

Université de Montréal

**Voies kinases-dépendantes et bouillonnement membranaire
dans l'apoptose**

Par

Delphine Désy

Programme de biologie moléculaire

Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en biologie moléculaire

Août 2001

© Delphine Désy, 2001



QH

506

U54

2002

v.003

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Voies kinases-dépendantes et bouillonnement membranaire
dans l'apoptose**

Présenté par :

Delphine Désy

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

1. Richard Bertrand, Ph.D. _____

2. Rhian Touyz, Ph.D. _____

3. Trang Hoang, Ph.D. _____

Mémoire accepté le : _____

SOMMAIRE

La phase d'exécution de l'apoptose est caractérisée par l'apparition de modifications morphologiques et biochimiques incluant la contraction cellulaire, la condensation de la chromatine et l'apparition de modifications dynamiques au niveau de la membrane plasmique de type protrusions et rétractions que l'on nomme le bouillonnement membranaire. Les mécanismes qui soutiennent le bouillonnement membranaire sont encore mal définis. Il a été proposé que des forces contractiles soient à l'origine de la formation des boursoflures membranaires et des corps apoptotiques. Les interactions entre les filaments d'actine et de myosine semblent être à l'origine de ces forces contractiles et il a été montré que la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine (MLC) est un événement clé de ce phénomène. Dans cette étude, nous décrivons un modèle expérimental qui nous permet d'étudier les événements précoces impliqués dans le bouillonnement membranaire, dans un contexte où il y a absence d'activité caspase-3. Notre étude fournit de nouveaux arguments en faveur de l'existence de voies caspase-indépendantes impliquées dans le bouillonnement membranaire. Nos résultats indiquent que le bouillonnement membranaire dépend de phénomènes de phosphorylation et de modifications lipidiques post-transcriptionnelles (prénylation). De plus, nos résultats indiquent l'existence d'une nouvelle voie de signalisation menant au bouillonnement membranaire qui implique la kinase ROCK, un effecteur de la protéine Rho.

TABLE DES MATIÈRES

IDENTIFICATION DU JURY.....	ii
SOMMAIRE.....	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	iv
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	ix
INTRODUCTION.....	1
1. <i>Les cellules hématopoïétiques</i>	2
2. <i>L'apoptose</i>	3
2.1. L'apoptose : généralités.....	3
2.2. Apoptose et nécrose : comparaison de quelques caractéristiques.....	4
2.3. Les caspases : des protéases spécifiques à l'apoptose.....	5
2.4. Les caspases clivent un grand nombre de substrats intracellulaires.....	6
2.5. Voies menant à l'activation des caspases.....	7
2.5.1. L'activation directe par une autre caspase.....	7
2.5.2. L'activation par proximité induite.....	8
2.5.3. L'activation par la liaison d'une sous-unité régulatrice.....	8
2.6. Les protéines de la famille Bcl-2.....	8
2.7. La mitochondrie et les protéines de la famille Bcl-2.....	9
2.8. L'acidification du pH intracellulaire durant l'apoptose.....	11
3. <i>La réorganisation du cytosquelette dans l'apoptose</i>	12
3.1 La phase de relâche.....	13
3.1.1. Protéines impliquées dans la phase de relâche.....	14
3.2. La phase de bouillonnement membranaire.....	15

3.2.1. Protéines impliquées dans la phase de bouillonnement membranaire.....	16
3.2.2. Implication de la MLCK, du calcium et de la GTPase RhoA dans le bouillonnement membranaire.....	17
3.2.3. Voies de signalisation intracellulaires dépendantes du calcium.....	18
3.2.4. RhoA et ROCK.....	18
3.2.5. Le clivage de ROCK-I par la caspase-3 induit la phosphorylation de la MLC et le bouillonnement membranaire.....	19
3.3. La phase de condensation.....	19
3.3.1. Protéines impliquées dans la phase de condensation.....	19
4. Régulation de l'apoptose.....	20
4.1. La voie intrinsèque.....	20
4.1.1. p53.....	21
4.1.2. Déprivation en facteur de croissance et altération du pH intracellulaire.....	21
4.2. La voie extrinsèque.....	22
5. L'échangeur Na^+/H^+.....	22
6. Objectif de travail.....	23
FIGURE I. Représentation schématique de l'hématopoïèse.....	25
FIGURE II. Bouillonnement membranaire.....	26
FIGURE III. Les principales voies d'activation des caspases.....	27
FIGURE IV. Modèle théorique : contraction cellulaire et formation des boursouflures.....	28
FIGURE V. a) Régulation de ROCK par Rho b) Voies de signalisation impliquant ROCK.....	29
FIGURE VI. Hypothèse de travail.....	30
PRÉSENTATION DU MANUSCRIT.....	31
TITLE: Kinase-dependent signalling pathways involved in membrane blebbing during apoptosis.....	32
SUMMARY.....	33

INTRODUCTION	34
MATERIALS AND METHODS	38
Reagents.....	38
Cell Lines and growth factors.....	39
Annexin V assay.....	39
TUNEL reaction.....	39
Caspase-3 assay.....	40
Mitochondrial potential measurement.....	40
Intracellular pH measurement.....	41
Inhibitor assays.....	41
RESULTS	42
EIPA treatment of TF-1/Bcl-2 induces the apoptotic features of membrane blebbing and membrane flip-flop without measurable caspase-3 activity.....	42
Kinases inhibitors STS, H7 and ML-7 inhibit or decrease membrane blebbing, as does Chaetomelic Acid A, an inhibitor of geranylgeranyltransferase and farnesyltransferase.....	44
Y-27632, a specific ROCK inhibitor, suppresses membrane blebbing.....	46
DISCUSSION	47
REFERENCES	49
TABLES	54
LEGENDS	57
FIGURES	61
DISCUSSION ET CONCLUSION	70
FIGURE VII. Voies de signalisation régulant le bouillonnement membranaire durant l'apoptose.....	80
BIBLIOGRAPHIE	81
REMERCIEMENTS	87

LISTE DES FIGURES

FIGURE I.	Représentation schématique de l'hématopoïèse.....	25
FIGURE II.	Bouillonnement membranaire.....	26
FIGURE III.	Les principales voies d'activation des caspases.....	27
FIGURE IV.	Modèle théorique : contraction cellulaire et formation des boursoflures.....	28
FIGURE V.	a) Régulation de ROCK par Rho b) Voies de signalisation impliquant ROCK.....	29
FIGURE VI.	Hypothèse de travail.....	30
FIGURE VII.	Voies de signalisation régulant le bouillonnement membranaire durant l'apoptose.....	80
FIGURE 1.	EIPA induces the apoptotic features of membrane blebbing and phosphatidylserine exposition despite Bcl-2 overexpression in TF- 1 cells.....	61
FIGURE 2.	Dose-dependent loss of membrane asymmetrical distribution of phosphatidylserine induced by EIPA.....	62
FIGURE 3.	Bcl-2 overexpression prevents loss of mitochondrial potential in response to EIPA.....	63

- FIGURE 4.** EIPA treatment induces neither caspase-3 nor DNA degradation despite high Annexin V staining.64
- FIGURE 5.** Staurosporine inhibits both EIPA-induced membrane blebbing and spontaneous membrane blebbing in TF-1/Bcl-2 cells.....65
- FIGURE 6.** The kinase inhibitors H7 and ML-7 and the farnesylation inhibitor Chaetomelic Acid A decreases EIPA-induced membrane blebbing in TF-1/Bcl-2 cells.....66
- FIGURE 7.** ROCK-I inhibition by Y-27632 strongly inhibits membrane blebbing in TF-1/Bcl-2.....67

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ABP	« actin binding protein »
Akt	« protein kinase B »
Apaf-1	« apoptosis activating factor-1 »
ATP	« adenosine triphosphate »
Bcl-2	« B-cell lymphoma »
CAD	« caspase activated Dnase »
DD	« death domain »
DED	« death effector domain »
DETD	« Asp-Glu-Thr-Asp »
DMSO	« dimethylsulfoxide »
DNA	« desoxyribonucleic acid »
dnRho	« dominant-negative form of Rho »
ECM	« extracellular matrix »
EIPA	« 5-(<i>N</i> -ethyl- <i>N</i> -isopropyl)amiloride »
F actin	« filamentous actin »
FAK	« focal adhesion kinase »
FasL	« Fas ligand »
FITC	« fluorescein isothiocyanate »
Ftase	« farnesyltransferase »
GGTase	« geranylgeranyltransferase »
GM-CSF	« granulocyte/monocyte colony-stimulating factor »
GTPase	« guanosine triphosphatase »
h	« hour »
ICAD	« inhibitor of caspase activated Dnase »
IC ₅₀	« Concentration corresponding to 50% of inhibition »
IMDM	« Iscove modified Dulbelco medium »
min	« minute »
MAP kinase	« mitogen-activated protein kinase »

MEK	« erk kinase »
MLC	« Myosin light chain »
MLCK	« Myosin light chain kinase »
ml	« milliliter »
MSCV	« murine stem cell virus »
ng	« nanogram »
nM	« nanomolar »
PAK-1 et 2	« p21 activated kinase »
pH _i	« intracellular pH »
PI	« propidium iodide »
PI3K	« phosphatidylinositol-3 kinase »
PKA	« cyclic AMP-dependant protein kinase »
PKC	« protein kinase C»
ROCK	« Rho-dependant kinase »
STS	« staurosporine »
SD	« standard deviation »
SV40	« simian virus 40 »
TdT	« terminal deoxynucleotidyl transferase »
TNF α	« tumor necrosis factor alpha »
TUNEL	« terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP-biotin nick end labeling »
μ M	« micromolar »

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1. Les cellules hématopoïétiques.

Les différentes lignées hématopoïétiques sont produites à partir de cellules souches que l'on retrouve au niveau de la moelle osseuse. On appelle hématopoïèse le processus par lequel ces différentes lignées cellulaires sont formées. L'étude de l'hématopoïèse nous permet de comprendre les mécanismes par lesquels le code génétique d'une cellule influence sa différenciation en une lignée cellulaire spécifique, comment elle influence sa mort, et permet de comprendre comment l'homéostasie sanguine est altérée dans la leucémie.

La production des cellules sanguines tout au long de la vie est assurée par un nombre très restreint de cellules souches hématopoïétiques. Ces cellules peuvent à la fois se renouveler par prolifération ou encore se différencier en différents progéniteurs de lignées cellulaires. L'hématopoïèse est généralement représentée de façon hiérarchique (Figure I), avec les cellules souches donnant naissance aux progéniteurs lymphoïdes et myéloïdes puis aux précurseurs de chacune des lignées cellulaires (lymphocytes T et B, monocytes, neutrophiles, éosinophiles, mastocytes, érythrocytes, mégakaryocytes).

Une large gamme de facteurs de croissance ont été décrits et impliqués dans l'hématopoïèse. Leur rôle exact dans l'hématopoïèse reste cependant à définir, car, si on sait qu'ils sont nécessaires à la survie des cellules, on ignore toujours s'ils ont un rôle à jouer dans la spécification et la différenciation cellulaire. C'est pourquoi on considère généralement les facteurs de croissance comme n'étant pas directement responsables de la voie de différenciation prise par une cellule, mais plutôt de sa survie et de sa prolifération au sein de la voie de différenciation dans laquelle elle est engagée (Socolovsky *et al*, 1998, Stoffel *et al*, 1999).

2. L'apoptose.

2.1. L'apoptose : généralités.

L'apoptose aussi appelée mort cellulaire programmée, suicide cellulaire ou encore démantèlement cellulaire est un processus complexe et régulé de façon étroite. La mise en branle du processus de mort est lourde de conséquences; ainsi, un nombre important de gènes est impliqué dans la prise de décision qui mène à l'activation des voies de signalisation qui entraînent la mort d'une cellule.

Les organismes pluricellulaires ont développé plusieurs stratégies leur permettant de préserver l'équilibre de leur milieu interne. Parmi ces stratégies, il existe diverses façons de contrôler, à la hausse ou à la baisse, le nombre de cellules afin de régénérer un tissu lésé, se débarrasser de cellules en excès ou potentiellement dangereuses ou encore, de remodeler un organe. Ces mécanismes qui comprennent la division cellulaire, la migration cellulaire et l'apoptose sont nécessaires à l'homéostasie des organismes.

Le terme apoptose a été adopté en 1972, suite aux travaux de Kerr, Wyllie et Currie, pour décrire un type commun de mort cellulaire observée dans un nombre varié de tissus (Kerr *et al*, 1972). Les cellules qu'ils observèrent présentaient, lors de leur mort, des caractéristiques morphologiques communes différentes de celles rencontrées lors de la mort par nécrose. Ces observations les amenèrent à suggérer l'existence d'un programme commun de mort cellulaire partagé par toutes les cellules (Wyllie *et al*, 1980).

2.2. Apoptose et nécrose : comparaison de quelques caractéristiques.

Une cellule entrant en apoptose présente des caractéristiques morphologiques et biochimiques spécifiques, qui sont souvent utilisées comme critères pour définir et mesurer l'apoptose. Tout d'abord, lors de l'apoptose, la cellule se contracte et se dissocie de sa matrice extracellulaire (Huot *et al*, 1998). Le noyau présente des modifications particulières parmi lesquelles on retrouve une condensation de la chromatine, une disparition de la membrane nucléaire de même qu'une fragmentation du noyau. D'autres modifications caractéristiques de l'apoptose sont l'activation des caspases, la perte de l'asymétrie membranaire dans la répartition des phospholipides présentant des résidus phosphatidylsérines, l'acidification du pH intracellulaire, l'altération du potentiel mitochondrial, la dégradation de l'ADN en fragments nucléosomiques et la présence de bouillonnement membranaire (Häcker, 2000). Le bouillonnement membranaire est un phénomène dynamique au cours duquel on observe des déformations de type protrusions et rétractions au niveau de la membrane plasmique (Figure II).

Par opposition, lors de la nécrose cellulaire, la cellule augmente de volume et présente une perte de l'intégrité de ses organelles de même qu'une rupture de la membrane plasmique, de telle sorte que le contenu du cytoplasme s'échappe vers l'extérieur de la cellule. La fuite du cytoplasme entraîne une réaction rapide du système immunitaire, ce qui engendre une réponse inflammatoire locale, absente dans la mort par apoptose.

Quelques causes communes de nécrose sont l'hyperthermie, l'inhibition des voies métaboliques énergétiques (glycolyse, cycle de Krebs, phosphorylation oxydative), la lyse cellulaire par activation du complément et l'hypoxie (Wyllie, 1981). La mort par apoptose peut également être déclenchée par des stimuli de diverses natures : radiations ionisantes, agents alkylants (dommage à l'ADN), stimulation par le $TNF\alpha$, liaison du ligand Fas à son récepteur,

altérations du pH intracellulaire, déprivation en facteurs de croissance, détachement de la matrice extracellulaire, etc.

