexin, TGN38, lamp-1 and EGFR, but no SR-BI. The cytoskeleton fraction was enriched in cytoskeletal proteins such as myosin light chain,  $\alpha$ -tubulin and glial fibrillary acidic protein, these proteins were absent in the non-cytoskeleton fraction.

#### Immunoblotting

The total cell homogenates and subcellular fractions were homogenized and aliquots containing 5–10 µg proteins were loaded onto 12% polyacrylamide gels. Proteins were separated by SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes. Membranes were quickly stained with Ponceau red to ensure equal loading and tested for the presence of different proteins with specific antibodies diluted in PBS containing 5% skim milk: anti-actin (1/500 dilution), anti-cortactin (1/1500 dilution), anti-pY421-cortactin, (1/1000 dilution). The corresponding secondary antibodies were coupled to horseradish peroxidase. Antigen-antibody complexes were detected by enhanced

chemiluminescence. The immoreactive bands on the films were scanned and the quantification of the intensity of the bands was performed by using a Scion Image program (Scion Corporation, MD, USA).

#### Fluorescence microscopy

TtT/GF cells were plated on glass coverslips and incubated under different conditions. After treatments, TtT/GF cells were rinsed and immediately fixed with 3.7% formaldehyde, permeabilized with acetone and processed for fluorescence microscopy as previously described (Cardin et al. 2000). Briefly, coverslips were thoroughly rinsed with PBS and incubated for 1 h at room temperature with 3% non-fat milk in PBS to block unspecific labelling. Antibody dilutions were prepared in 1% non-fat milk in PBS. Cells were incubated with the following first antibodies: anti-cortactin (1/80) and anti-pY421-cortactin (1/100) for 1 h at 37 °C. Next, they were incubated with secondary antibodies labelled with FITC or TRITC. Actin filaments were labelled with (1:800) rhodamine-phalloidin. Coverslips were mounted in PBS: glycerol (1:1) containing 5% 1,4 diazabiscyclo (2,2,2) octane (DABCO). Cells were observed with a Zeiss Axioskop 2 fluorescence microscope.

#### Statistics

Data were evaluated by the Student's *t* test.

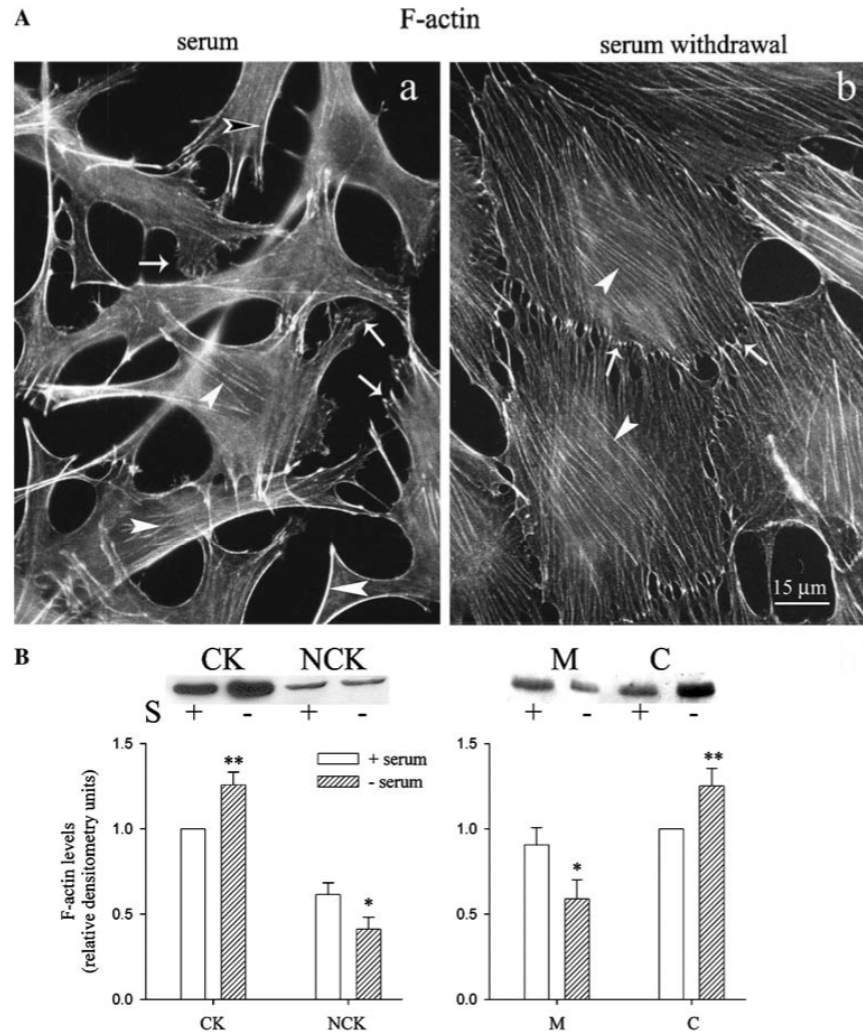
#### Results

The TtT/GF cells cultured in serum-containing medium possessed an elongated shape (Fig. 1A, a). Lamellipodia, pseudopodia and membrane ruffles were abundant indicating that the cells were motile (Fig. 1A, a, arrows). The actin cytoskeleton of the serum-cultured cells was associated with the subplasmalemmal region (Fig. 1A, a, open arrowheads). Thin actin stress fibres were present in the cytoplasm (Fig. 1A, a, arrowheads). Serum starvation for 48 h caused TtT/GF cells to acquire a sedentary phenotype. The cells flattened, retracted their pseudopodia and membrane protrusions but increased cell-to-cell contacts (Fig. 1A, b, arrows). Serum-starved cells possessed cytoplasmic stress fibres packed in parallel arrays (Fig. 1A, b, arrowheads). Total actin expression was not affected by serum removal. However, immunoblots of subcellular fractions revealed that serum withdrawal caused a significant increase in actin association with the cytoskeleton-enriched fraction (Fig. 1B, CK). Conversely, serum withdrawal significantly decreased actin association with the membrane-enriched fraction, but increased actin

association with the cytosol-enriched fraction (Fig. 1B, M/C). Therefore, serum starvation of TtT/GF cells resulted in cytoplasmic actin stress fibres formation and cortical actin filaments disassembly.

Serum growth factors are known to act, in most cases, via tyrosine phosphorylation of specific substrates. To investi-

gate tyrosine phosphorylation involvement in the actin cytoskeleton remodelling by serum factors, TtT/GF cells were treated with the tyrosine kinase inhibitor genistein. Cells were incubated 30 min, 1, 2, 4 and 8 h with 30  $\mu$ M genistein, and processed for fluorescence microscopy to assess changes in cell morphology and actin cytoskeleton.

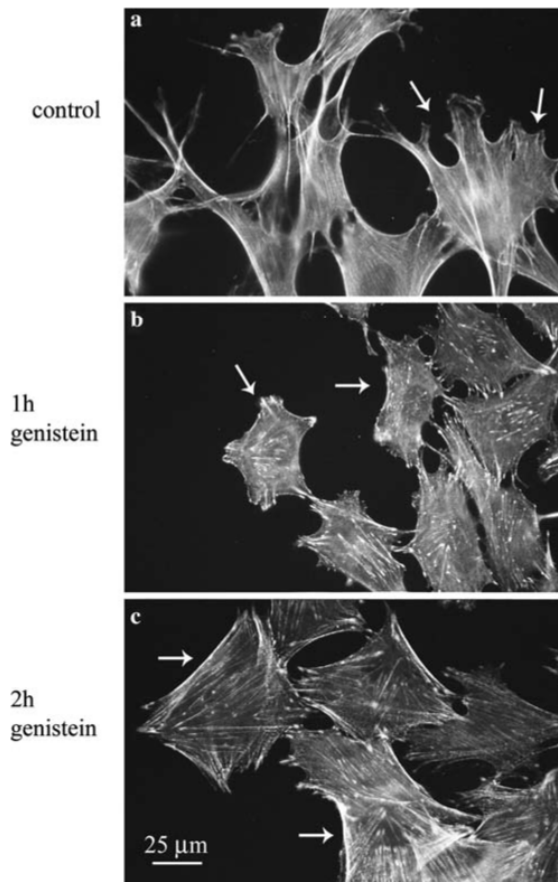


**Fig. 1** Effect of serum withdrawal on the TtT/GF cells' morphology and organization of the actin cytoskeleton. **A** TtT/GF cells cultured in either serum-containing (a) or serum-free media (b) for 48 h were labelled with rhodamine-phalloidin to describe the distribution of the actin cytoskeleton. Cells incubated in the presence of serum (a) had an elongated shape, pseudopodia and lamellipodia (arrows). Thin actin filaments were apparent in the cytoplasm (arrowheads) and the subplasmalemma (open arrowheads). Cells incubated in the absence of serum (b) flattened and showed a polygonal shape with few membrane projections but numerous cell-to-cell contacts (arrows). The actin cytoskeleton of serum-starved cells was organized in parallel fibres (arrowheads). **B** TtT/GF cells incubated in either serum-

containing (+) or serum-free (-) media were scraped off and cytoskeleton (CK)/non-cytoskeleton (NCK) and membrane (M)/cytosol (C) enriched fractions were prepared and subjected to immunoblotting with actin antibodies. A representative immunoblot shows the 43 kDa actin-immunoreactive band. The bands were scanned and their intensities measured using a computer program. For each experiment the intensities were normalized using the CK (+) and the C(+) values as 1. Data shown are the mean  $\pm$  SEM of at least four independent experiments. \*\* $P < 0.03$ , CK (+) versus CK (-) and C(+) versus C(-); \* $P < 0.05$ , NCK (+) versus NCK (-) and M(+) versus M(-)

Genistein treatment longer than 1 h affected TtT/GF morphology (Fig. 2). Genistein-treated cells showed fewer membrane ruffles and pseudopodia, resembling serum-starved cells (Fig. 2).