Contrairement à la nécrose, l'apoptose peut être un phénomène réversible. Par exemple, lorsque p53 est activé en réponse à des dommages à l'ADN, le processus apoptotique qui est amorcé peut être renversé si les dommages à l'ADN sont réparés (Geske *et al*, 2001).

2.3. Les caspases : des protéases spécifiques à l'apoptose.

Une partie importante des modifications morphologiques observées sur des cellules en apoptose sont causées par l'activation d'une famille de protéases à motif cystéine activées de façon spécifique durant l'apoptose (Figure III). La famille des caspases est composée de protéines présentant une homologie de séquence importante et retrouvée de façon hautement conservée dans l'évolution des espèces (Earnshaw *et al*, 1999).

Les caspases possèdent un site actif contenant un résidu cystéine et ont une spécificité enzymatique pour la séquence Asp-xxx (un substrat contenant une séquence peptidique ayant un résidu aspartate suivi de trois autres résidus d'acides aminés). Les caspases ont été regroupées en sous-familles en fonction de leur spécificité, leur homologie de séquence et leur homologie de structure (Thornberry *et al*, 1997).

Les caspases, parce qu'elles sont responsables de plusieurs des modifications morphologiques observées durant l'apoptose, sont considérées comme les exécutants majeurs des voies apoptotiques. Bloquer de façon pharmacologique ou par mutagenèse dirigée les caspases peut ralentir ou empêcher la mort par apoptose (Nicholson *et al*, 2000). Cependant, il a été rapporté que l'addition d'inhibiteurs n'est parfois pas suffisante pour bloquer l'apoptose et que, de façon étonnante, certaines caractéristiques

morphologiques des cellules en apoptose sont indépendantes de l'activité des caspases. McCarthy *et al*, (1997) et Mills *et al*, (1998a) ont tous deux rapporté du bouillonnement membranaire dans des lignées cellulaires après inhibition pharmacologique des caspases et induction de l'apoptose.

2.4. Les caspases clivent un grand nombre de substrats intracellulaires.

L'activation des caspases ne mène pas à une dégradation généralisée des constituants cellulaires mais plutôt à la protéolyse d'un nombre limité de protéines cibles. De façon générale, les protéines clivées par les caspases sont inactivées; cependant, il existe certaines kinases, qui sont activées par l'action des caspases. Les caspases, en clivant le domaine inhibiteur de la kinase, ont pour effet de l'activer de façon constitutive.

Au cours des dernières années, au-delà de cent protéines ont été identifiées comme étant substrats des caspases (Earnshaw *et al*, 1999). Parmi celles-ci, on retrouve une nucléase appelée DFF40 (l'équivalent chez la souris est CAD : caspase activated DNase) qui est activée par clivage protéolytique d'une sous-unité inhibitrice appelée DFF45 (ICAD chez la souris (Nagata, 2000)). La nucléase DFF40 dégrade l'ADN génomique en coupant l'ADN entre les nucléosomes ce qui a pour conséquence de générer des fragments d'ADN dont les longueurs sont des multiples de 180 paires de bases. Cette dégradation est à l'origine de l'échelle d'ADN (DNA laddering) caractéristique de l'apoptose (Wyllie, 1980).

L'activation des caspases est également responsable de bien d'autres caractéristiques propres à l'apoptose. Ce sont elles qui clivent les lamines nucléaires et qui mènent à la dissolution de l'enveloppe nucléaire (Buendia *et al*, 1999). Certaines protéines du cytosquelette sont également clivées par les caspases, notamment la fodrine et la gelsoline (Kothakota *et al*, 1997). L'effet

présupposé de ce clivage est la désorganisation du cytosquelette et la formation de bouillonnement membranaire. Parmi les kinases activées par clivage, la kinase dépendante de p21, PAK-2 est activée par protéolyse et semble être impliquée directement dans le bouillonnement membranaire (Rudel *et al*, 1997), de plus, il a récemment été montré que ROCK-I, la kinase activée par Rho est activée d'une façon similaire (Sebbagh *et al*, 2001).

2.5. Voies menant à l'activation des caspases.

Les caspases sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs, composés de trois domaines : une portion N-terminale et des domaines p20 et p10. L'enzyme active est composée de deux hétérodimères p20/p10 qui forment deux sites actifs (Earnshaw *et al*, 1999). L'activation des caspases peut se faire de diverses manières. Trois principaux mécanismes ont été décrits : l'activation directe par une autre caspase, l'activation par proximité induite et l'activation par la liaison d'une sous-unité régulatrice.

2.5.1. L'activation directe par une autre caspase.

En majorité, les caspases sont activées par clivage protéolytique par d'autres caspases, avec une spécificité pour les séquences contenant des résidus Asp. Ce mode d'activation en cascade est très efficace car il permet d'amplifier le signal apoptotique. L'activation par clivage protéolytique est utilisée pour activer les caspases à prodomaines courts comme les caspases-3, -6 et -7 qui sont plus nombreuses et plus actives que les autres caspases.

2.5.2. L'activation par proximité induite.

Lors de la liaison d'un ligand à un récepteur contenant un domaine de mort (Figure III), comme le récepteur Fas ou le récepteur du $TNF\alpha$, la procaspase-8 est recrutée par le récepteur via FADD, une protéine adaptatrice à domaine DED et DD (Weber et Vincenz, 2001) et s'assemble avec d'autres molécules de procaspase-8 pour former un complexe. La procaspase-8 possède une région DED qui se lie à la protéine adaptatrice FADD qui contient également un domaine DED. La protéine FADD sert d'adaptateur en liant le récepteur Fas au niveau de son motif DD (interactions entre domaines homologues DED-DED et DD-DD). L'induction d'une telle proximité entre les molécules de procaspase-8, est suffisante pour mener au clivage mutuel des caspases-8, ce qui entraîne leur activation. (Muzio *et al*, 1998).

2.5.3. L'activation par la liaison d'une sous-unité régulatrice.

L'activation de la caspase-9 est un processus complexe qui nécessite, en présence d'ATP, l'intervention de deux cofacteurs: la protéine Apaf-1 (Rodriguez *et al*, 1999) et le cytochrome *c* (Li *et al*, 1997). Ce complexe protéique de très haut poids moléculaire porte le nom d'apoptosome et contient probablement d'autres protéines (Cain *et al*, 2000).

2.6. Les protéines de la famille Bcl-2.

Une autre classe de protéines, la famille Bcl-2, est impliquée de façon spécifique dans l'apoptose. Ces protéines, pro-apoptotiques ou anti-apoptotiques, interagissent ensemble par l'intermédiaire d'interactions protéines-protéines et régulent une voie cruciale de l'apoptose en permettant ou empêchant la sortie du facteur pro-apoptotique mitochondrial cytochrome *c*

dans le cytosol (Adams *et al*, 1998, Antonsson *et al*, 2000). Dans la cellule, les protéines de la famille Bcl-2 forment des homodimères ou des hétérodimères entre membres pro-apoptotiques ou anti-apoptotiques (Adams *et al*, 1998, Antonsson *et al*, 2000). L'hétérodimérisation mène à une neutralisation mutuelle des protéines pro- ou anti-apoptotiques et à un effet net qui est la survie cellulaire. Étant donné le nombre élevé de combinaisons possibles les effets pro- ou anti-apoptotiques s'annulent habituellement. Cependant une cellule avec des niveaux plus élevés de protéines anti-apoptotiques sera généralement plus résistante à l'apoptose.

2.7. La mitochondrie et les protéines de la famille Bcl-2.

La mitochondrie, outre son rôle essentiel dans la production d'énergie cellulaire, est un acteur de premier plan de la mort cellulaire par apoptose. En état de survie cellulaire, la mitochondrie séquestre une large gamme de protéines pro-apoptotiques, dont le cytochrome *c*, qui en plus de permettre la production d'énergie par phosphorylation oxydative, est essentiel à l'activation de la caspase-9 (Li *et al*, 1997). La façon exacte par laquelle le cytochrome *c* est expulsé de la mitochondrie demeure inconnue. Cependant, on sait que les protéines de la famille Bcl-2 sont impliquées dans la régulation de ce processus. Ainsi, l'addition de protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 à des isolats de mitochondries mène à une relâche de cytochromes *c*, tandis que la surexpression de protéines anti-apoptotiques prévient cette relâche (Gross *et al*, 1999). On croit que les protéines de la famille Bcl-2 exercent leur activité anti-apoptotiques ou pro-apoptotiques en influençant la formation de pores dans la mitochondrie, en liant des protéines telles ANT (adenine nucleotide translocator) et en formant des homo ou des hétérodimères Bcl-2-Bcl-2 ou Bcl-2-Bax (Brenner *et al*, 2000).

Plusieurs hypothèses ont été formulées et testées pour tenter d'expliquer la manière dont les protéines de la famille Bcl-2 régulent l'expulsion du cytochrome *c*. Parmi les modèles retenus on retrouve : la formation de canaux permettant le passage de protéines et la rupture de la membrane mitochondriale externe (Adams *et al*, 1998, Antonsson *et al*, 2000).

Étant donné l'importante similarité structurelle de certaines protéines de la famille Bcl-2 avec une sous-unité de la toxine diphtérique formant des pores transmembranaires (Muchmore *et al*, 1996), il a été suggéré que les protéines de la famille Bcl-2 puissent permettre la relâche du cytochrome *c* en favorisant la formation de pores transmembranaires de taille suffisamment grande pour permettre la sortie d'une petite protéine. Récemment il a été montré que ces pores, qui se forment dans la membrane mitochondriale sous certaines conditions (signal apoptotique ou autre stimulus), sont composés de canaux anioniques voltages-dépendants (VDAC), de translocase (adenine nucleotide translocase) et de cyclophiline-D (CyP-D), de même que des protéines Bax/Bcl-2. Ils se forment aux endroits où les membranes mitochondriales internes et externes entrent en contact. *In vitro*, ce complexe adopte une conformation ouverte dans diverses conditions : signal pro-apoptotique et formation de t-Bid, la forme tronquée de Bid (une protéine pro-apoptotique clivée par les caspases (Figure III)), des niveaux d'ATP bas, un pH intracellulaire bas, ou des niveaux élevés de Ca^{2+} (Crompton, 1999), (Zamzami *et al*, 2000).

Le cytochrome *c* est, de façon quasi universelle, relâché dans le cytosol lors de l'apoptose. Cependant, c'est parfois un événement précoce, qui répond par exemple à p53 (lors de dommage à l'ADN), parfois un événement tardif, comme dans le cas de l'apoptose par stimulation de récepteurs à domaine de mort (Scaffidi *et al*, 1998).

2.8. L'acidification du pH intracellulaire durant l'apoptose.

La mitochondrie joue un rôle critique dans l'induction de l'apoptose en réponse à un vaste nombre de stimuli apoptotiques. Lorsqu'elles deviennent impliquées dans l'apoptose, les mitochondries relâchent dans le cytoplasme des protéines qui activent les caspases ou remplissent d'autres fonctions pro-apoptotiques. Ces protéines dont la relâche est contrôlée par la mitochondrie, comprennent le cytochrome *c*, les caspases-2, -3 et -9 et le facteur SMAC/DIABLO (Lorenzo *et al*, 1999, Du *et al*, 2000, Robertson *et al*, 2000). Les mécanismes par lesquels ces protéines s'échappent de ces organelles restent encore inconnus. De plus, on ignore toujours si les modifications mesurées au niveau de la mitochondrie durant l'apoptose (perte du potentiel mitochondrial, sortie de protéines pro-apoptotiques) sont le résultat de mécanismes régulés de formation de pores, ou les résultats de désordres engendrés par un signal apoptotique.

Dans un état physiologique, les mitochondries conservent un gradient électrochimique de part et d'autre de leur membrane interne en pompant des protons de la zone matricielle jusqu'à l'espace inter-membranaire. Cette fonction est couplée au transport des électrons, qui est responsable de la production d'énergie par la cellule (chaîne respiratoire mitochondriale). Le gradient électrochimique est composé en majeure partie d'un gradient d'ions H^+ de part et d'autre de la membrane interne (Hatefi, 1985).

On croit, que lorsqu'il se produit un dérèglement au niveau du pH intracellulaire (par exemple : inhibition pharmacologique de l'échangeur Na^+/H^+ par l'amiloride ou déprivation en facteur de croissance), l'apoptose est facilitée. Chose intéressante, une diminution du pH stimule l'activation des caspases. Par exemple, une diminution du pH augmente la réaction de formation de certains composants de l'apoptosome. Réciproquement, à un pH physiologique de 7.4, la réaction d'activation de la caspase-9 par le cytochrome *c* chute de

75% (Matsuyama *et al*, 2000). Cependant, on ne sait pas si l'acidification du pH est suffisante pour permettre à elle seule une activation des caspases. Récemment, (Roy *et al*, 2001) ont montré que la caspase-3, qui est résistante à l'activation par oligomérisation, est maintenue dans un état inhibé par un tripeptide régulateur. Ce tripeptide régulateur exerce son action via des interactions ioniques qui sont détruites lors de l'acidification du pH intracellulaire. L'acidification du pH intracellulaire qui se produit lors des étapes précoces de l'apoptose pourrait donc être en lien direct avec l'activation de la caspase-3 lors de l'apoptose par déprivation en facteur de croissance ou lors d'atteinte du pH intracellulaire.

On sait que la liaison du facteur de croissance GM-CSF à son récepteur entraîne une activation de l'échangeur Na^+/H^+ et que le maintien de cette activité est nécessaire à la survie cellulaire (Rajotte *et al*, 1992). Il est fort probable que l'un des mécanismes par lesquels les facteurs de croissance permettent la survie cellulaire soit d'empêcher l'acidification du pH intracellulaire et conséquemment, d'empêcher l'activation des caspases.

3. La réorganisation du cytosquelette dans l'apoptose.

En majorité, les études portant sur l'apoptose se sont attardées à élucider les mécanismes d'activation des caspases, de relâche du cytochrome c ou encore de fragmentation de l'ADN. Comparativement, peu d'études ont porté sur les mécanismes sous-tendant la réorganisation du cytosquelette ou ont cherché à comprendre le rôle du bouillonnement membranaire dans l'apoptose. Cependant, au cours des dernières années, certaines avancées ont été faites en ce qui concerne les événements cytosquelettiques impliqués dans l'apoptose.