To further analyse the impact of tyrosine phosphorylation in serum-regulated TtT/GF cell morphology, the cells were serum deprived for 48 h and challenged with serum (5% final concentration) from 30 min to 24 h with or without genistein. Addition of serum to the medium bathing the starved cells for at least 1–2 h triggered formation of membrane ruffles (Fig. 3, serum 2 h, arrowheads). The membrane protrusions developed into pseudopodia and lamellipodia with time (Fig. 3, serum 4 h, arrowheads), indicating that serum addition caused TtT/GF cells to



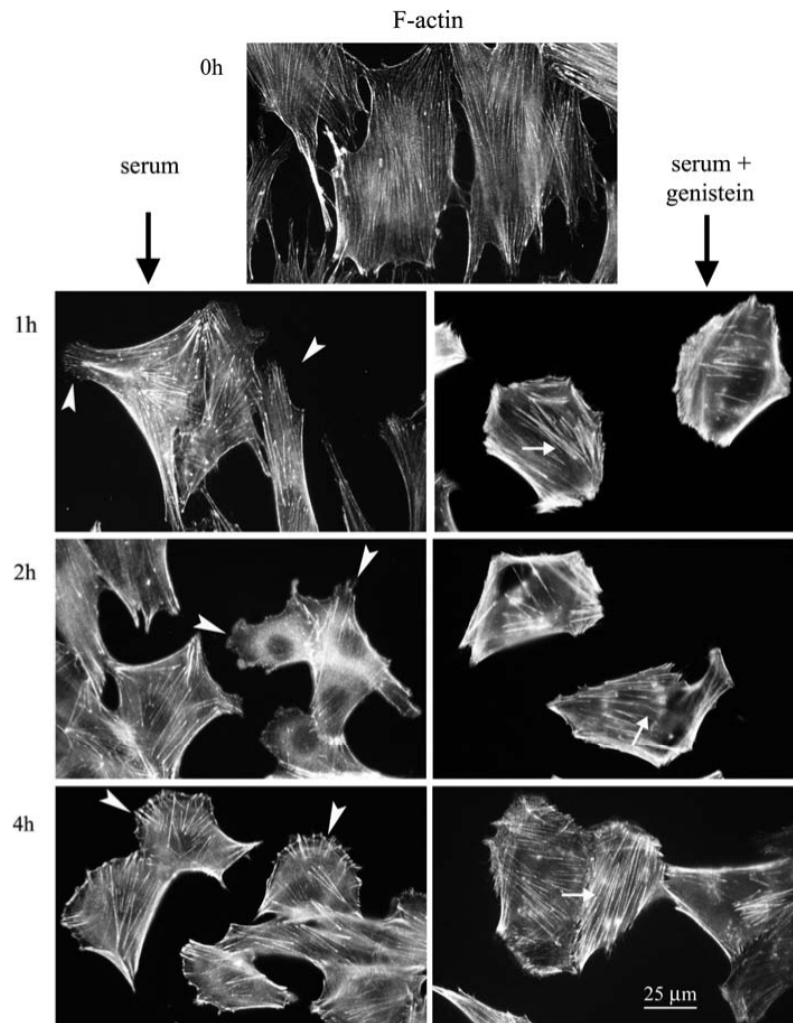
**Fig. 2** Effect of the tyrosine inhibitor genistein on TtT/GF cells' actin cytoskeleton. TtT/GF cells cultured in the presence of 5% serum were treated with 30  $\mu$ M genistein for increasing periods of time and next processed for fluorescence microscopy with rhodamine-phalloidin to visualize the actin filaments. Non treated cells (a) depicted pseudopodia, membrane projections (arrows) and thin cytoplasmic actin fibres (open arrowheads). Genistein treatment for at least 1 h (b) caused the retraction of membrane projections (arrows) and the formation of thicker cytoplasmic actin fibres (open arrowheads)

switch from sedentary to motile phenotype. Concomitantly, addition of serum induced a reduction of cytoplasmic actin fibres length (Fig. 3, serum). Addition of serum in the presence of genistein did not result in the formation of membrane ruffles (Fig. 3, serum+genistein). Moreover, the cytoplasmic actin fibres remained in stacks of parallel arrays (Fig. 3, serum+genistein, arrows).

It has been shown that, in addition to tyrosine kinase activity, serum-induced morphological changes are dependent on Erk activity in several cell types. We tested whether inhibition of Erk affected serum-induced formation of membrane ruffles and pseudopodia in TtT/GF cells. Serum-starved cells were incubated with or without 20  $\mu$ M U0126 for 30 min to 24 h, and processed for fluorescence microscopy with rhodamine-phalloidin. Inhibition of Erk activity did not affect the serum-induced membrane ruffles, although, U0126-treated cell pseudopodia were thinner compared to those from untreated cells (data not shown).

The results indicate that serum-induced recovery of actin-membrane structures in TtT/GF cells was dependent on tyrosine kinase activity. Several actin-binding proteins are a substrate of tyrosine kinases, among them,  $\alpha$ -actinin, vinculin, paxillin and cortactin. In pilot experiments, we observed that the proteins that showed the most striking distribution changes upon serum withdrawal were  $\alpha$ -actinin and cortactin. However, due to the important reorganization of cortical actin and the assembly/disassembly of membrane ruffles and pseudopodia, we focussed the present study on the participation of cortactin to the serum-induced morphological response of TtT/GF cells. Cortactin localized to cell membrane ruffles and lamellipodia in TtT/GF cells incubated with serum (Fig. 4A, a, arrowheads). In addition, cortactin displayed a punctate cytoplasmic staining in the perinuclear region (Fig. 4A, a, black arrow). In serum-starved cells, cortactin did not disappear from the cell cortex, instead, it exhibited a plasma membrane labelling (Fig. 4A, b, arrowhead) particularly intense in cell-to-cell contacts (Fig. 4A, b, arrow). Cortactin punctate intracellular labelling was intense in serum-starved TtT/GF cells (Fig. 4A, b, black arrow), and, occasionally, it followed cytoplasmic actin fibres (Fig. 4A, b, open arrowhead). Western blot analyses of subcellular fractions obtained from cells cultured either in presence or absence of serum for 48 h showed an 80–85 kDa cortactin-immunoreactive band in all subcellular fractions (Fig. 4B). The presence or absence of serum did not affect cortactin association with either the cytoskeleton/non-cytoskeleton or the membrane/cytosol fractions (Fig. 4B).

Cortactin is a tyrosine phosphorylated protein. We found that inhibition of tyrosine kinase activity with genistein blocked serum-induced membrane ruffle formation in TtT/GF cells. Therefore, we investigated whether serum



**Fig. 3** Effect of serum on the morphology and organization of the actin cytoskeleton of serum-starved TtT/GF cells. Effect of the tyrosine kinase inhibitor genistein. TtT/GF cells cultured in a serum-free medium were challenged with serum (5% final concentration) in the absence or presence of the tyrosine kinase inhibitor genistein (30  $\mu$ M final concentration) for increasing periods of time. The cells were labelled with rhodamine-phalloidin to identify the changes in the organization of the actin cytoskeleton. Addition of serum in the

absence of genistein caused the recovery of the mobile phenotype characterized by the presence of membrane projections, pseudopodia and lamellipodia (arrowheads). In addition the cytoplasmic actin fibres, typical of the serum-starved cells, began to loose the parallel organization. The presence of genistein blocked the effect of the serum. Genistein, serum-treated cells did not show signs of mobility and the actin filaments in the cytoplasm remained parallel (arrows)

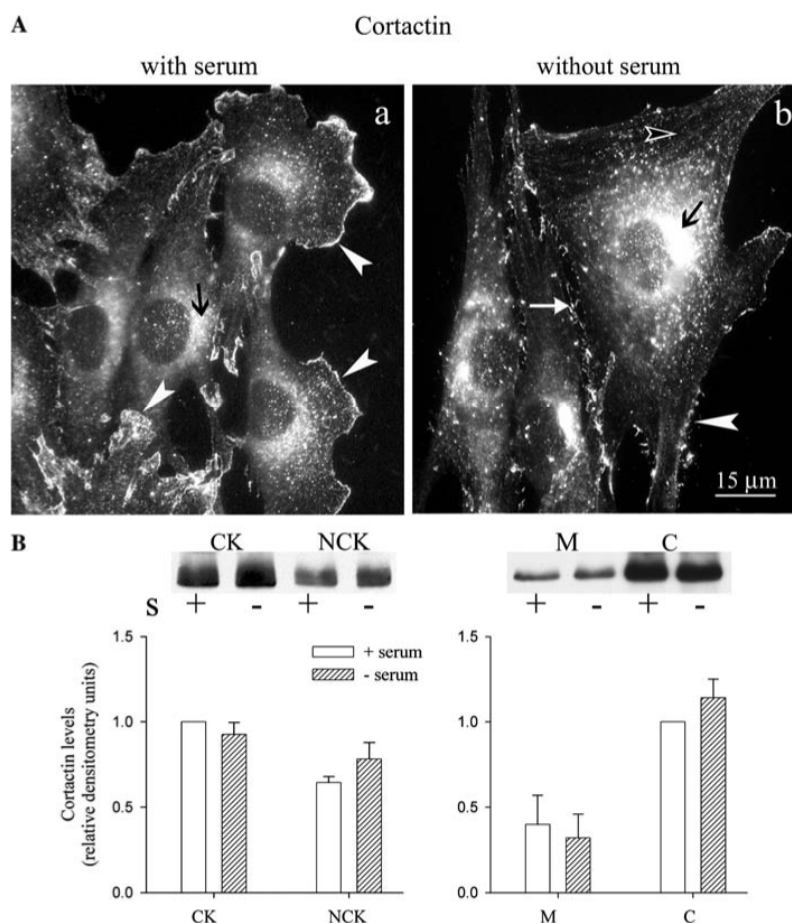
affected the tyrosine phosphorylation status of cortactin and/or the association of tyrosine-phosphorylated cortactin with the cell membrane. For that purpose, we used an antibody that only recognizes the tyrosine-phosphorylated form of cortactin (pY421-cortactin) and we compared the behaviour of pY421-cortactin and cortactin following serum withdrawal. Immunofluorescence studies showed that pY421-cortactin was associated mainly with cell membrane ruffles and lamellipodia where it co-localized with

cortactin in serum-cultured cells (Fig. 5A, +S, arrows). In addition, a weak and punctate pY421-cortactin labelling in the cytoplasm was apparent (Fig. 5A, +S). pY421-cortactin staining was significant at the plasma membrane of serum-starved cells (Fig. 5A, -S, arrow), particularly at the site of cell-to-cell contacts where it co-localized with cortactin (Fig. 5A, -S, arrowheads). Western blots analyses demonstrated that the absence of serum affected neither the levels nor the association of pY421-cortactin with the

cytoskeleton/non-cytoskeleton or membrane/cytosol fractions (Fig. 5B).

To identify the potential link between cortactin tyrosine phosphorylation and serum-induced actin reorganization in TtT/GF cells, the cells were serum-starved for 48 h and treated with serum (5%, final concentration) for 1–8 h, either in absence or presence of genistein. The cells were scraped off, homogenized and subjected to immunoblotting with actin, cortactin and pY421-cortactin antibodies (Fig. 6). Figure 6 shows that serum addition did not affect

total actin or cortactin content. Moreover, cortactin amounts recovered in the cytoskeleton, non-cytoskeleton, membrane and cytosol fractions were not affected by addition of serum (data not shown), although pY421-cortactin levels were transiently increased (Fig. 6, pY421-cortactin, 1–4 h). Pre-stimulation levels were recovered by 8 h (Fig. 6). Shorter incubations of the cells with serum for 5 and 15 min did not affect pY421-cortactin levels. Genistein blocked the initial (1–2 h) serum-induced increase of pY421-cortactin levels (Fig. 6). However, in

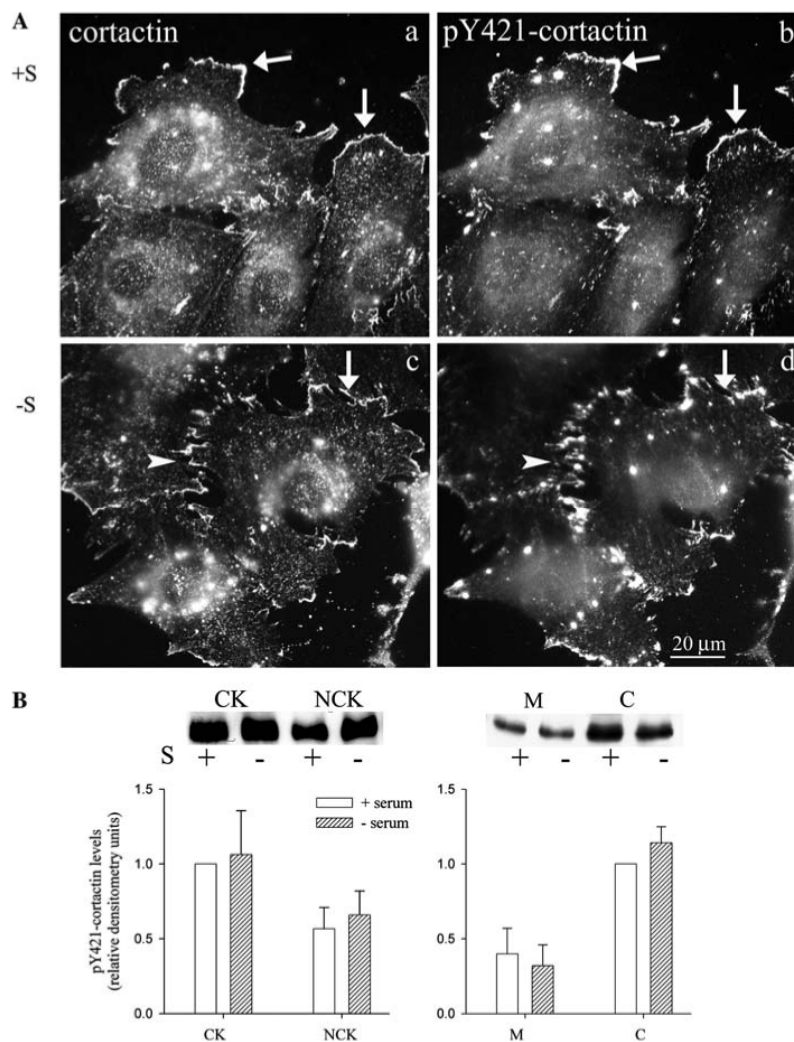


**Fig. 4** Effect of serum on the cellular distribution of the actin-binding protein cortactin. The TtT/GF cells were cultured in either serum-containing (a) or serum-free media (b). The cells were either processed for immunofluorescence with cortactin antibodies **A** or scraped off and processed for subcellular fractionation and immunoblotting with cortactin antibodies **B**. **A(a)** The micrograph shows cortactin associated pseudopodia and lamellipodia (arrowheads) in serum-cultured cells and a punctate cytoplasmic labelling concentrated in the perinuclear area (black arrow). **(b)** Cortactin labelling in serum starved cells was present over the whole plasma membrane (arrowhead) and was particularly associated with cell-to-

cell contacts regions of the membrane (arrow). Cortactin intracellular labelling appears as dots concentrated in the perinuclear region of the cells (black arrow). **B** Cytoskeleton (CK)/non-cytoskeleton (NCK) and membrane (M)/cytosol (C) enriched fractions were prepared and subjected to immunoblotting with cortactin antibodies. A representative immunoblotting shows an 80–85 kDa immunoreactive band. The immunoreactive bands were scanned and their intensities were measured using a computer program. For each experiment the intensities were normalized using the CK(+) and the C(+) values as 1. Data shown are the mean  $\pm$  SEM of five independent experiments

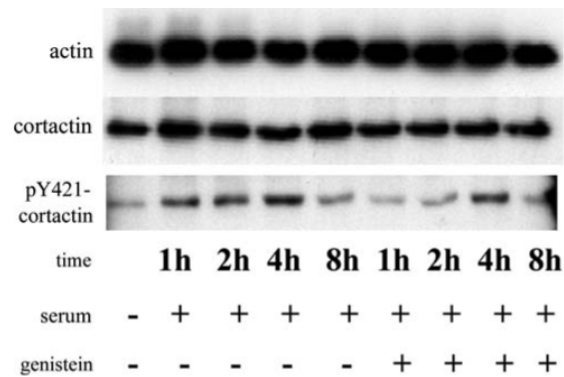
spite of the presence of genistein, pY421-cortactin levels increased by 4 h and decreased thereafter (Fig. 6, pY421-cortactin). Figure 7 shows that the increase of pY421-cortactin took place in all subcellular fractions although with a different time course. In the non-cytoskeleton, membrane and cytosol fractions pY421-cortactin levels

were significantly high by 1 h following serum addition (Fig. 7), whereas the increase in the cytoskeleton fraction was significant only 2 h after serum challenge (Fig. 7). In all cases, the increases were transient. The initial raise in cortactin tyrosine phosphorylation levels in all subcellular fractions was blocked by genistein (Fig. 7).