Selon le modèle proposé par Mills *et al* (1999) (Figure IV), on peut subdiviser la phase d'exécution en trois sous-phases distinctes et séquentielles. Ces sous-phases sont : la phase de relâche (ou de réorganisation de l'actine), la phase de bouillonnement membranaire, et finalement, la phase de condensation (ou de dissolution de l'actine).

Dans la phase de relâche, la cellule se détache de la matrice extracellulaire pour adopter une forme sphérique. Cette modification est accompagnée par une réorganisation du cytosquelette d'actine en un anneau sous-cortical associé à la membrane, et par un désassemblage des microtubules. La deuxième phase, celle du bouillonnement membranaire, débute avec la contraction de l'anneau d'actine via l'action contractile de la myosine II et se poursuit par une période de modifications morphologiques de la membrane plasmique de type protrusions et rétractions dynamiques. Dans la dernière phase, celle de la condensation, le cytosquelette d'actine se dissout et la cellule est fragmentée en petits corps apoptotiques. Ces corps apoptotiques sont par la suite phagocytés par des cellules voisines ou des macrophages professionnels.

3.1. La phase de relâche.

Suite à un signal apoptotique, la majorité des cellules adhérentes se détachent de leur matrice extracellulaire et adoptent une forme sphérique. Ce phénomène est très prononcé chez les cellules ayant un fort attachement à la matrice extracellulaire comme les fibroblastes, les épithéliocytes et les endothéliocytes (Brancolini *et al*, 1997, Levkau *et al*, 1998, Huot *et al*, 1998). Il est toutefois moins dramatique chez les cellules ayant de plus faibles interactions avec la matrice extracellulaire, comme les lymphocytes ou les précurseurs hématopoïétiques. Lors de la phase de relâche, les complexes d'adhésion focale sont désassemblés (Levkau *et al*, 1998, Huot *et al*, 1998) et

le cytosquelette d'actine se réarrange pour former un anneau sous-cortical, lié à la membrane plasmique. Il a été montré que le réarrangement du cytosquelette d'actine est un élément critique de cette phase car l'inhibition de la polymérisation de l'actine par la cytochalasine A empêche le détachement et l'adoption d'une forme sphérique par la cellule (Huot *et al*, 1998).

3.1.1. Protéines impliquées dans la phase de relâche.

Plusieurs protéines ont été impliquées dans la phase de relâche, parmi celles-ci on retrouve des protéines du cytosquelette, des protéases et des kinases.

Lors de la phase de relâche, la FAK est clivée, de même que trois autres protéines de structure impliquées dans la formation de sites d'adhésion focale et qui servent à relier le cytosquelette d'actine aux sites d'adhésion. Ce sont l' α -actinine et la taline (Wen *et al*, 1997, Bannerman *et al*, 1998, Levkau *et al*, 1998, van de Water *et al*, 1999). Le désassemblage des microtubules est un événement précoce de la phase d'exécution et est nécessaire à l'adoption d'une forme sphérique par la cellule (Mills *et al*, 1998b). Le désassemblage des microtubules a également pour conséquence d'empêcher le transport des organelles de même que la compartimentation intracellulaire (Reszka *et al*, 1997, Mills *et al*, 1998b, Nagata *et al*, 1998).

Les protéases de la famille des caspases sont impliquées elles aussi dans cette phase précoce de réarrangement du cytosquelette. Les caspases clivent les protéines FAK, la taline et la fodrine, toutes impliquées dans la formation de complexes d'adhésion focale ou dans l'ancrage du squelette d'actine à la membrane plasmique (Bannermann *et al*, 1998, Levkau *et al*, 1998, Knepper-Nicolai *et al*, 1998, Wang *et al*, 1998). Chose intéressante, il semble que l'activation de caspases ne soit pas absolument nécessaire à l'apparition du bouillonnement membranaire puisque certains auteurs ont observé du

bouillonnement membranaire malgré l'inhibition des caspases (McCarthy *et al*, 1997, Mills *et al*, 1998a, Huot *et al*, 1998).

Certaines kinases ont été impliquées dans les événements précoces de la phase d'exécution. La kinase activée par p21 (PAK-2) qui est connue pour être aussi activée par les GTPase Rho et Cdc42 et réorganiser le cytosquelette d'actine, est clivée par les caspases ce qui a pour conséquence de produire une forme constitutivement active de PAK-2 (Lee *et al*, 1997, Rudel et Bokoch, 1997). La protéine PAK-1 a aussi été impliquée dans le désassemblage des fibres de stress et la réorganisation de l'actine (Sanders *et al*, 1999).

3.2. La phase de bouillonnement membranaire.

Le modèle proposé par Mills *et al* (1999) (Figure IV) représente une tentative pour expliquer les mécanismes qui sous-tendent le bouillonnement membranaire. Selon ce modèle, il y a, lors du bouillonnement membranaire, création d'une force centripète (dont le vecteur va du centre de la cellule vers l'extérieur) résultant d'une interaction entre les filaments de myosine II et l'anneau sous-cortical d'actine. Cette interaction a pour effet de contracter l'anneau d'actine et d'induire une augmentation de la pression intracellulaire.

En parallèle, les complexes protéiques retenant le cytosquelette d'actine à la membrane sont clivés par l'action des caspases ce qui a pour conséquence d'affaiblir le cytosquelette sous-cortical. Il en résulte la formation de protrusions de cytoplasme entourées de membrane (boursoufflures). Les caspases ne semblent toutefois pas nécessaires au bouillonnement membranaire puisque certains auteurs ont rapporté la présence de bouillonnement membranaire après inhibition des caspases par un inhibiteur pharmacologique dans certaines lignées cellulaires (McCarthy *et al*, 1997, Mills *et al* 1998a). D'autre part, des hépatocytes provenant de souris déficientes en caspase-3 ne

présentent pas de bouillonnement membranaire lorsque mis en présence du ligand de Fas (Zheng *et al*, 1998). Ces résultats suggèrent qu'il existe plus d'une voie menant à la formation de boursoflures, et que certaines de ces voies sont dépendantes des caspases, d'autres non.

3.2.1. Protéines impliquées dans la phase de bouillonnement membranaire.

La myosine II, ou myosine non musculaire semble être le moteur responsable des déformations dynamiques de la membrane dans le bouillonnement membranaire (Mills *et al*, 1998a, Torgerson et McNiven, 1998). L'inhibition de l'activité catalytique de la myosine ou de celle de RhoA, une GTPase impliquée dans la réorganisation du cytosquelette, empêche la formation de boursoflures dans certaines lignées cellulaires entrant en apoptose (Mills *et al*, 1998a). Ces données obtenues sur le rôle de la myosine II dans les phénomènes membranaires apoptotiques ressemblent à certaines fonctions des myosines I et VI, des protéines connues pour réguler la formation de déformations membranaires (Mitchison et Cramer, 1996).

L'inhibition de la polymérisation du cytosquelette d'actine par la cytochalasine D inhibe le bouillonnement membranaire (Mills *et al*, 1998a). Il semble donc que l'actine soit nécessaire pour générer une force menant à la formation de boursoflures. Certaines des protéines ancrant le cytosquelette d'actine à la membrane sont clivées par les caspases durant la phase de bouillonnement membranaire. La fodrine est une cible bien caractérisée des caspases (Martin *et al*, 1995, Cryns *et al*, 1996). D'autres protéines, l'ezrine, la moesine et la radixine sont déphosphorylées et se dissocient de la membrane plasmique durant cette phase (Kondo *et al*, 1997).

Selon le modèle proposé par Mills *et al* (1999), le clivage de ces protéines mène à la création de zones de faiblesse au niveau membranaire aux endroits où le cytosquelette d'actine n'est plus ancré à la membrane plasmique. C'est au niveau de ces zones de faiblesse que se développeraient les boursouffures.

3.2.2. Implication de la MLCK, du calcium et de la GTPase RhoA dans le bouillonnement membranaire.

Il a récemment été montré que la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine est essentielle au bouillonnement membranaire et il a été suggéré que la MLCK et la GTPase RhoA sont des régulateurs-clés du bouillonnement membranaire (Mills *et al*, 1998a).

De par leur interaction avec les filaments d'actine, les filaments de myosine sont impliqués dans plusieurs formes de motilité cellulaire. La myosine non-musculaire (myosine II) joue un rôle entre autre dans des phénomènes tels le maintien de l'intégrité du cytosquelette d'actine, la sécrétion de vésicules et la division cellulaire. L'activité contractile de la myosine II est régulée par la phosphorylation d'une sous-unité catalytique : la chaîne légère de la myosine. La chaîne légère de la myosine (ou MLC) catalyse la formation d'une interaction entre la tête de la myosine et le filament d'actine. Cette interaction mène à la création d'une force qui entraîne le glissement des deux filaments l'un sur l'autre, dans des directions opposées. Cette fonction catalytique de la MLC est médiée par son activité ATPasique. La MLC est activée en étant phosphorylée par la MLCK (kinase de la chaîne légère de la myosine), une kinase Ca^{2+} /calmoduline-dépendante, et est régulée par la phosphatase de la MLC (Kohama *et al*, 1996, Alessi *et al*, 1992).

3.2.3. Voies de signalisation intracellulaires dépendantes du calcium.

Il existe différentes voies qui mènent à la relâche de calcium par le réticulum endoplasmique. Par exemple, les récepteurs de l'IP₃, situés à la surface du réticulum endoplasmique servent à contrôler l'influx de calcium dans le compartiment cytoplasmique en réponse à des signaux qui activent la phospholipase C, une enzyme capable de catalyser la transformation du phosphatidylinositol en Ins(1,4,5)P₃. Le calcium possède plusieurs fonctions intracellulaires, dont celles de jouer le rôle de second messager, de permettre la sécrétion de vésicules ou encore de permettre la contraction musculaire.

3.2.4. RhoA et ROCK

Les Rho GTPases sont des protéines faisant partie de la superfamille de Ras et qui sont connues pour être impliquées dans les phénomènes de motilité cellulaire, notamment en étant des régulateurs du cytosquelette d'actine (Bargi et Hall, 2000). Les Rho GTPases stimulent aussi la kinase dépendante de Rho (ROCK), une sérine/thréonine kinase ayant pour rôle de stabiliser les filaments d'actine et d'ancrer le cytosquelette d'actine à la membrane plasmique. La kinase de Rho est également connue pour phosphoryler la chaîne légère de la myosine sur le même résidu sérine que la MLCK, un événement menant à une augmentation de l'interaction entre les filaments d'actine et de myosine et conduisant à la génération d'une force contractile. De plus, la kinase de Rho inactive la phosphatase de la myosine en phosphorylant sa sous-unité liant la myosine (Amano *et al*, 1996). La kinase de Rho et la phosphatase de la myosine régulent donc le niveau de phosphorylation de la MLC et, par conséquent, l'organisation du cytosquelette (Figure V).

3.2.5. Le clivage de ROCK-I par la caspase-3 induit la phosphorylation de la MLC et le bouillonnement membranaire.

Il a récemment été démontré qu'une des deux isoformes de la kinase de Rho (ROCK-I) est impliquée directement dans le bouillonnement membranaire. Lors de l'apoptose, l'activation des caspases mène au clivage de ROCK-I au niveau d'une séquence DETD par la caspase-3 et à l'activation constitutive de cette kinase, par élimination de son domaine inhibiteur en C-terminal. L'activation de ROCK-I devient alors indépendante de Rho. La kinase ROCK-I induit la phosphorylation de la MLC et, en stimulant la contractilité cellulaire, provoque du bouillonnement membranaire (Sebbagh *et al*, 2001, Coleman *et al*, 2001).

3.3. La phase de condensation.

La phase de bouillonnement membranaire prend généralement fin après quelques heures. La cellule se fragmente alors en petits corps apoptotiques ou se condense en une sphère plus petite. Durant cette phase, le cytosquelette d'actine est complètement dégradé et les microtubules sont désassemblés (Mills *et al*, 1998b). Selon Mills *et al* (1999) la phase de condensation n'est peut-être que l'étape finale du bouillonnement membranaire, un moment où la contraction de la cellule entraîne la formation de gros blebs qui sont expulsés pour former des corps apoptotiques.

3.3.1. Protéines impliquées dans la phase de condensation.

Les caspases semblent jouer un rôle central dans la formation des corps apoptotiques puisque l'inhibition des caspases par un agent pharmacologique empêche la transition vers l'étape de condensation et maintient les cellules dans un état de bouillonnement membranaire (McCarthy *et al*, 1997, Hirata *et*

al, 1998). Selon Mills *et al* (1999) la fonction des caspases durant cette phase est probablement de limiter le bouillonnement membranaire et de mener à la formation de corps apoptotiques. La dégradation du cytosquelette d'actine par les caspases mettrait fin au bouillonnement membranaire, selon le modèle proposé par Mills (1999) (Figure IV), parce que la force centripète exercée en sous-cortical disparaîtrait, l'anneau d'actine étant digéré.

De façon intéressante, les transglutaminases, des enzymes impliquées dans la formation de liaisons protéines-protéines, sont activées dans certaines lignées cellulaires durant la phase de condensation et pourraient avoir un rôle à jouer dans la formation des corps apoptotiques (Fesus, 1993).

4. Régulation de l'apoptose.

L'apoptose peut être initiée par une grande variété de stimuli qui, généralement, mènent à l'activation de l'une ou l'autre des grandes voies de signalisation apoptotique : la voie mitochondrie-dépendante et la voie dépendante des récepteurs à domaine de mort. Ces deux voies partagent plusieurs caractéristiques en ce sens qu'elles induisent l'activation des caspases soit par recrutement, oligomérisation ou via une cascade d'activation protéolytique. Cependant, ceci mis à part, ces deux voies répondent à des stimuli apoptotiques qui sont essentiellement de natures différentes.

4.1. La voie intrinsèque.

La voie apoptotique intrinsèque ou mitochondriale, agit en quelque sorte comme un senseur de dommages intracellulaires qui répond à des signaux comme des altérations de l'ADN, des désordres métaboliques ou encore des désordres de l'équilibre ionique intracellulaire. Avec le recrutement du

cytochrome *c*, du facteur Apaf-1 et de la procaspase-9, un complexe macromoléculaire est formé (l'apoptosome). Ce complexe entraîne l'activation de la caspase-3 et la mort cellulaire. L'activation de cette voie est influencée grandement par les facteurs pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, qui sont contrôlés par les facteurs de croissance, la PI3K et Akt (Korsmeyer, 1999).

4.1.1. p53.

Lors de dommages à l'ADN, comme par exemple suite à l'exposition à des radiations ionisantes, des dommages à l'ADN sont créés (bris simple ou double bris) les niveaux intracellulaires de p53 augmentent. La protéine p53, une fois activée, augmente les niveaux cellulaires de Bax et diminue les niveaux de Bcl-2, favorisant ainsi les facteurs pro-apoptotiques mitochondriaux et la mort cellulaire par l'entremise de l'activation de l'apoptosome.