**Fig. 5** Effect of serum on the cellular distribution of pY421-cortactin. TfT/GF cells were cultured in either serum-containing (+S) or serum-free media (-S). The cells were either double labelled with cortactin and pY421-cortactin antibodies **A** or scraped off and processed for subcellular fractionation and immunoblotting with cortactin and pY421-cortactin antibodies **B**. **A** The micrographs show cortactin (a) and pY421-cortactin (b) localization in pseudopodia and lamellipodia (arrows) in serum-cultured cells. pY421-cortactin intracellular labelling was weaker than cortactin intracellular labelling. In serum starved cells, cortactin (c) and pY421-cortactin (d)

labelled the plasma membrane (arrows) particularly cell-to-cell contacts regions of the membrane (arrowheads). **B** Cytoskeleton (CK)/non-cytoskeleton (NCK) and membrane (M)/cytosol (C) enriched fractions were prepared and subjected to immunoblotting with p-cortactin antibodies. A representative immunoblotting shows an 85–90 kDa immunoreactive band. The immunoreactive bands were scanned and their intensities were measured using a computer program. For each experiment the intensities were normalized using the CK(+) and the C(+) values as 1. Data shown are the mean  $\pm$  SEM of five independent experiments



**Fig. 6** Actin, cortactin and p-Y421-cortactin levels following serum treatment of serum-starved cells. Effect of the tyrosine kinase inhibitor genistein. TtT/GF cells were serum starved for 48 h and next incubated in culture media containing 5% serum in the absence (-) or in the presence (+) of 30  $\mu$ M genistein for 0, 1, 2, 4 and 8 h. The cells were next scraped off and homogenized. Five micrograms of total cell proteins were subjected to electrophoresis and immunoblotting with actin, cortactin and pY421-cortactin antibodies. The figure shows a representative immunoblotting of four independent experiments. Serum addition did not affect total actin and cortactin levels. However, serum treatment transiently increased pY421-cortactin levels and this increase was abolished by genistein

We investigated next whether the serum-induced reorganization of the cortical actin cytoskeleton to form membrane ruffles and lamellipodia involved redistribution of peripheral cortactin and pY421-cortactin to different membrane structures. TtT/GF cells cultured in absence of serum were challenged with serum for increasing periods of time and doubled labelled for cortactin and pY421-cortactin. Addition of serum to the starved cells was followed by the redistribution of cortactin and pY421-cortactin from the entire plasma membrane in starved cells to membrane ruffles in serum-treated cells (Fig. 8). The presence of the tyrosine kinase inhibitor genistein significantly reduced the serum-induced formation of pseudopodia and lamellipodia (Fig. 9). Short and thin membrane projections were present instead at the cell membrane (Fig. 9). In serum+genistein-treated TtT/GF cells, cortactin and pY421-cortactin labelling still localized to the plasma membrane, where they co-localized (Fig. 9). Addition of serum to serum-deprived cells in the presence of the Erk inhibitor U0126 did not affect serum-induced redistribution of cortactin or pY421-cortactin (not shown).

## Discussion

We reported that FS cells cultured with serum become elongated with membrane projections similar to the “in situ” type I FS cells (Cardin et al. 2000). Here, we show that cells from the FS cell line TtT/GF cultured in the

presence of serum are also elongated with membrane projections. Serum-deprived TtT/GF cells lose most membrane ruffles and acquired a polygonal shape resembling the “in situ” type II FS cells. Therefore, because the morphology of the serum-cultured TtT/GF cells was comparable to that of type I FS cells and since the serum-deprived TtT/GF cells possessed a morphology similar to type II FS cells, we used the TtT/GF cell line as a model to study the effect of the extracellular milieu on the switch from type I to type II FS cells.

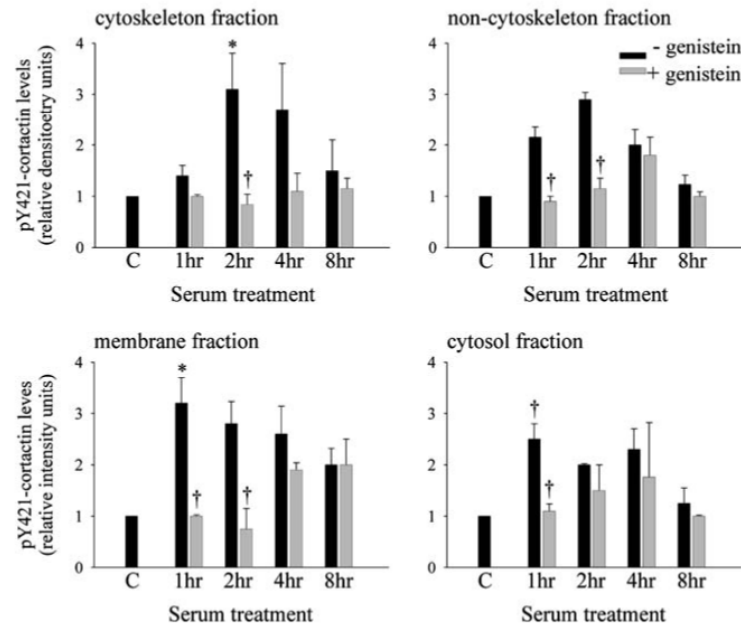
The elongated shape of serum cultured TtT/GF cells was concomitant with morphological features typical of a motile phenotype: membrane ruffles and lamellipodia. Conversely, cells cultured in the absence of serum for 48 h acquired a sedentary phenotype, characterized by rare membrane ruffles. The reorganization of the actin cytoskeleton is the basis of serum-induced modulation of the cell morphology (He et al. 1998). Our results agree with this notion by showing that the serum withdrawal-induced transition from motile to sedentary phenotype in TtT/GF cells was accompanied the disassembly of cortical actin structures and by the assembly of cytoplasmic actin filaments. Moreover, within an hour following addition of serum back to the medium, this process was reversed, the active cortical actin-based structures reappeared and rare and thin actin cables assembled in the cytoplasm. The dynamics of this actin cytoskeleton reorganization in TtT/GF cells was mainly dependent on tyrosine kinase activity not on Erk activity.

The transition of the actin cytoskeleton in TtT/GF cells from actin stress fibres to a highly organized and dynamic cortical cytoskeleton must require the participation of actin-binding proteins that regulate membrane ruffles formation and their regulation by tyrosine kinases. We focussed our studies on cortactin, an actin-binding protein that fulfils these two prerequisites. Cortactin is involved in membrane ruffle formation (Kinley et al. 2003; Weed et al. 2000) and at the same time is a target of serum-modulated tyrosine kinases (Wu et al. 1991; Wu and Parsons 1993; Weed et al. 1998; Gallet et al. 1999; Kapus et al. 1999; Fan et al. 2004). In serum cultured TtT/GF as well as in other cells, cortactin labelling was associated with lamellipodia and membrane projections, and with perinuclear area, where the spotty cytoplasmic labelling has been recently shown to be associated with the Golgi apparatus (Cao et al. 2005). Significantly, cortactin labelling did not disappear from the cell cortex but remained associated with it forming a thin peripheral rim in our serum-deprived TtT/GF cells. This result agrees with the reported even localization of cortactin at the cortex in quiescent fibroblasts (Liu et al. 1999; McNiven et al. 2000). Addition of serum to the starved cells induced a re-association of cortical cortactin with the newly formed membrane ruffles and lamellipodia

suggesting that serum factors regulate the localization of membrane-associated cortactin molecules to distinct actin-based cortical structures in TtT/GF cells.

Cortactin is a substrate for tyrosine kinases (Lua and Low 2005), however, the influence of tyrosine phosphorylation on the activity and membrane association of this actin-binding protein is still a matter of debate. Tyrosine phosphorylation of cortactin has been shown to have either no influence (Wu and Parsons 1993) or to diminish cortactin bundling activity (Huang et al. 1997; Di Ciano et al. 2002; Martinez-Quiles et al. 2004). Cortactin tyrosine phosphorylation has been related to either the enhancement (Huang et al. 1998; Head et al. 2003) or the inhibition of cell migration (Landriscina et al. 2000). Here, we observed that the serum-induced cortical cortactin redistribution from the entire plasma membrane to selected developing membrane ruffles and lamellipodia was dependent on tyrosine kinase not on Erk activity. To provide insights on a potential correlation between tyrosine phosphorylation state and distribution of cortactin, and membrane ruffle

formation in TtT/GF cells, we used an antibody that specifically recognizes cortactin phosphorylated at tyrosine 421 (pY421-cortactin) (Head et al. 2003). Cortactin tyrosine phosphorylation levels in general, and pY421-cortactin levels in particular, were reported to be low in quiescent fibroblasts but to increase following growth factor treatment (LaVallée et al. 1998; Landriscina et al. 2000; Head et al. 2003). Unexpectedly, we observed similar pY421-cortactin levels in serum-cultured and in serum-starved TtT/GF cells. We found that serum did induce an increase of pY421-cortactin levels, even though this effect was transient. This observation may explain why pY421-cortactin levels were similar in serum-cultured and serum-starved cells. In addition, serum did not increase pY421-cortactin amounts in any particular subcellular fraction. The difference between serum-starved and serum-cultured TtT/GF cells resided in the distribution of cortical pY421-cortactin. pY421-cortactin was enriched in membrane ruffles and lamellipodia in serum-cultured TtT/GF cells, confirming findings reported in fibroblasts (Head



**Fig. 7** p-Y421-cortactin levels in different subcellular fractions following serum treatment of serum-starved TtT/GF cells. Effect of the tyrosine kinase inhibitor genistein. TtT/GF cells were serum starved for 48 h and next incubated in culture media containing 5% serum either in the absence or in the presence of 30  $\mu$ M genistein for 0 (C), 1, 2, 4 and 8 h. The cells were scraped off, and the cytoskeleton/non-cytoskeleton and membrane/cytosol subcellular fractions were prepared as described in Materials and methods. Ten micrograms of proteins from each fraction were subjected to electrophoresis and immunoblotting using pY421-cortactin antibodies. The immunoreactive bands were scanned and their intensities

were measured using a computer program. For each experiment the intensities were normalized using the intensity of the  $t=0$  h (C) band value as 1. Data shown are the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. Serum treatment transiently increased pY421-cortactin levels in all subcellular fractions, this increase was abolished by genistein. \* $P < 0.05$  cytoskeleton fraction: C versus 2 h serum; non-cytoskeleton and membrane fraction: C versus 1 h serum. † $P < 0.01$  cytoskeleton fraction: 2 h versus 2 h serum+genistein; non-cytoskeleton and membrane fractions: 1 and 2 h serum versus 1 and 2 h serum+genistein; cytosol fraction: C versus 1 h serum and 1 h serum versus 1 h+genistein

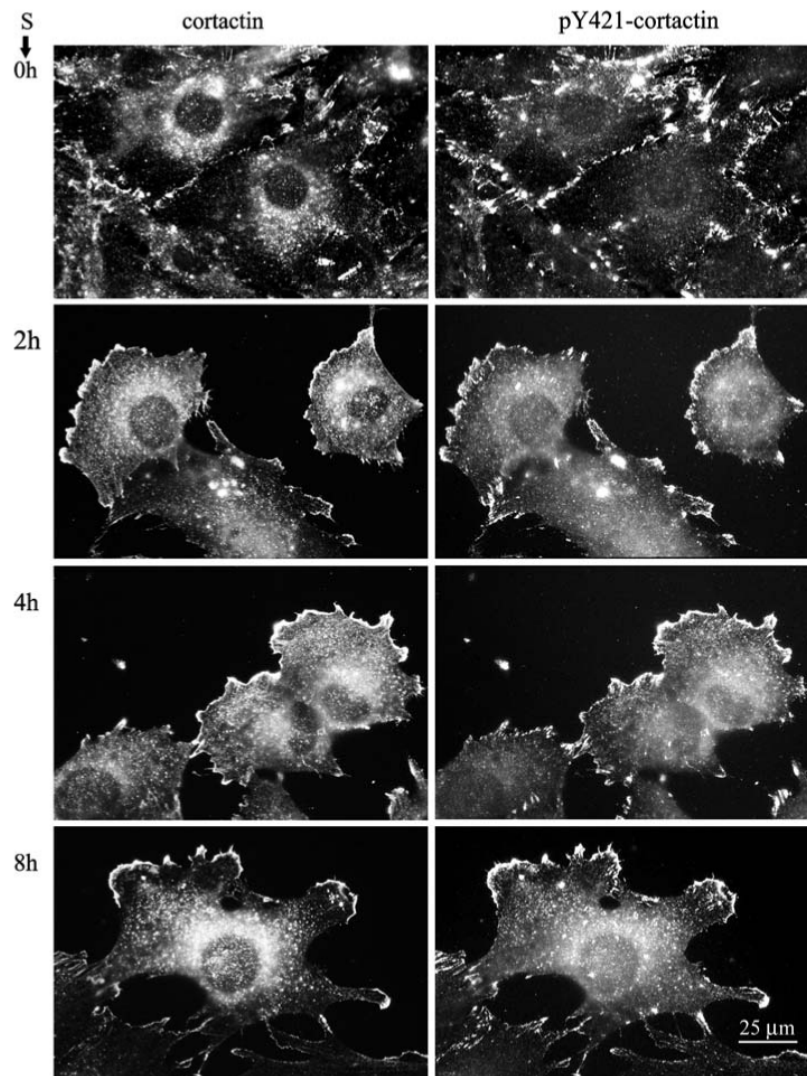


et al. 2003). However, cortical pY421-cortactin did not disappear from the cell cortex, but instead, it was dispersed over the entire subplasmalemmal region in serum-deprived TtT/GF cells and was recruited to membrane ruffles in response to serum challenge. These results are compatible with a reported role of cortactin tyrosine phosphorylation in membrane ruffle and lamellipodium formation, thus, with cell motility (LaVallée et al. 1998; Huang et al. 1998; Head et al. 2003). However, the observation that considerable pY421-cortactin amounts remained associated with the cell membrane in absence of serum, strongly suggest that tyrosine phosphorylation of cortactin in itself is not incompatible with a sedentary phenotype. The observation of high levels of tyrosine-phosphorylated cortactin in

sedentary fibroblast agree with this view (Landriscina et al. 2000). Thus, our present findings that tyrosine phosphorylation affects peripheral cortactin distribution may indicate that both the tyrosine-phosphorylated cortactin distribution and levels in the cell cortex influence the formation of distinctive actin-based structures in response to the activity of the cell.

Our results show that inhibition of tyrosine kinase activity impaired the initial serum-induced tyrosine phosphorylation of cortactin and the migration of cortical pY421-cortactin to distinctive sites in the cell cortex, suggesting that the displacement of the already tyrosine-phosphorylated cortactin was dependent on the activity of tyrosine kinases. Nevertheless, our results do not allow to

**Fig. 8** Cellular distribution of cortactin and pY421-cortactin during serum-induced switch from the sedentary to the mobile phenotype. TtT/GF cells cultured in serum-free media were challenged with serum (5% final concentration) for 0–8 h. Following treatment, the cells were double labelled with cortactin and pY421-cortactin antibodies. Following addition of serum to the culture medium, membrane structures associated with cell mobility began to form. These membrane structures were cortactin and pY421-cortactin immunopositive