4.1.2. Déprivation en facteur de croissance et altération du pH intracellulaire.

La liaison de facteur de croissance à leur récepteur permet entre autre, de maintenir la survie cellulaire en stimulant l'échangeur Na^+/H^+ et en permettant de maintenir le milieu acido-basique intracellulaire à des niveaux compatibles avec la survie. Lorsqu'il se produit un dérèglement au niveau du pH, l'apoptose est facilitée. La caspase-3, qui est résistante à l'activation par oligomérisation, est maintenue dans un état inhibé par un tripeptide régulateur. Il a été suggéré que l'acidification du pH qui se produit lorsque l'on déprime les cellules en facteur de croissance contribue à l'activation de certaines caspases en brisant les interactions ioniques entre le tripeptide inhibiteur et la caspase favorisant ainsi l'activation de cette caspase (Roy *et al*, 2001).

4.2. La voie extrinsèque.

L'apoptose dans le système immunitaire est un processus qui requiert la sélection positive et négative de population de cellules. La mort par apoptose est un processus essentiel à la fonction de la population lymphocytaire, comme l'est la différenciation et la prolifération. L'oligomérisation des récepteurs à domaine de mort dont fait partie le récepteur Fas (CD95) mène au recrutement de la protéine adaptatrice FADD puis au recrutement de la procaspase-8 et à son activation. La caspase-8 active par la suite la caspase-3 et clive la protéine Bid. La protéine t-Bid (forme tronquée de Bid) se relocalise à la mitochondrie où elle facilite l'expulsion du cytochrome c dans le cytosol en stimulant la formation de pores membranaire mitochondriaux (Hengartner, 2000). Les voies apoptotiques mitochondrie-dépendantes et indépendantes sont donc activées dans la voie extrinsèque, et agissent de façon synergique pour mener à complétion le programme de mort cellulaire (Krammer, 2001) (Figure III).

5. L'échangeur Na^+/H^+ .

L'échangeur Na^+/H^+ est une protéine exprimée de façon ubiquitaire qui catalyse l'échange d'un proton vers l'espace extracellulaire pour un ion Na^+ vers l'intérieur de la cellule. La fonction de cet échangeur est essentiellement de maintenir le pH intracellulaire et de contrôler le volume cellulaire (Noel et Pouyssegur, 1995). Cet échangeur, toujours actif dans des conditions physiologiques, peut être activé ou inhibé par divers stimuli. Parmi ses activateurs on retrouve des hormones, des agents mitogéniques ainsi que des protéines de la matrice extracellulaire. Certains agents pharmacologiques ont la capacité d'inhiber cet échangeur, tel les dérivés de l'amiloride (l'EIPA par exemple). Ces agents empêchent la sortie de protons par l'échangeur-canal et

entraînent une acidification du pH intracellulaire. Les voies de signalisation menant à l'activation de l'échangeur restent encore mal caractérisées. Cependant, il a été montré que la protéine G Rho de même que sa kinase ROCK sont impliqués dans la régulation de l'activité de cet échangeur dans des phénomènes touchant la réorganisation du cytosquelette d'actine. (Tominaga *et al*, 1998).

6. Objectifs de travail.

Le but de ce travail est d'élucider les voies de signalisation qui, du signal apoptotique, mènent à la réorganisation du cytosquelette et aux interactions actine-myosine responsables du bouillonnement membranaire. Jusqu'à ce jour, aucune voie de signalisation indépendante des caspases n'a été impliquée directement dans le processus de bouillonnement membranaire. Cependant, quelques études laissent à penser que de telles voies pourraient être impliquées dans le bouillonnement membranaire. Les évidences montrant que des phénomènes de phosphorylation impliquant la chaîne légère de la myosine sont impliqués dans le bouillonnement membranaire, nous amènent à croire que certaines voies de signalisation dépendantes de kinases puissent être impliquées dans les phénomènes membranaires durant l'apoptose. Nous pensons que des voies dépendantes de la GTPase Rho, une petite protéine G peuvent être impliquées dans le bouillonnement membranaire étant donné que cette protéine est connue pour réguler certains phénomènes de motilité cellulaire. De plus, cette protéine a pour effecteur la protéine kinase ROCK, une kinase qui phosphoryle la MLC. En développant un système cellulaire nous permettant d'étudier l'apoptose dans un cadre où les voies apoptotiques caspase-dépendantes sont inhibées, nous pouvons cibler ces voies et les étudier plus en détail. (Voir hypothèse de travail : Figure VI).

Les personnes suivantes ont contribué à la réalisation de ce travail :

Delphine Désy pour la rédaction du manuscrit, les tableaux 2 et 3 et les figures 5, 6 et 7, Suk-Ran Yoon pour le tableau 1 et les figures 2, 3, 4A et B, le Dr Julio R. Caceres-Cortes pour les figures 1C, 4C, André Haman pour les figures 1A et B.

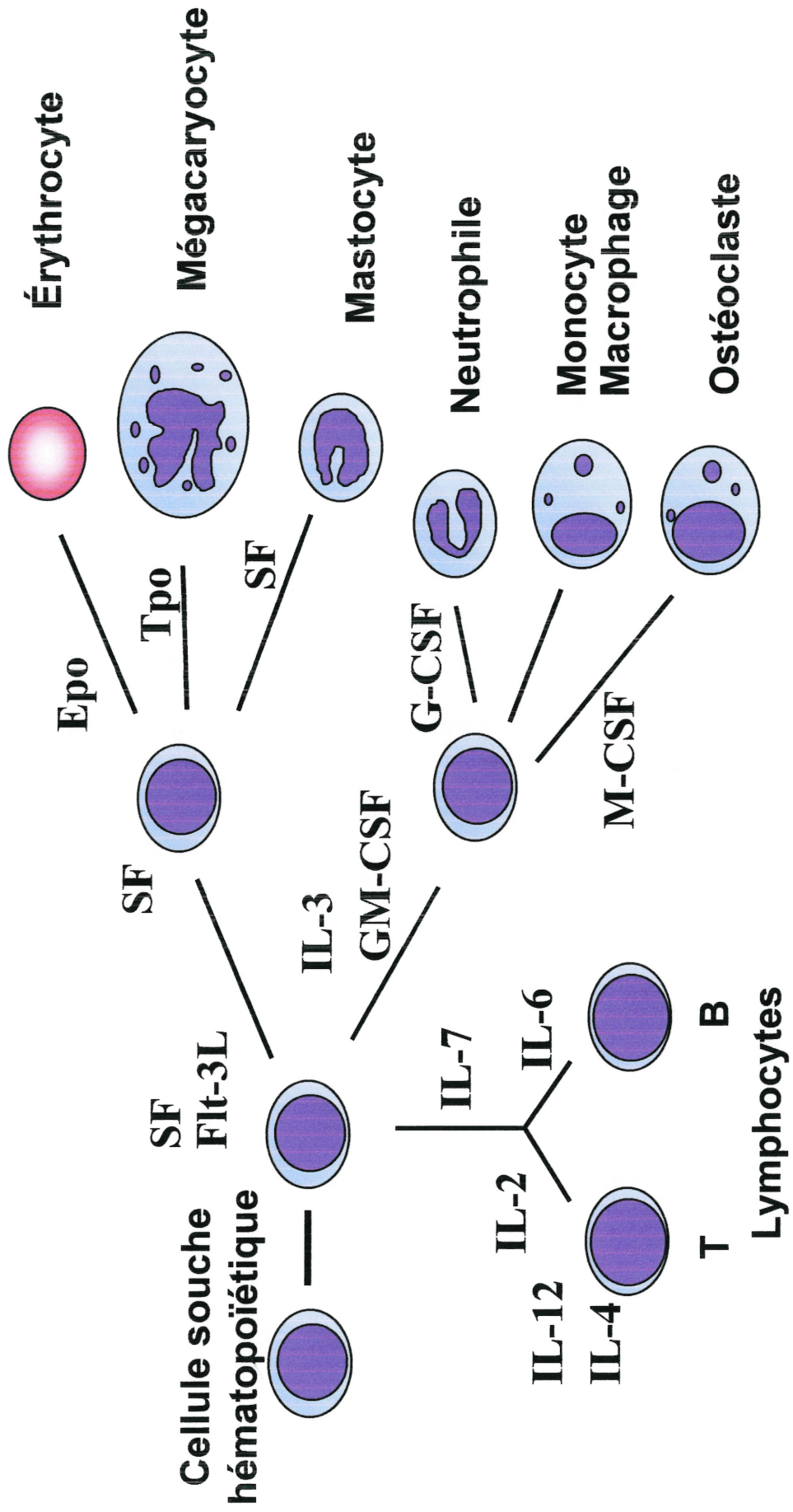
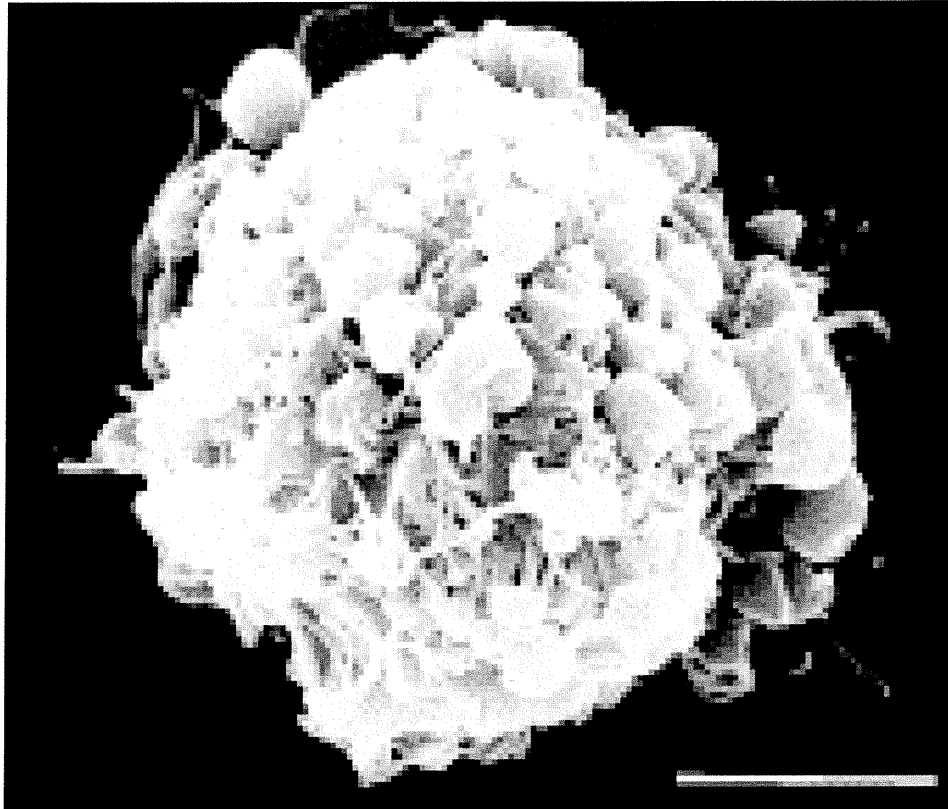
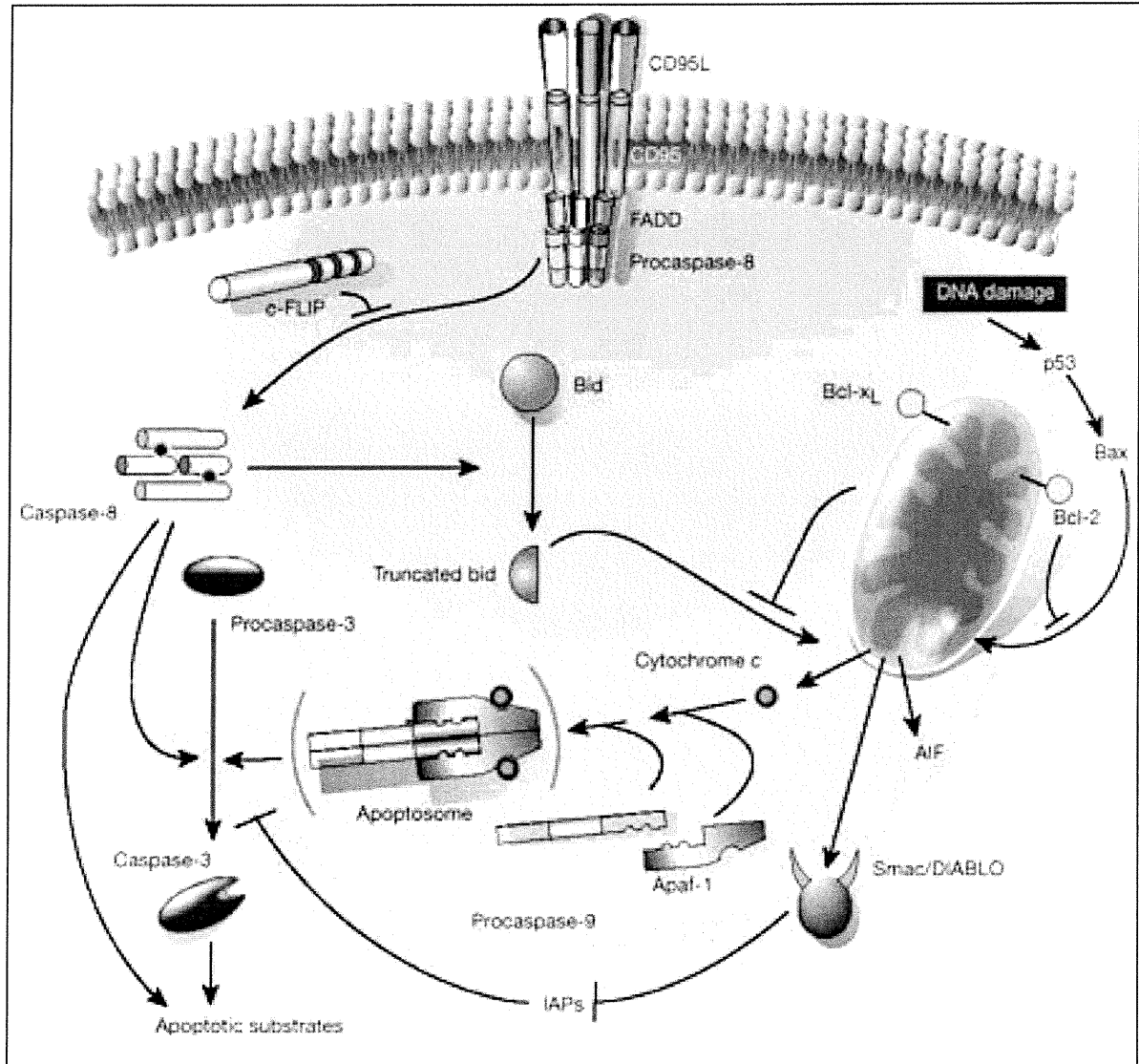