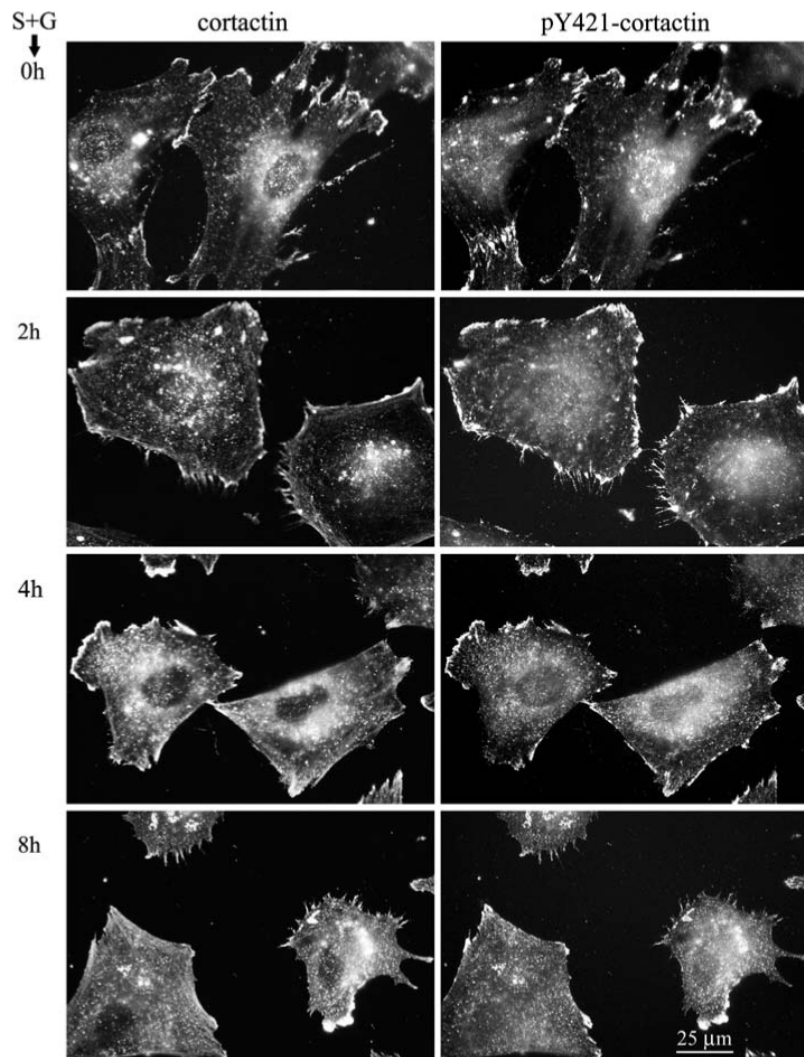


determine whether the inhibition of tyrosine kinase activity blocks activation of cortical zones to hinder cortactin recruitment at these sites, or vice versa, whether blockage of cortactin mobilization inhibits the activation of cortical regions where actin polymerization will take place.

In the present study, pY421-cortactin and cortactin co-localized at the sites of membrane protrusions and lamellipodia in serum-cultured TtT/GF and they remained co-localized at the membrane following serum starvation. Cortactin and pY421-cortactin localization to active membrane areas in motile and spreading cells likely reflects the generally agreed role of cortactin in cortical actin polymerization to generate membrane projections (Weed et al. 2000; Suetsugu et al. 2002). However, why

did the protein and its tyrosine-phosphorylated form remain associated with the cell cortex in sedentary TtT/GF cells where few membrane ruffles and lamellipodia were present, is a thorny question. The disappearance of membrane activity in the sedentary TtT/GF cells could cause the release of cortactin from its partners which, in turn, would result in cortactin dispersion. Nevertheless, this does not explain why the cortactin released from these molecules would remain associated with the periphery of sedentary cells. The association of cortactin and Y421-cortactin with the cell cortex in sedentary cells might be due to the involvement of the protein in new membrane-based structures exclusive to sedentary cells. Under serum starvation conditions, TtT/GF cells are immobile or at least less

**Fig. 9** Effect of the tyrosine kinase inhibitor genistein in the cellular distribution of cortactin and pY421-cortactin during serum-induced switch from the sedentary to the mobile phenotype. TtT/GF cells cultured in serum-free media were challenged with serum (5% final concentration) in the presence of 30  $\mu$ M genistein (final concentration) for 0–8 h. Following treatment, the cells were double labelled with cortactin and pY421-cortactin antibodies. In the presence of genistein the addition of serum was unable to induce the appearance of pseudopodia or lamellipodia. Instead, thin filopodia developed. pY421-cortactin and cortactin labelling was still associated with the plasma membrane



mobile but still able to interact with each other. In epithelial cells, cortactin co-localizes with the adhering- and tight junction-associated protein ZO-1 (Katsube et al. 2004) and with the adhering junction integral protein E-cadherin (Helwani et al. 2004). Moreover, cortactin regulates tight junction and adhering junction turnover in epithelia (Ivanov et al. 2004). It is more difficult for cell-to-cell interactions to develop in fibroblast-like cells, likely because these cells tend to be isolated and to interact with the extracellular matrix rather than with other cells. Nevertheless, we found that although TtT/GF cells express the gap junction protein connexin 43, there is very little expression of tight and adherens junction proteins (Fortin et al. 2006). During serum starvation, TtT/GF cells acquired a polygonal shape and they are closer to one another. This forced proximity under serum starvation conditions may cause recruitment of cortactin to regions of intercellular contacts for interactions. The report that cortactin spatially co-localizes to and is directly associated with nascent N-cadherin adhesion complexes in fibroblasts (El Sayegh et al. 2004) add support of this view. Moreover, the observation by the same authors that cortactin tyrosine phosphorylation is required to strength the N-cadherin adhesion complex, but not for cortactin interaction with the complex (El Sayegh et al. 2004), could explain why pY421-cortactin associates with areas of cell-to-cell interaction in serum-starved TtT/GF cells. Together, the results suggest that if cell migration and spreading is blocked or restricted, cell-to-cell interactions can develop in fibroblast-like cells and cortactin may be part of a mechanism of cell-to-cell junction formation.

In conclusion, we have shown that the serum-induced transition from a polygonal (type II) to an elongated FS cell with cytoplasmic processes (type I) implicates the remodelling of the actin cytoskeleton from stable cytoplasmic actin fibres to a dynamic cortical actin cytoskeleton. This process involves recruitment of membranous pY421-cortactin to the sites of ruffle formation in the plasma membrane. The recruitment of cortactin to these sites is sensitive to tyrosine kinase activity.

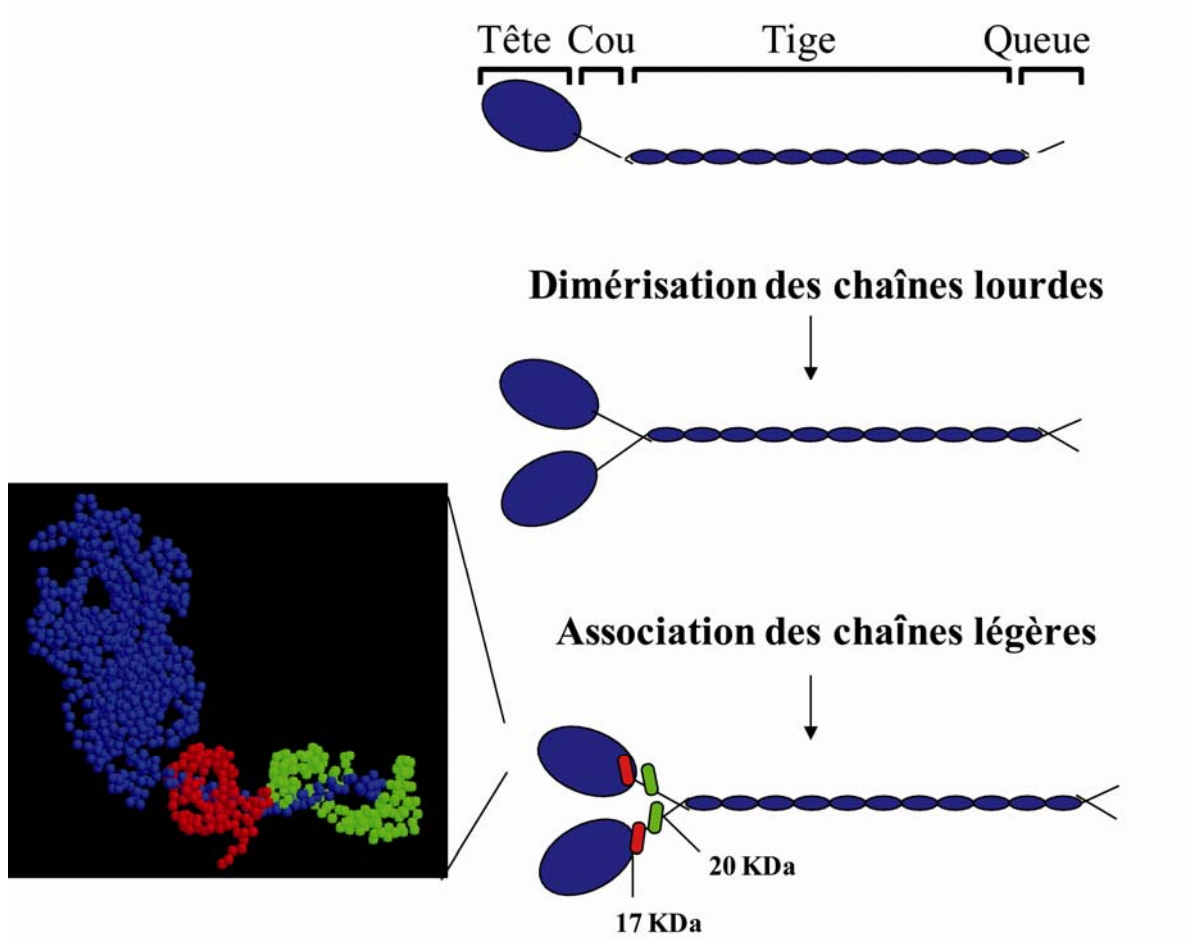
**Acknowledgements** We are grateful to Dr. U. Rennel from the Max-Planck Institute, Munich, Germany for the gift of the TtT/GF cells. This work was funded by the Natural Science and Engineering Research Council of Canada to MLV. MLV is supported by a scholarship from Fonds de la recherche en santé du Québec.