FIGURE I



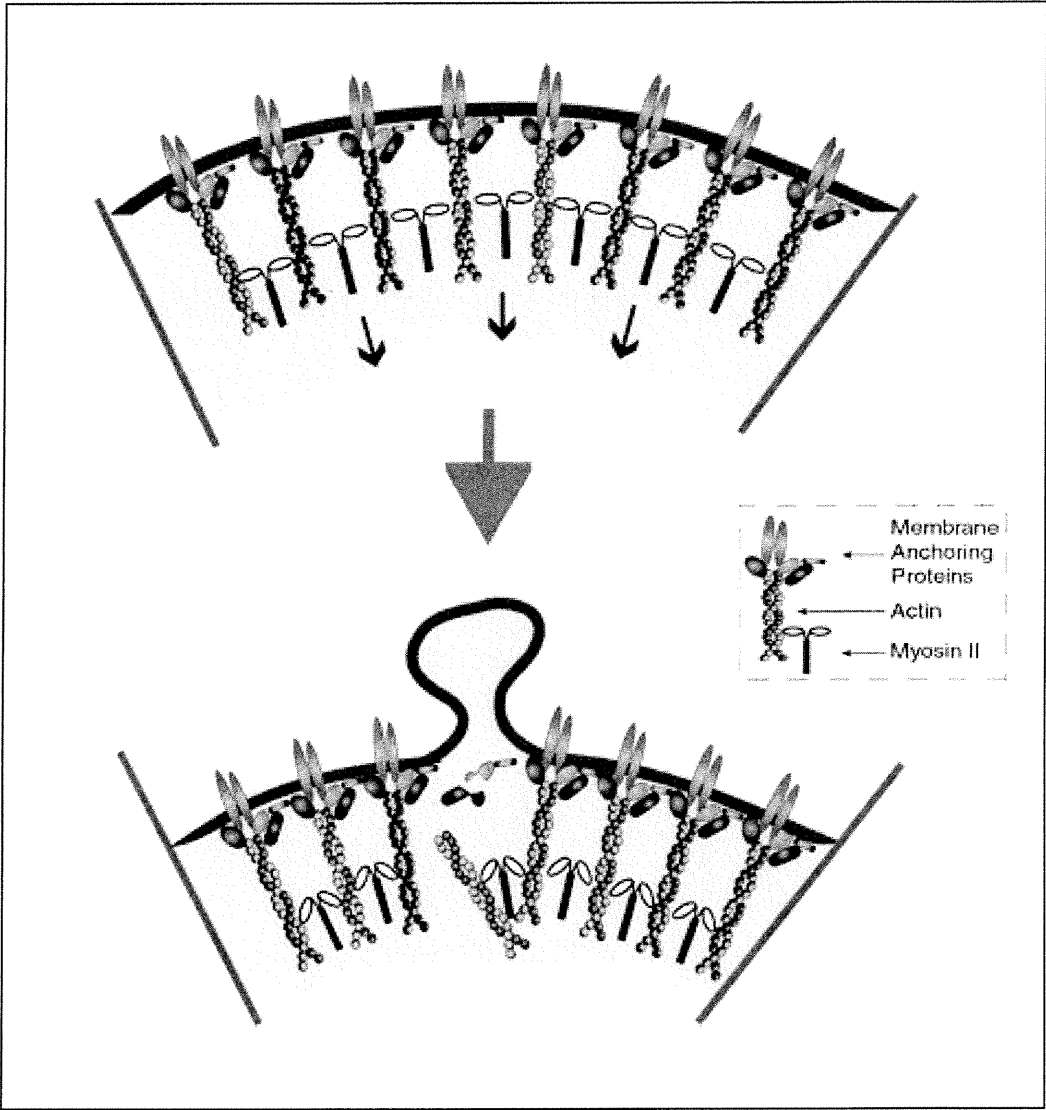
Coleman *et al*, 2001

FIGURE II



Hengartner, 2000

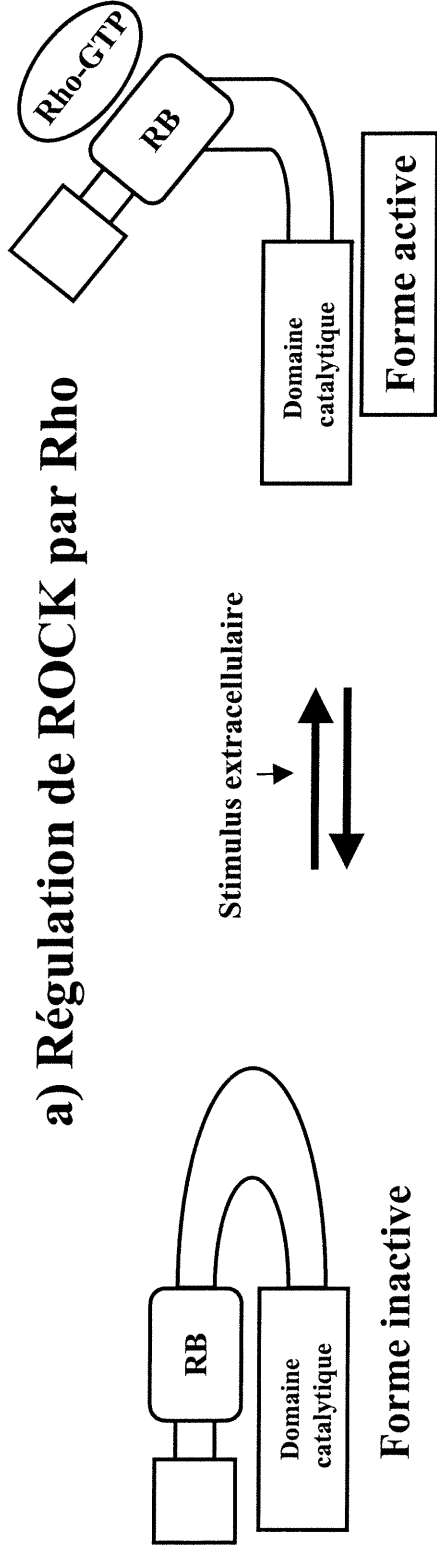
FIGURE III



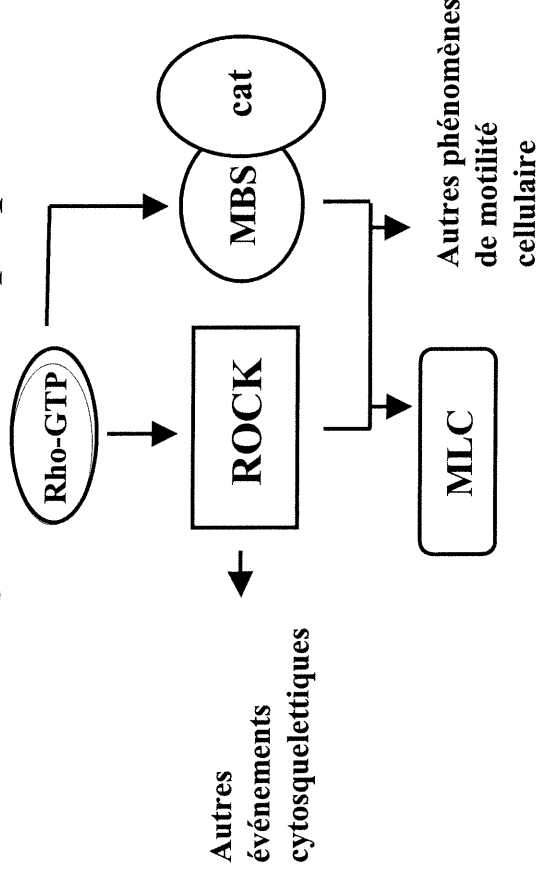
Mills *et al*, 1999

FIGURE IV

a) Régulation de ROCK par Rho



b) Voies de signalisation impliquant ROCK



Cat : sous-unité catalytique de la phosphatase, MBS : sous-unité liant la myosine de la phosphatase, RB : domaine de liaison à Rho

FIGURE V

Hypothèse : Existence d'une voie dépendante de Rho dans le phénomène de bouillonnement membranaire

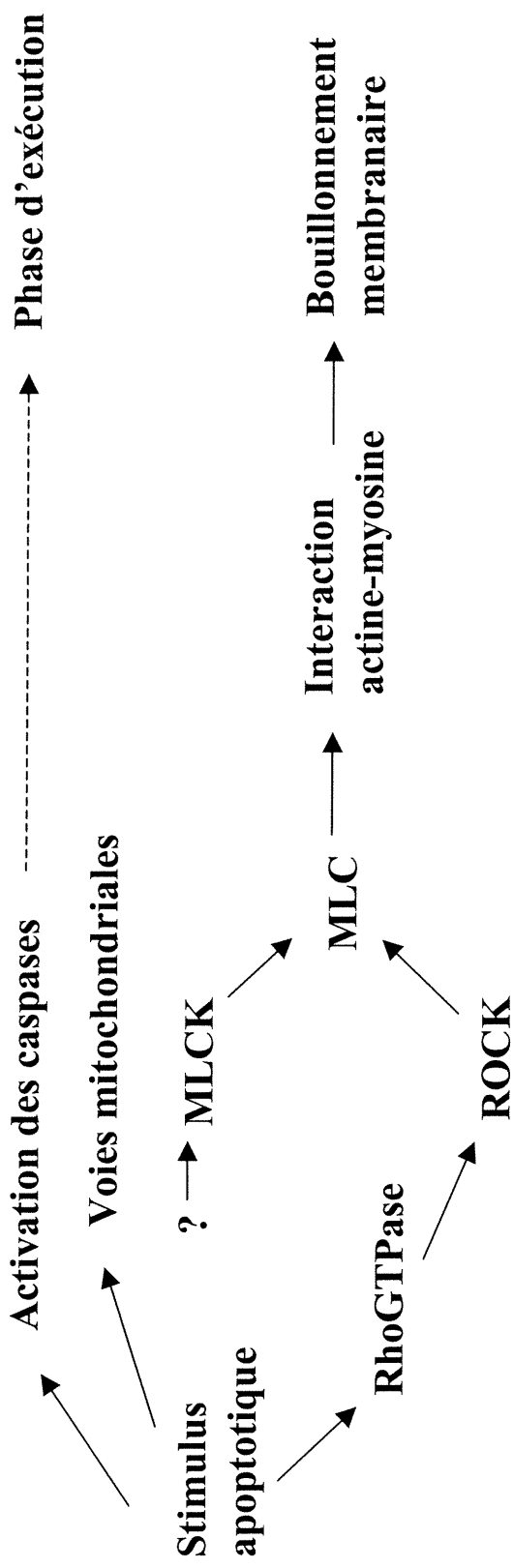


FIGURE VI

CHAPITRE 2

PRÉSENTATION DU MANUSCRIT

**Kinase-dependent signalling pathways involved in membrane
blebbing during apoptosis.**

Delphine Désy, Suk-Ran Yoon, Julio R. Caceres-Cortes,
André Haman, Trang Hoang

From the Clinical Research Institute of Montreal, The Program of Molecular
Biology, University of Montreal.

This work was funded by a grant from the Canadian Institute for Health
Research (T.H.). D.D. is supported by a studentship from The Quebec Health
Research Foundation (FRSQ-FCAR), S.-R. Y., a studentship from The Korean
Research Institute of Biotechnology (KRIB) and J.R.C.-C., a scholarship from
The Council for National Research (CNR).

Correspondence to:
Trang Hoang, PhD
Laboratory of Hemopoiesis and Leukemia
Clinical Research Institute of Montreal
110 Pine West, Montreal H2W 1R7
Canada
Email: [REDACTED]
Fax: (514) 987-5513

SUMMARY

The execution phase of apoptosis is characterized by specific morphological and biochemical changes that include cell contraction, condensation of chromatin and membrane blebbing. While pathways regulating chromatin condensation and DNA cleavage are well understood, the mechanisms underlying membrane blebbing remain elusive. Contractile forces are thought to be involved in the process of membrane blebbing and apoptotic bodies formation. The actin-myosin system has been proposed to be the source of the contractile force that drives bleb formation and the shedding of apoptotic bodies. In this study, an experimental model is described in which membrane blebbing is induced in the absence of caspase-3 activity, and in the absence of mitochondrial membrane depolarisation, in TF-1 cells. We provide evidence that early signaling events leading to membrane blebbing requires ROCK-kinase activity and requires protein prenylation. This experimental model allowed us to identify a caspase-independent pathway that contributes to membrane blebbing and that involves ROCK, an effector of Rho.

INTRODUCTION

Apoptosis is a form of cell death characterized by a number of biochemical and morphological changes, including cell contraction, membrane blebbing, activation of caspases, loss of mitochondrial potential and nuclear events like chromatin condensation and DNA laddering (for a review see Hengartner, 2000). Despite the fact that membrane blebbing is one of the earliest morphological characteristics of apoptosis, little is known about the mechanisms underlying it. It has been proposed that contractile forces generated by actin-myosin cytoskeletal are implicated in the formation of membrane blebs and apoptotic bodies (Mills *et al*, 1998a, Mills *et al*, 1999), yet, the intracellular pathways leading to those cytoskeletal events are still unknown.

During the execution phase of apoptosis, a family of intracellular proteases, the caspases, is activated, resulting in proteolytic cleavage of a variety of substrates, some of which are cytoskeletal components, that include actin, fodrin and gelsolin (Earnshaw *et al*, 1999). Very often, proteins are inactivated or lose their function as a result of cleavage by caspase, as in the case of the cytoskeletal proteins. However, in the case of kinases their proteolytic cleavage can produce a constitutively active fragment. It has been shown that the caspase-dependent cleavage of p21-activated kinase (PAK-2) a kinase implicated in cytoskeletal rearrangement, leads to the generation of a constitutively active form of PAK-2 that induces cell condensation and rounding, two characteristics of adherent cells committing apoptotic cell suicide (Rudel and Bokoch, 1997, Lee *et al*, 1997). Nonetheless, by cleaving a large spectrum of proteins, it is thought that the activation of caspases leads to the shutdown of the cell survival programs and turns on cell disassembly.