## References

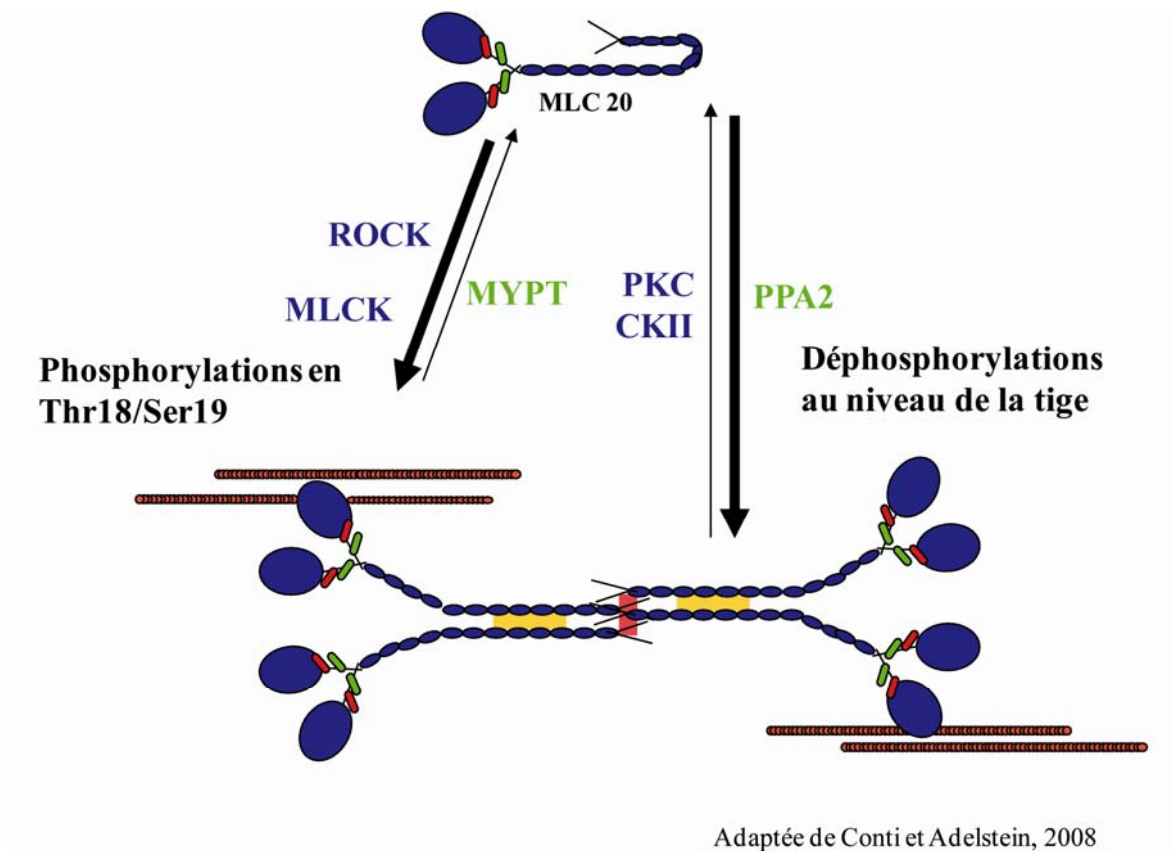
- Allaerts W, Vankelecom H (2005) History and perspectives of pituitary folliculo-stellate cell research. *Eur J Endocrinol* 153:1–12
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Campbell DH, Sutherland RL, Daly RJ (1999) Signaling pathways and structural domains required for phosphorylation of EMS1/cortactin. *Cancer Res* 59:5376–5385
- Cao H, Weller S, Orth JD, Chen J, Huang B, Chen J-L, Starnes M, McNiven MA (2005) Actin and Arp1-dependent recruitment of cortactin–dynamin complex to the Golgi regulates post-Golgi transport. *Nature Cell Biol* 7:483–496
- Cardin J, Carbajal ME, Vitale ML (2000) Biochemical and morphological diversity amongst folliculo-stellate cells of the mink (*Mustela vison*) anterior pituitary. *Gen Comp Endocrinol* 120:75–87
- Di Ciano C, Nie Z, Szászi K, Lewis A, Uruno T, Zhan X, Rotstein OD, Mak A, Kapus A (2002) Osmotic stress-induced remodelling of the cortical cytoskeleton. *Am J Physiol Cell Physiol* 288:C850–C865
- El Sayegh TY, Arora PD, Laschinger CA, Lee W, Morrison C, Overall C, Kapus A, McCulloch C (2004) Cortactin associates with N-cadherin adhesions and mediates intercellular adhesion strengthening in fibroblasts. *J Cell Sci* 117:5117–5131
- Fan L, Di Ciano-Oliveira C, Weed SA, Craig AWB, Greer PA, Rotstein OD, Kapus A (2004) Actin depolymerization-induced tyrosine phosphorylation of cortactin: the role of Fer kinase. *Biochem J* 380:581–591
- Fortin M-E, Pelletier R-M, Meilleur M-A, Vitale ML (2006) Modulation of GJA1 turnover and intercellular communication by pro-inflammatory cytokines in the anterior pituitary folliculo-stellate cell line TtT/GF. *Biol Reprod* 74:2–12
- Gallet C, Rosa J-P, Habib A, Lebrete M, Lévy-Tolédano S, Maclouf J (1999) Tyrosine phosphorylation of cortactin associated with Syk accompanies thromboxane analogue-induced platelet shape change. *J Biol Chem* 274:23610–23616
- He H, Watanabe T, Zhan X, Huang C, Schuurung E, Fukami K, Takenawa T, Kumar CC, Simpson RJ, Maruta H (1998) Role of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in Ras/Rac-induced disruption of the cortactin–actomyosin II complex and malignant transformation. *Mol Cell Biol* 18:3829–3837
- Head JA, Jiang D, Li M, Zorn LJ, Schaeffer EM, Parsons JT, Weed SA (2003) Cortactin tyrosine phosphorylation requires Rac1 activity and association with the cortical actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell* 14:3216–3229
- Helwani FM, Kovacs EM, Paterson AD, Verma S, Ali RG, Fanning AS, Weed SA, Yap AS (2004) Cortactin is necessary for E-cadherin-mediated contact formation and actin reorganization. *J Cell Biol* 164:899–910
- Huang C, Hepler JR, Chen LT, Gilman AG, Anderson RGW, Mumby SM (1997) Organization of G proteins and adenylyl cyclase at the plasma membrane. *Mol Biol Cell* 8:2365–2378
- Huang C, Liu J, Haudenschild CC, Zhan X (1998) The role of tyrosine phosphorylation of cortactin in the locomotion of endothelial cells. *J Biol Chem* 273:25770–25776
- Inoue K, Matsumoto H, Koyama C, Shibata K (1992) Establishment of a folliculo-stellate like cell line from a murine thyrotropic pituitary tumor. *Endocrinology* 131:3110–3116
- Inoue K, Couch EF, Takano K, Ogawa S (1999) The structure and function of folliculo-stellate cells in the anterior pituitary gland. *Arch Histol Cytol* 62:205–218
- Ivanov AI, McCall IC, Parkos CA, Nusrat A (2004) Role for actin filament turnover and myosin II motor in cytoskeleton-driven disassembly of the epithelial apical junctional complex. *Mol Biol Cell* 15:2639–2651
- Jin L, Tsumanuma I, Ruebel KH, Bayliss JM, Lloyd RV (2001) Analysis of homogeneous populations of anterior pituitary folliculostellate cells by laser capture microdissection and reverse transcription-polymerase chain reaction. *Endocrinology* 142:1703–1709