Unexpectedly, some previous studies have shown that membrane blebbing can be an apoptotic process that is not dependent on caspase activation: McCarthy

et al (1997) and Mills *et al* (1998a) both reported membrane blebbing in cell lines after inhibition of caspases by inhibitory peptides and induction of apoptosis. In contrast, hepatocytes from caspase-3-deficient mice do not exhibit membrane blebbing when triggered with Fas ligand (Zheng *et al*, 1998). Hence, the requirement in caspase activation for membrane blebbing remains to be documented.

ABP, an actin binding protein, and F actin have been directly linked to cytoskeletal reorganization and membrane blebbing. Tumor cells lacking ABP, presents extensive membrane blebbing under normal culture conditions (Cunningham *et al*, 1992). Also, F actin has been shown to be present at the base of blebs and to be necessary for membrane blebbing (Cotter *et al*, 1992, Laster, 1996).

Apoptotic blebs are devoid of organelles (Laster *et al*, 1996), therefore, it has been proposed that the formation of blebs is dependent on cytoskeletal rearrangements. It has been proposed that a myosin dependent contraction of the sub-cortical actin ring creates a centripetal force that leads to cellular contraction and to an increase in cytoplasmic pressure, causing blebs to protrude. Interestingly, caspase-mediated cleavage of the sub-cortical layer of actin would contribute to membrane blebbing by creating weakened zones at the plasma membrane, facilitating blebs formation (Mills *et al*, 1999, Torgerson *et al*, 1998).

Most interestingly, it has recently been shown that MLC phosphorylation is essential for membrane blebbing and been suggested that MLCK and Rho GTPase, through its interaction with the kinase ROCK-I, are key regulators of membrane blebbing during apoptosis (Mills *et al*, 1998a). Through interaction with actin, the myosin filaments, which contain the catalytic subunit MLC, are involved in many forms of cell motility. Non-muscle myosin (myosin II) is involved in cellular processes such as maintenance of the subcortical actin

cytoskeleton, secretion of vesicles or cytokinesis. Myosin II contractile activity is regulated by phosphorylation of MLC which catalyzes the interaction between the myosin head and the actin filament, leading to the formation of a sliding force between the two filaments through the ATPase activity of the myosin head. Phosphorylation of MLC is mediated by MLCK, a Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase, and is regulated by MLC phosphatase (Kohama *et al*, 1996, Alessi *et al*, 1992).

Rho GTPases are intracellular proteins, member of the Ras superfamily, that are regulators of the actin cytoskeleton (Bar-Sagi and Hall, 2000). Rho GTPases also stimulates Rho kinase (ROCK) a serine/threonine kinase playing a role in stabilization of filamentous actin and coupling of actin-myosin filaments to the plasma membrane. Rho kinase has also been shown to phosphorylate MLC on the same residue as MLCK, an event also leading to increased actin-myosin force generation and cell contractility.

Recently, it has been shown that one of the two isoforms of Rho-dependant kinase, ROCK-I, is directly involved in membrane blebbing. Sebbagh *et al* (2001) and Coleman *et al* (2001) both reported that ROCK-I, which contributes to phosphorylation of myosin light chains and coupling of actin-myosin filaments to the plasma membrane, is cleaved by caspase-3 during apoptosis to generate a constitutively active truncated form. Moreover they show that this constitutively active form is sufficient for formation of membrane blebs during apoptosis.

Together, these observations suggest the existence of a signaling pathway responding to an apoptotic signal, leading to cytoskeletal events and membrane blebbing. To assess the existence of such pathways, we developed a cellular model in which it is possible to rapidly induce membrane blebbing without concurrent activation of a caspase, by using an amiloride derivative (EIPA). We also used a Bcl-2 transfectant cell line to prevent loss of

mitochondrial potential and release of cytochrome *c*, a pathway leading to activation of caspases. With this experimental model, we thus bypassed the two major apoptotic pathways leading to early caspase activation, permitting us to study early signaling pathways involved in membrane blebbing.

In this report, we provide evidence that membrane blebbing is a caspase-independent process that requires phosphorylation and protein prenylation. Finally, our results suggest the existence of a new caspase-3-independent pathway in membrane blebbing that converges on ROCK.

MATERIALS AND METHODS

Reagents.

Staurosporine, a potent, cell permeable, and broad-spectrum inhibitor of protein kinases (Couldwell, W.T., *et al*, 1994), was purchased from Kyowa Hakko (U.S.A., NY).

PD 98059, a selective and cell-permeable inhibitor of MAP kinase kinase (MEK) (Langlois, W.J., 1995), was purchased from Calbiochem (La Jolla, CA).

H-7, broad-based cell permeable serine/threonine kinase inhibitor (Jarvis, W.D., 1994) was purchased from Calbiochem.

ML-7, a cell permeable, potent and selective inhibitor of myosin light chain kinase ($IC_{50}=300$ nM), PKA ($IC_{50}=21\mu M$) and PKC ($IC_{50}=42\mu M$), (Krarup, T., 1998), was purchased from Calbiochem.

Chaetomelic Acid A, a potent inhibitor of farnesyltransferase (Gibbs, J.B., *et al*, 1993), was purchased from Calbiochem.

Ftase I Inhibitor, a potent cell-permeable inhibitor of farnesyltransferase (Ftase) that is more active against FTase than GGTase. (Garcia, A.M., *et al*, 1993), was purchased from Calbiochem.

Y-27632, a highly potent, cell-permeable and selective inhibitor of Rho-associated protein kinases ($IC_{50}=140$ nM for p160ROCK) (Chitaley, K., *et al*, 2001), was purchased from Calbiochem.

The amiloride analog 5-(*N*-ethyl-*N*-isopropyl)amiloride was synthesized by a previously described method (Cragoe *et al*, 1967), dissolved in DMSO and stored in the dark.

Cell Lines and growth factors.

The TF-1 cell line was derived from the blast cells of a patient with erythroleukemia (Kitamura *et al*, 1989) and was a gift from Dr. T. Kitamura (DNAX, Palo Alto, CA). The cells were maintained in IMDM (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) supplemented with 10% FCS (GIBCO BRL) and 5 ng/ml human GM-CSF. The cells were passaged every second day at 1.5×10^5 /ml. Bcl-2 transfectants of the TF-1 cell line (TF-1/Bcl-2) were obtained as described by Krosl *et al* (1998).

Recombinant human GM-CSF was prepared by transfection into SV40 transformed African green monkey kidney cells (COS) as described previously (Rajotte *et al*, 1992).

Annexin V Assay.

Apoptosis was assessed by flow cytometry analysis of cell labeled with Annexin V-FITC (1 μ g/ml), shown previously to be an early marker of apoptosis (Koopman *et al*, 1994; Martin *et al*, 1995). Immediately before acquisition, propidium iodide was added PI was added to the cells at a final concentration of 10 μ g/ml in order to detect dead cells.

TUNEL Reaction.

TF-1 cells were analyzed for apoptosis using a quantitative DNA fragmentation assay, the terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) mediated dUTP-biotin

nick end labeling (TUNEL) reaction (Sgonc *et al*, 1994). Briefly, cells were fixed with formaldehyde for 5 min at room temperature and permeabilized with 0.1% Triton X-100, 0.1% sodium citrate at 4°C for 2min. Cells were then incubated for 1 hour at 37°C with 0.3 nmol biotin-16-dUTP (Boehringer-Mannheim GmbH; Mannheim, Germany), 3 nmol dATP (Pharmacia; Uppsala, Sweden), 20 U TdT (Pharmacia) in TdT buffer (GIBCO) in a total reaction volume of 50 µL. The reaction was stopped by the addition of 0.5 M EDTA. DNA from apoptotic cells that contained free 3'-hydroxy ends was labeled by the TdT with biotinylated dUTP, which was revealed then with streptavidin-FITC (Amersham; Buckinghamshire, England). After washing, the cells were resuspended in PBS for flow cytometry analysis with the FACScan® flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA). Ten thousand events were analyzed for each sample.

Caspase-3 Assay.

Caspase-3 activity in TF-1 cells was assessed by using a caspase-3 assay kit, according to the manufacturers instructions. (Pharmingen, San Diego, CA). Cellular lysates were prepared as previously described (Mancini *et al*, 1998).

Mitochondrial potential measurement.

Mitochondrial potential was evaluated using a modified protocol from Castedo *et al* (1995). Briefly, cells were incubated at 2×10^6 cells/ml in PBS without serum containing 40nM 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide (DiOC₆[3]) (Molecular Probes, Eugene, OR) for 15 min at 37°C. The cells were washed, resuspended in PBS, and left at 37°C for 30 min. PI was added to the cells at a final concentration of 10µg/ml before analysis on a Coulter XL flow cytometer (Coulter Electronics, Montreal, Quebec, Canada). DiOC₆[3] and PI were detected at 525 and 670 nm, respectively.

Intracellular pH measurement.

pH measurement was determined using the fluorescent probe bis(carboxyethyl)carboxyfluorescein (BCECF) (Molecular Probes, Eugene, OR) (Tsien *et al*, 1982). Calibration was performed by using a reference curve at various pH values. Cells were loaded for 30 min at 37°C with 10 μ M BCECF in sodium-Hepes buffer (145 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.8 MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂, 25 mM Hepes, 10 mM glucose). After washing, the cells were introduced in a thermostated cuvette, and the pH-sensitive fluorescence was recorded continuously at 37°C. The ratio of the 530 nm fluorescence signals obtained at 500 nm (pH sensitive) and 450 nm (isosbestic) excitation wavelength allowed the calculation of pH that is independent on cell number and dye concentration.

Inhibitor assays.

TB-1 cells were washed with fresh media and deprived of hGM-CSF for 24 h. Cells were plated at 200,000/ml in 2 ml non-adherent Petri dishes. After 24h, cells were pre-treated for 30 min with an inhibitor and incubated at 37°C. After 30 min 30 μ M EIPA was added to the culture or an equivalent volume of the vehicle, DMSO. Cells were incubated for an additional 2 hours. After 2 hours, cells were analyzed by optic microscopy (Leica, Wetzlar, Germany).

The effect of Staurosporine, ML-7, H7, PD98059, Chaetomelic acid A, Ftase I inhibitor and Y-27632 on membrane blebbing was assessed by counting and scoring cells according to obvious membrane blebbing. Four different fields were counted per Petri dish, for a total of about 200 cells.

RESULTS

EIPA treatment of TF-1/Bcl-2 induces the apoptotic features of membrane blebbing and membrane flip-flop without measurable caspase-3 activity.

EIPA or 5-(*N*-ethyl-*N*-isopropyl)amiloride is a specific inhibitor of the Na⁺/H⁺ antiporter localized at the plasma membrane. The Na⁺/H⁺ antiporter regulates the intracellular pH by keeping pH values at physiological levels. Inhibition of the Na⁺/H⁺ exchanger by EIPA results in a lowering of intracellular pH of about 0.5 unit and induces apoptosis (Rajotte *et al*, 1992, Caceres-Cortes *et al*, 1994) (Table 1).

Data shown in Figure 1 indicate that both GM-CSF withdrawal and EIPA treatment induce membrane blebbing and intracellular pH acidification (Table 1) in TF-1 and TF-1/Bcl-2 cell lines. In the case of GM-CSF withdrawal, however, membrane blebbing occurs only after 12 hours, whereas EIPA induces membrane blebbing already after 20 minutes of exposure. This particularity of EIPA to induce membrane blebbing as an early event generates a more synchronous population of cells extruding membrane blebs, while that induced by growth factor deprivation presents substantial asynchronicity, as cells usually start to bleb in a large time gap that ranges from 12 to 24 hours. (Note: All data in this study were statistically analyzed by performing *t*-test and were shown to be statistically significant.)

In order to assess whether or not membrane blebbing is associated with phosphatidylserine exteriorization, we compared the kinetics of Annexin V labeling to that of membrane blebs. Annexin V specifically detects phosphatidylserine residues at the plasma membrane. In survival conditions, no phosphatidylserine residues can be detected on the extracellular leaflet of the plasma membrane (Figure 1C). During apoptotic death, loss of the normal

asymmetry develops as phosphatidylserine residues can be detected on the extracellular leaflet.

The onset of Annexin V labeling occurs at 24 h after growth factor withdrawal, and is substantially delayed when compared to the onset of membrane blebbing, which takes place at 12 h (Figure 1B and C). Similarly, EIPA induces Annexin V labeling at 6 h only (Figure 1C), whereas membrane blebbing was detectable within 20 min of exposure (Figure 1B). Finally, Annexin V labeling induced by GM-CSF withdrawal, but not EIPA exposure, was transiently inhibited by ectopic Bcl-2 expression (Figure 1C, right panel).

We next monitored Annexin V labeling in cells exposed to increasing concentration of EIPA. As illustrated in Figure 2, a concentration of 20 μM of EIPA was sufficient to induce apoptosis in TF-1 cells maintained with GM-CSF whereas most of Bcl-2 transfectants were viable. When EIPA concentrations were raised to 30 μM , however, both parental TF-1 cells and Bcl-2 transfectants were all Annexin V positive. Hence, kinetic analysis and EIPA titration identify experimental conditions that dissociate membrane flip-flop from membrane blebbing.

Bcl-2, an anti-apoptotic protein, is known to suppress apoptosis by preventing pore formation at the mitochondrial level. The creation of those pores, results in cytochrome *c* relocalization to the cytoplasm, an event leading to caspase activation and apoptotic cell death. (Gross *et al*, 1999). Those pores disturb the finely tuned ion equilibrium that normally exists in the mitochondria and that is necessary to energy production by the cell. When apoptosis is induced by EIPA in TF-1 cells, as in Figure 3, mitochondrial potential is lost as a result of pore formation at the level of the mitochondria level. In contrast, Bcl-2 overexpression in TF-1 cells prevents loss of mitochondrial potential, at least for 24 hours. Consequently, Bcl-2 prevents caspase-9 activation by cytochrome *c* and allows us to study early apoptotic events that are triggered by EIPA.

Using this model, we know that membrane blebbing induced by EIPA in TF-1/Bcl-2 cells is not dependent on the mitochondrial apoptotic pathways, at least for the first few hours following EIPA addition to the cells.

Striking results were obtained when we measured caspase-3 activity (Figure 4B). Growth factor deprivation induces high levels of caspase-3 as expected. Despite a clear increase in Annexin V staining (Figure 4A) in response to increasing doses of EIPA and obvious membrane blebbing (Figure 1) in response to EIPA treatment in both TF-1 and TF-1/Bcl-2 cell lines, we did not detect any significant caspase-3 activity in those cell lines in response to apoptotic cell death induction by EIPA. Together, these data strongly suggest that the initial stages of membrane blebbing are independent of caspase-3. In parallel, detection of CAD(caspase-activated DNase)-mediated DNA breaks was performed by the TUNEL reaction (see Materials and Methods for details). The TUNEL reaction reveals a very slight increase in DNA degradation in response to EIPA in TF-1 cells in sharp contrast with the high proportion of Annexin V positive cells (Figure 4A) and blebbing cells (Figure 1). Furthermore, there was no significant increase in DNA degradation in response to EIPA in TF-1/Bcl-2 cells. Together, these results indicate that membrane blebbing is not dependent on caspase activity, consistent with previous results (Mills *et al*, 1998a).