- Kagayama M (1965) The follicular cell in the *pars distalis* of the dog pituitary gland: an electron microscopy study. *Endocrinology* 77:1053–1060
- Kapus A, Szászi K, Sun J, Rizoli S, Rotstein OD (1999) Cell shrinkage regulates Src kinases and induces tyrosine phosphorylation of cortactin, independent of the osmotic regulation of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers. *J Biol Chem* 274:8093–8102
- Katsube T, Takahisa M, Ueda R, Hashimoto N, Kobayashi M, Togashi S (1998) Cortactin associates with the cell–cell junction protein ZO-1 in both *Drosophila* and mouse. *J Biol Chem* 273:29672–29677
- Katsube T, Togashi S, Hashimoto N, Ogiu T, Tsuji H (2004) Filamentous actin binding ability of cortactin isoforms is responsible for their cell–cell junctional localization in epithelial cells. *Arch Biochem Biophys* 427:79–90
- Kinley AW, Weed SA, Waever AM, Karginov AV, Bissonete E, Cooper JA, Parsons JT (2003) Cortactin interacts with WIP in regulating Arp2/3 activation and membrane protrusion. *Curr Biol* 13:384–393
- Kowalski JR, Egile C, Gil S, Snapper SB, Li R, Thomas SM (2005) Cortactin regulates cell migration through activation of N-WASP. *J Cell Sci* 118:79–87
- Landriscina M, Prudovsky I, Mouta Carreira C, Soldi R, Tarantini F, Maciag T (2000) Amlexanox reversible inhibits cell migration and proliferation and induces the Src-dependent disassembly of actin stress fibers *in vitro*. *J Biol Chem* 275:32753–32762
- LaVallée TM, Prudovsky IA, McMahon GA, Hu X, Maciag T (1998) Activation of the MAP kinase pathway by FGF-1 correlates with cell proliferation induction while activation of the Src pathway correlates with migration. *J Cell Biol* 141:1647–1658
- Liu J, Huang C, Zhan X (1999) Src is required for cell migration and shape changes induced by fibroblast growth factor-1. *Oncogene* 18:6700–6706
- Lua BL, Low BC (2004) BPGAP1 interacts with cortactin and facilitates its translocation to cell periphery for enhanced cell migration. *Mol Biol Cell* 15:2873–2883
- Lua BL, Low BC (2005) Cortactin phosphorylation as a switch for actin cytoskeleton network and cell dynamics control. *FEBS Lett* 579:577–585
- Maa MC, Wilson IK, Moyers JS, Vines RR, Parsons JT, Parsons SJ (1992) Identification and characterisation of a cytoskeletal-associated, epidermal growth factor sensitive pp60src substrate. *Oncogene* 7:2429–2438
- Martinez-Quiles N, Ho H-YH, Kirschner MW, Ramesh N, Geha RS (2004) Erk/Src phosphorylation of cortactin acts as a switch on-switch off mechanism that controls its ability to activate N-WASP. *Mol Cell Biochem* 24:5269–5280
- Matsumoto H, Koyama C, Sawada T, Koike K, Hirota K, Miyake A, Arimura A, Inoue K (1993) Pituitary folliculo-stellate-like cell line (TtT/GF) responds to novel hypophysiotropic peptide (pituitary adenylate cyclase-activating peptide), showing increased adenosine 3', 5'-monophosphate and interleukin-6 secretion and cell proliferation. *Endocrinology* 133:2150–2155
- McNiven MA, Kim L, Krueger EW, Orth JD, Cao H, Wong TW (2000) Regulated interactions between dynamin and the actin-binding protein cortactin modulate cell shape. *J Cell Biol* 151:187–198
- Orniero de Gaisán E, Maldonado CA, Aoki A (1993) Fate of degenerating lactotrophs in rat pituitary gland after interruption of lactation: a histochemical and immunocytochemical study. *Histochem J* 25:150–165
- Soji T, Herbert DC (1989) Intercellular communication between rat anterior pituitary cells. *Anat Rec* 224:523–533
- Stojilkovic SS (2002) A novel view of the function of pituitary folliculo-stellate cell network. *Trends Endocrinol Metabol* 12:378–380
- Suetsugu S, Miki H, Takenawa T (2002) Spatial and temporal regulation of actin polymerization for cytoskeleton formation through Arp2/3 complex and WASP/WAVE proteins. *Cell Motil Cytoskel* 51:113–122
- Uruno T, Liu J, Zhang P, Fan Y, Eglie C, Li R, Mueller SC, Zhan X (2001) Activation of Arp2/3 complex-mediated actin polymerization by cortactin. *Nature Cell Biol* 3:259–266
- Vidal C, Geny B, Jandrot-Perrus M, Fontenay-Roupie M (2002) CcdC42/Rac1-dependent activation of the p21-activated kinase (PAK) regulates human platelet lamellipodia spreading: implication of the cortical-actin binding protein cortactin. *Blood* 100:4462–4469
- Vila-Porcile E (1972) Le réseau des cellules folliculo-stellaires et les follicules de l'adénohypophyse du rat (Pars distalis). *Z Zellforsch* 129:328–369
- Weed SA, Du Y, Parsons JT (1998) Translocation of cortactin to the cell periphery is mediated by the small GTPase Rac1. *J Cell Sci* 111:2433–2443
- Weed SA, Karginov AV, Schafer DA, Weaver AM, Kinley AW, Cooper JA, Parsons JT (2000) Cortactin localization to sites of actin assembly in lamellipodia requires interaction with F-actin and the Arp2/3 complex. *J Cell Biol* 151:29–40
- Weed SA, Parsons JT (2001) Cortactin: coupling membrane dynamics to cortical actin assembly. *Oncogene* 20:6418–6434
- Wu H, Parsons JT (1993) Cortactin, an 80/85-kilodalton pp60src substrate, is a filamentous actin-binding protein enriched in the cell cortex. *J Cell Biol* 120:1417–1426
- Wu H, Reynolds AB, Kanner SB, Vines RR, Parsons JT (1991) Identification and characterization of a novel cytoskeleton-associated pp60src substrate. *Mol Cell Biochem* 11:5113–5124

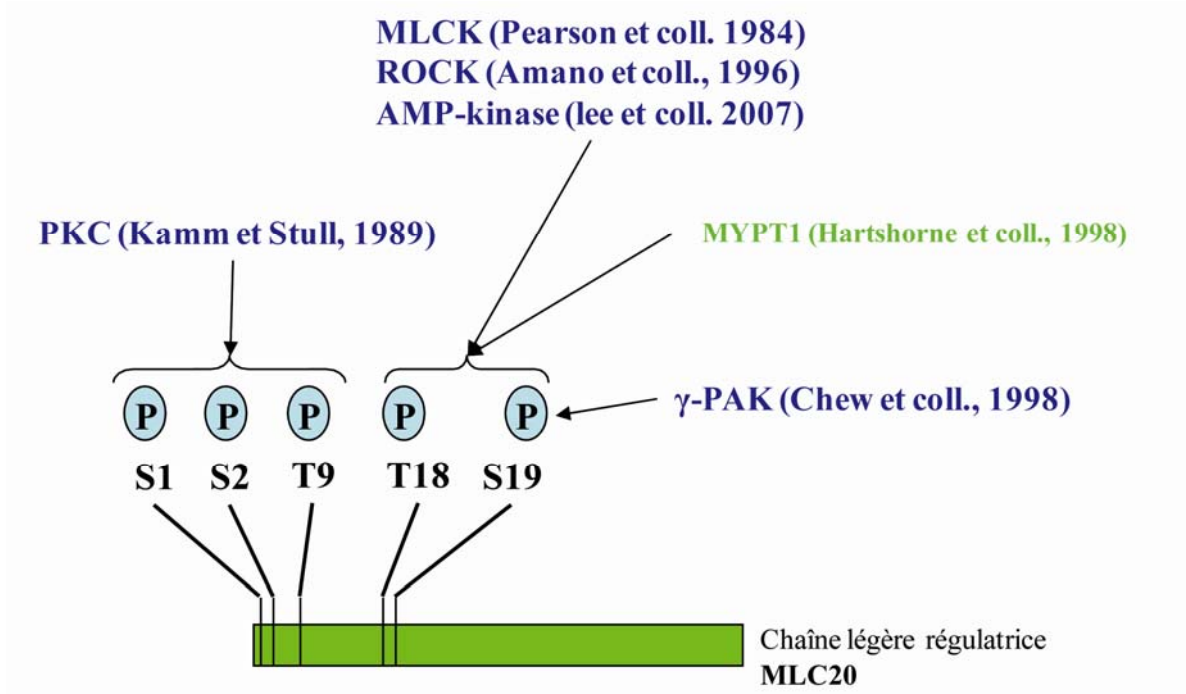
Annexe 2 : Structure de la myosine non-musculaire de type II



Annexe 3 : La régulation de l'activité de la myosine II via la phosphorylation des chaînes légères régulatrices et des chaînes lourdes.



**Annexe 4 : Les différentes kinases et la phosphatase des chaînes légères régulatrices MLC20**



**Annexe 5 : Les différentes kinases et la phosphatase des isoformes de chaînes lourdes A et B**

**Kinases**

PKC (kawamoto et coll., 1989)

PAK (Even-Faitelson et coll., 2005)

Caséine Kinase II (Kuznicki et Filipek, 1988)

CaM Kinase (Kelley et Adelstein, 1990)

Cdc-2 (Moussavi et coll., 1993)

Cycline-p34cdc2 Kinase (Kelley et coll., 1993)

**Phosphatase PPA2**