Kinase inhibitors STS, H7 and ML-7 inhibit or decrease membrane blebbing, as does Chaetomelic Acid A, an inhibitor of geranylgeranyltransferase and farnesyltransferase.

A previous report has shown that membrane blebbing depends on phosphorylation events, and particularly, on MLC (myosin light chain) phosphorylation (Mills *et al*, 1998a). In order to address the question whether phosphorylation events were also involved in membrane blebbing induced by

EIPA inhibition of the Na^+/H^+ exchanger, cells were treated with a panel of kinase inhibitors that were chosen according to their specificities. Staurosporine is a wide spectrum kinase inhibitor. Membrane blebbing in response to EIPA treatment is completely inhibited by a 2.1 μM STS treatment, decreasing from 25% to zero. Normally occurring membrane blebbing (normal basal level of membrane blebbing that occurs in TF-1 cells cultures which is usually 5 to 10%) is also totally inhibited by Staurosporine. In comparison, PD98059, an inhibitor of MAPK did not affect membrane blebbing in TF-1/Bcl-2 cells treated by EIPA or not (Panel B). These results indicate that pathways involved in membrane blebbing are dependent of phosphorylation events but independent of mitogen-activated kinases.

We next tested two other kinase inhibitors, H7 and ML-7 (Figure 6). H7 inhibits the activities of MLCK, PKA, PKC and PKG, whereas ML-7 is a selective inhibitor of MLCK. As observed with Staurosporine, H7 strongly inhibits membrane blebbing even at the lowest dose tested. In order to narrow down the kinases involved we next tested ML-7. Unlike H7, membrane blebbing was decreased only by half even at the highest concentration of ML-7. Furthermore, maximal inhibition of membrane blebbing is observed with 100 nM of ML-7. Given that the IC_{50} of ML-7 for MLCK is 300 nM and considering that a strong inhibition of membrane blebbing (50% decrease) is achieved with doses of ML-7 as low as 100 nM, we surmised that another kinase might be involved in membrane blebbing. Also, as shown in Table 2, some inhibitors, ML-7 and H7 inhibits spontaneous membrane blebbing.

RhoGTPase, a protein regulating membrane reorganization and cell motility has been shown to be involved in membrane blebbing (Mills *et al*, 1998a). In order to test whether pathways that regulate membrane blebbing involve protein prenylation at CAAX motifs, we examined the effect of Ftase I inhibitor and Chaetomelic acid A. Ftase I inhibitor, a specific inhibitor of farnesyltransferase, has no effect on spontaneous membrane blebbing nor on

EIPA induced membrane blebbing (data not shown). In comparison, Chaetomelic acid A, an inhibitor of geranylgeranyltransferase and farnesyltransferase induces a dose-dependent decrease in membrane blebbing in cells treated with EIPA (Figure 6). These results suggest that a protein which is modified by prenylation is involved in EIPA-induced membrane blebbing.

Y-27632, a specific ROCK inhibitor, suppresses membrane blebbing.

Results obtained with inhibitors of kinases and Chaetomelic Acid A implicate regulation of membrane blebbing by a kinase, other than MLCK and which activity is affected by a prenylation inhibitor. ROCK is a known regulator of MLC contractile activity (see above and Amano *et al*, 1996, Kimura *et al*, 1996, Kureishi *et al*, 1997) and is regulated by RhoA, a GTPase that is farnesylated when activated (Bishop *et al*, 2000).

ROCK-I a kinase effector of Rho that can phosphorylate the myosin light chain has been involved in membrane blebbing. A constitutively active form of the enzyme is produced during apoptosis as a consequence of caspase-3 cleavage. (Coleman *et al*, 2001, Sebbagh *et al*, 2001). In order to determine whether the pathway leading to membrane blebbing in our experimental model converged on ROCK, we then tested Y-27632, a potent and highly specific inhibitor of ROCK. Data shown in Figure 7 and Table 3 indicate that Y-27632 is a strong inhibitor of membrane blebbing in response to EIPA. Pre-treatment with Y-27632 is sufficient to abolish membrane blebbing induced by EIPA. Our results are therefore consistent with the view that ROCK is a major regulator of membrane blebbing in apoptosis.

DISCUSSION

Apoptosis is a physiological process defined by conserved morphological and biochemical changes including cell contraction, membrane blebbing, phosphatidylserine externalization, DNA laddering, chromatin condensation and the formation of apoptotic bodies. These morphological events distinguish apoptosis from other types of cell death. Bcl-2 prevents caspase activation and DNA cleavage, and has been shown to prevent apoptosis following growth factor withdrawal. The cells eventually die, though membrane blebbing, confirming that the regulation of membrane integrity is a critical aspect of growth factor-dependent cell survival (Mills *et al*, 1998a).

Phosphorylation of MLC is necessary for the formation of dynamic membrane protrusions which are observed at the onset of apoptosis (Mills *et al*, 1998a). Two kinases have been involved in MLC phosphorylation during apoptosis: MLCK, the kinase of the myosin light chain (Amano *et al*, 1996), and ROCK-I a serine/threonine kinase, which is an effector of the small Rho GTPase (Kohama *et al*, 1996). Up to this day, only one major pathway leading to MLC phosphorylation has been described (Coleman *et al*, 2001, Sebbagh *et al*, 2001). During apoptosis, following caspase-3 activation, ROCK-I is cleaved to generate a constitutively active fragment by removal of the C-terminal inhibitory domain. ROCK-I then phosphorylates MLC and induces membrane blebbing (Sebbagh *et al*, 2001). The signaling protein Rho has also been involved in membrane blebbing although its effector is unknown (Mills *et al*, 1998a). PAK-2 has also been shown to be activated by caspase-3 during the early phase of apoptosis but how it contributed to membrane blebbing is still unraveled (Rudel and Bokoch, 1997).

In this work, we show that ROCK activity is crucial for membrane blebbing in an experimental model in which caspase-3 activation is suppressed by constitutive Bcl-2 expression. Hence we demonstrate that ROCK can be activated during

apoptosis without being cleaved by caspase-3. Since protein prenylation is required for membrane blebbing, our results strongly suggest that Rho-dependent pathways are activated during the early phase of apoptosis, leading to ROCK activation and membrane blebbing.

There is some controversy regarding the relative contribution of caspases to membrane blebbing. In some caspase-3 deficient models, no blebbing occurs following apoptosis induction (Zheng *et al*, Janicke *et al*, 1998). In other cases, membrane blebbing is not affected by caspase inhibition (Mills *et al*, 1998a, Huot *et al*, 1998, McCarthy *et al*, 1997). Prior to bleb formation, adherent cells detaches from the ECM and undergo changes in shape that leads to cell rounding (Huot *et al*, 1998), similar to the modifications induced by Rho (Hall, 1998). In some experimental models, inhibition of Rho by C3 exotoxin prevents membrane blebbing, suggesting that Rho effectors are involved in membrane blebbing, in a Rho-dependent manner. (Mills *et al*, 1998a). Our results indicate that a Rho-dependent pathway can activate ROCK under experimental conditions where caspase-3 activity is suppressed. Thus, depending on the cell type, ROCK may control membrane blebbing either as a result of sustained Rho activation or after cleavage by caspase-3.

REFERENCES

- Alessi, D., MacDougall, L.K., Sola, M.M., Ikebe, M., 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. *European Journal of Biochemistry* 210 : 1023-1035.
- Bar-Sagi, D., Hall, A., (2000), Ras and Rho GTPases : A family reunion. *Cell* 103 : 227-238.
- Bishop, A.L., Hall, A., (2000), Rho GTPases and their effector proteins, *Biochemical Journal* 348 : 241-255.
- Burns, J.C., Friedmann, T., Driever, W., Burrascano, M., Yee, J.K., (1993), Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: Concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and non mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 90: 8033-8037.
- Caceres-Cortes, J., Rajotte, D., Dumouchel, J., Haddad, P., Hoang, T., (1994), Product of the steel locus suppresses apoptosis in hemopoietic cells. Comparison with pathways activated by granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *Journal of Biological Chemistry*. 269 :12084-91.
- Castedo, M., Macho, A., Zamzami, N., Hirsch, T., Marchetti, P., Kroemer, G., (1995), Mitochondrial perturbations define lymphocytes undergoing apoptotic depletion in vivo. *European Journal of Immunology* 25 : 3277-3282.
- Chitale, K., Wingard, C.J., Clinton Webb, R., Branam, H., Stopper, V.S., Lewis, R.W., Mills, T.M., (2001), Antagonism of Rho-kinase stimulates rat penile erection via a nitric oxide-independent pathway. *Nature Medicine* 7 : 119-22.
- Coleman, M.L., Sahai, E.A., Yeo, M., Bosch, M., Dewar, A., Olson, M.F., (2001), Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK-I. *Nature Cell Biology* 3 : 339-345.
- Cotter, T.G., Lennon, S.V., Glynn, J.M., Green, D.R., (1992), Microfilaments-disrupting agents prevent the formation of apoptotic bodies in tumor cells undergoing apoptosis. *Cancer Research* 52 : 997-1005.
- Couldwell, W.T., Hinton, D.R., He, S., Chen, T.C., Sebat, I., Weiss, M.H., Law, R.E., (1994), Protein kinase C inhibitors induce apoptosis in human malignant glioma cell lines. *FEBS Letters* 345 :43-6.

Cragoe, E.J., Jr., Woltersdorf, O.W., Jr., Bicking J.B., Kwong, S.F., Jones, J.H., (1967), *Journal of Medical Chemistry* 10: 66-75.

Cunningham, C.C., Gorlin, J.B., Kwatkowski, D.J., Hartwig, J.H., Janmey, P.A., Byers, R., Stossel, T.P., (1992), Actin-binding protein requirement for cortical stability and efficient locomotion. *Science* 255 : 325-327.

Earnshaw, W.C., Martins, L.M., Kaufmann, S.H., (1999), Mammalian caspases : Structure, activation, substrates, and functions during apoptosis, *Annual Review of Biochemistry* 68 : 383-424.

Garcia, A.M., Rowell, C., Ackermann, K., Kowalczyk, J.J., Lewis, M.D., (1993), Peptidomimetic inhibitors of Ras farnesylation and function in whole cells. *Journal of Biological Chemistry* 268 :18415-8.

Gibbs, J.B., Pompliano, D.L., Mosser, S.D., Rands, E., Lingham, R.B., Singh, S.B., Scolnick, E.M., Kohl, N.E., Oliff, A., (1993), Selective inhibition of farnesyl-protein transferase blocks ras processing in vivo. *Journal of Biological Chemistry* 268 : 7617-20.

Gross, A., McDonnell, J.M., Korsmeyer, S.J., (1999), BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes and Development* 13 : 1899-1911.

Hawley, R.G., Fong, A.Z., Lu, M., Hawley, T.S., (1994), The Hox-11 homeobox-containing gene of human leukemia immortalizes murine hematopoietic precursors. *Oncogene* 9: 1-12

Hengartner, M.O., (2000), The biochemistry of apoptosis, *Nature* 40 : 770-776.

Huot, J., Houle, F., Rousseau, S., Deschesnes, R.G., Shah, G.M., Landry, J., (1998), SAPK2/p38-dependant F-actin reorganisation regulates early membrane blebbing during stress-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 143 : 1361-1373.

Janicke, R., Ng, U., Sprengart, M.L., Porter, A.G., (1998), Caspase-3 is required for alpha-fodrin cleavage but dispensable for cleavage of other substrates in apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 273 : 15540-15545.

Jarvis, W.D., Turner, A.J., Povirk, L.F., Traylor, R.S., Grant, S., (1994), Induction of apoptotic DNA fragmentation and cell death in HL-60 human promyelocytic leukemia cells by pharmacological inhibitors of protein kinase C. *Cancer Research* 54 :1707-14.

Kimura, K., et al, (1996), Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* 273: 245-248.

Kitamura, T., Tange, T., Terasawa, T., Chiba, S., Kuwaki, T., Miyagawa, K., Piao, Y.F., Miyazono, K., Urabe, A., and Takaku, F. (1989), Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates dependently on GM-CSF, IL-3, or erythropoietin. *Journal of Cell Physiology* 140: 323-334.

Kohama, K., Ye, L.H., Hayakawa, K., Okagaki, T., (1996), Myosin light chain kinase : an actin binding protein that regulates an ATP-dependent interaction with myosin. *Trends in Pharmacological Science* 17 : 284-287.

Koopman, G., Reutelingsperger, C.P., Kuijten, G.A., Keehnen, R.M., Pals, S.T., van Oers M.H., (1994), Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84 : 1415-1420.

Krurup, T., Jakobsen, L.D., Jensen, B.S., Hoffmann, E.K., (1998), Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransport in Ehrlich cells: regulation by protein phosphatases and kinases. *American Journal of Physiology* 275: C239-50.

Krosi, G., He, G., Lefrancois, M., Charron, F., Romeo, P.-H., Jolicoeur, P., Kisch, I., Nemer, M., Hoang, T.,(1998), Transcription factor SCL is required for c-kit expression and c-Kit function in hemopoietic cells. *The Journal of Experimental Medicine* 188 : 439-450.

Kureishi, Y., et al, (1997), Rho-associated kinase directly induces smooth muscle contraction through myosin light chain phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 272 : 12257-12260.

Langlois, W.J., Sasaoka, T., Saltiel, A.R., Olefsky, J.M., (1995), Negative feedback regulation and desensitization of insulin- and epidermal growth factor-stimulated p21ras activation. *Journal of Biological Chemistry* 270 : 25320-3.

Laster, S., M., Mackenzie, J.M., Jr., (1996), Bleb formation and F-actin distribution during mitosis and tumor-necrosis factor-induced apoptosis. *Microscopy Research Techniques* 34 : 272-280.

Lee, N., MacDonald, H., Reinhard, C., Halenbeck, R., Roulston, A., Shi, T., Williams, L.T., (1997), Activation of hPAK65 by caspase cleavage induces some of the morphological and biochemical changes of apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 94 : 13642-13647.

Mancini M, Nicholson DW, Roy S, Thornberry NA, Peterson EP, Casciola-Rosen LA, Rosen A., (1998), The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: implications for apoptotic signaling. *Journal of Cell Biology* 140:1485-95

Martin, S.J., Reutelingsperger, C.P., McGahon A.J., Rader, J.A., van Schie R.C., LaFace, D.M., Green, D.R., (1995), Early redistribution of plasma

membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus : inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *Journal of Experimental Medicine* 182 : 1545-1556.

McCarthy, N.J., Whyte, M.K.B., Gilbert, C.S., Evan, G.I., (1997), Inhibition of Ced-3/ICE-related proteases does not prevent cell death induced by oncogenes, DNA damage or the Bcl-2 homologue Bak, *Journal of Cell Biology* 136 : 215-227.

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

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

Ory, D.S., Neugeboren, B.A., Mulligan, R., (1996), A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93: 11400-11406.

Rajotte D., Haddad P, Haman A et al. (1992), Role of protein kinase C and the Na⁺/H⁺ antiporter in suppression of apoptosis by granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3. *Journal of Biological Chemistry* 267: 9980-9987.

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

Rudel, T., Bokoch, G.M., (1997), Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK-2. *Science* 276 : 1571-1574.

Sebbagh, M., Renvoizé, C., Hamelin, J., Riché, N., Bertoglio, J., Bréard, (2001), Caspase-3-mediated cleavage of ROCK-I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nature Cell Biology* 3 : 346-352.

Sgonc R., Boeck, G., Dietrich, H., et al. (1994), Simultaneous determination of cell surface antigens and apoptosis. *Trends in Genetics* 10 : 41-42.

Torgerson, R.R., McNiven, M.A., (1998), The actin-myosin cytoskeleton mediates reversible agonist-induced membrane blebbing. *Journal of Cell Science* 111 : 2911-2922.

Tsien, R.Y., Pozzan, T., Rink, T.J., (1982), Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator. *Journal of Cell Biology* 94 : 325-334.

Zheng, T.S., *et al*, (1998), Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95: 13618-13623.

Table 1. Caspase-3-independent and mitochondrial-independent cell death

Cells	GM-CSF	EIPA	pH _i	Caspase-3 activity	Annexin V ⁺
TF-1	-	-	6.95	2.933	23%
	+	-	7.5	0.223	1.4%
	+	+	7.07	0.386	22%
TF-1/Bcl-2	-	-	7.0	0.092	2.1%
	-	+	6.99	0.084	26%

Cells were maintained in media containing 200 pM GM-CSF are indicated. Cells were treated with 30 μM EIPA or equivalent volume of DMSO for two hours. pH_i, caspase-3 activity, Annexin V staining were measured as described in Material and Methods.

Table 2. Inhibition of spontaneous membrane blebbing in TF1/Bcl-2 cells by various inhibitors

Treatment	% of blebbing cells \pm SD
No inhibitor	7 \pm 2.1
ML-7	3 \pm 1
H7	0 \pm 0
Chaetomelic Acid A	8 \pm 2
Ftase I	8 \pm 2

24 hours after removal of GM-CSF, TF1/Bcl-2 cells were incubated for two hours with either ML-7 (3 μ M), H7 (300 μ M), Chaetomelic Acid A (600 nM) or Ftase I inhibitor. Cells were analyzed under a light microscope.

Table 3. Inhibition of membrane blebbing in TF1/Bcl-2 cells by Y-27632, a ROCK inhibitor.

Treatment	% of blebbing cells \pm SD
-EIPA	20 \pm 3
+EIPA	4 \pm 1
Y-27632 150 nM	0 \pm 1
Y-27632 500 nM	6 \pm 1

24 hours after removal of GM-CSF, TF1/Bcl-2 cells were incubated with Y-27632 (see Material and Methods protocol for inhibitor assays. About 250 cells were analyzed under a light microscope.

LEGENDS

Figure 1. EIPA induces the apoptotic features of membrane blebbing and phosphatidylserine exposition despite Bcl-2 overexpression in TF-1 cells.

In panel A, exponentially growing TF-1 cells were treated with EIPA 20 μ M for 20 minutes to 48 hours (data shown for 12 h). Control cells were deprived of GM-CSF to induce apoptosis. TF-1/Bcl-2 cells (Bcl-2 transfectants) were deprived of GM-CSF 24h prior to the experiment to assess the effect of EIPA only on membrane blebbing.

Panel B, shows a kinetic of membrane blebbing in response to EIPA. Data were collected at the indicated times and represent the mean \pm SD of three or six distinct fields, as analyzed by optic microscopy.

In panel C, the cells used in panel B were submitted to Annexin V staining as detailed in Materials and Methods. Dead cells were excluded by propidium iodide staining. Phosphatidylserine exposition was measured at various times.

Figure 2. Dose-dependent loss of membrane asymmetrical distribution of phosphatidylserine residues induced by EIPA.

Exponentially growing TF-1 cells were treated with various concentrations of EIPA for 36 hours, labeled with Annexin V (see Materials and Methods) and analyzed by flow cytometry. 10 000 events were acquired for all samples. Dead cells were detected with propidium iodide and not considered for data analysis. Results shown are representative of two independent experiments.

Figure 3. Bcl-2 overexpression prevents loss of mitochondrial potential in response to EIPA.

Flow cytometry analysis of TF-1 and TF-1 transfectants expressing Bcl-2. TF-1 and TF-1 overexpressing Bcl-2 were treated with various concentrations of EIPA for 24 hours and mitochondrial membrane was assessed by flow cytometry analysis of parental TF-1 cells or Bcl-2 transfectants incubated with DiOC₆[3] (40 nM) for 20 min.

Figure 4. EIPA treatment induces neither caspase-3 nor DNA degradation despite high Annexin V staining.

Exponentially growing TF-1 cells and TF-1/Bcl-2 transfectants were treated with increasing concentrations of EIPA (10, 20 and 30 μ M) for 36 hours. Panel A: Percentage of Annexin V labeling in cells that exclude propidium iodide. Panel B: Caspase activity was determined on cell lysates by cleavage of DEVD. Panel C: DNA breaks were revealed by TdT-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) reaction and flow cytometry analysis. Data shown are typical of two or three independent experiments.

Figure 5. Staurosporine inhibits both EIPA-induced membrane blebbing and spontaneous membrane blebbing in TF-1/Bcl-2 cells.

Panel A : TF-1 cells overexpressing Bcl-2 were deprived of growth factor 24 hours, treated with Staurosporine 2.1 μ M for 30 min, then 30 μ M EIPA for an additional two hours. Control cultures were treated with an equivalent volume of DMSO. Cells were then analyzed by light microscopy. About two hundred cells were analyzed in one experiment. Data shown are the average \pm SD of four different fields analyzed in one experiment. Panel B: PD 98059 an inhibitor

an MAPK was tested in parallel on TF-1/Bcl-2 cells, in presence or absence of EIPA.

Figure 6. The kinase inhibitors H7 and ML-7 and the farnesylation inhibitor Chaetomelic Acid A decrease EIPA-induced membrane blebbing in TF-1/Bcl-2 cells.

Panel A: TF-1/Bcl-2 cells were deprived of growth factor 24 hours prior to treatment with the kinase inhibitor H7, an inhibitor of MLCK, PKC, PKA and PKG at the indicated concentrations. Membrane blebbing induced by EIPA was determined as in Figure 5.

Panel B: TF-1/Bcl-2 cells were deprived of growth factor 24 hours prior to treatment with the specific MLCK inhibitor ML-7 at the indicated concentrations. Membrane blebbing induced by EIPA was determined as in Figure 5.

Panel C: TF-1/Bcl-2 cells were deprived of growth factor 24 hours prior to treatment with the farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase inhibitor Chaetomelic Acid A at the indicated concentrations. Membrane blebbing induced by EIPA was determined as in Figure 5.

The percentage of blebbing cells represents the number of obviously blebbing cells divided by the total of cells present in the field analyzed by optic microscopy. About 200 cells were analyzed and the data shown are the average \pm SD of four different fields analyzed in one experiment.

Figure 7. ROCK-I inhibition by Y-27632 strongly inhibits membrane blebbing in TF-1/Bcl-2.

TF-1/Bcl-2 cells were deprived of growth factor 24 hours prior to treatment with 500 nM of Y-27632. Membrane blebbing induced by EIPA was determined as in Figure 5. About 500 cells were analyzed and the data shown are representative of two independent experiments.

The percentage of blebbing cells represents the number of obviously blebbing cells divided by the total of cells present in the field analyzed by optic microscopy. About 200 cells were analyzed and the data shown are the average \pm SD of four different fields analyzed in one experiment.

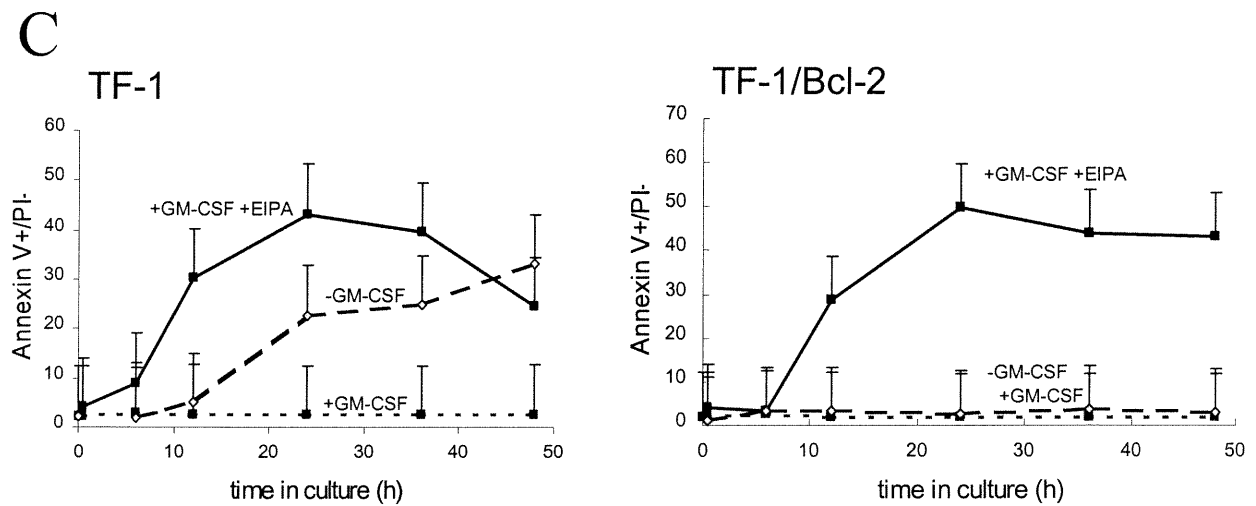
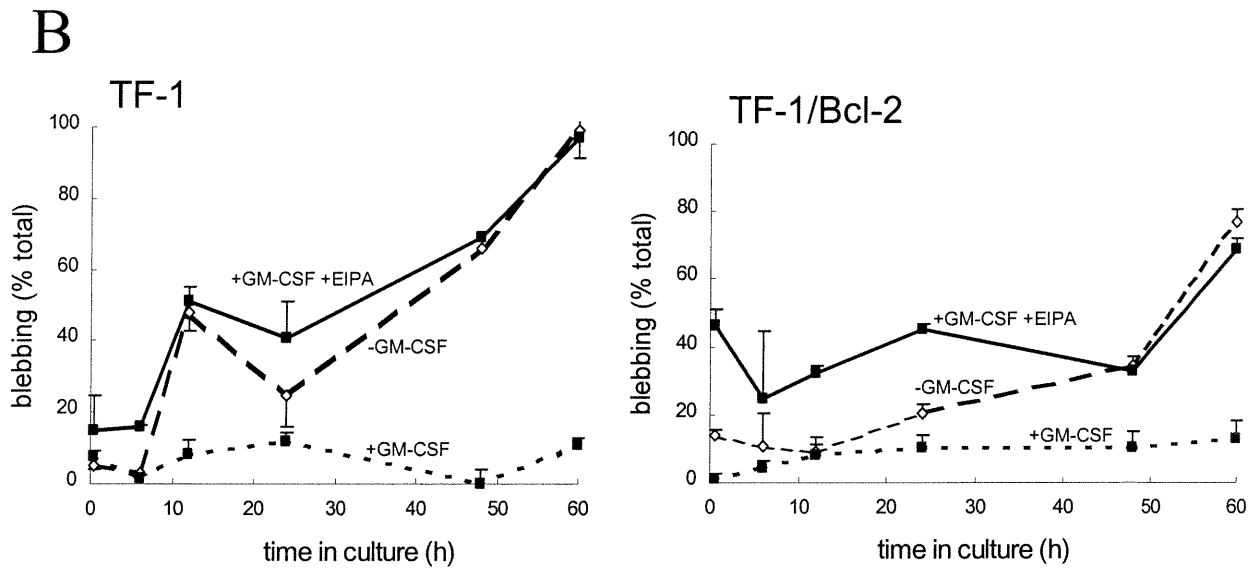
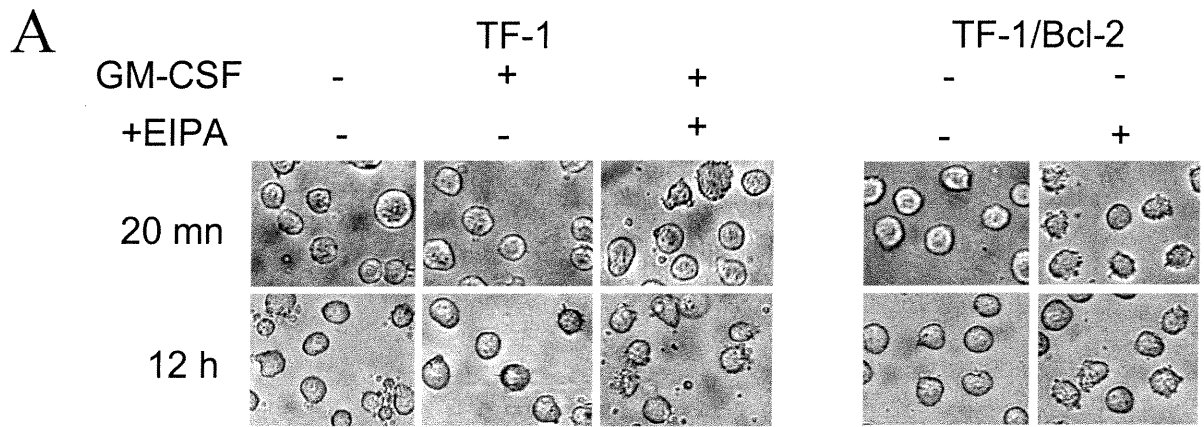


FIGURE 1

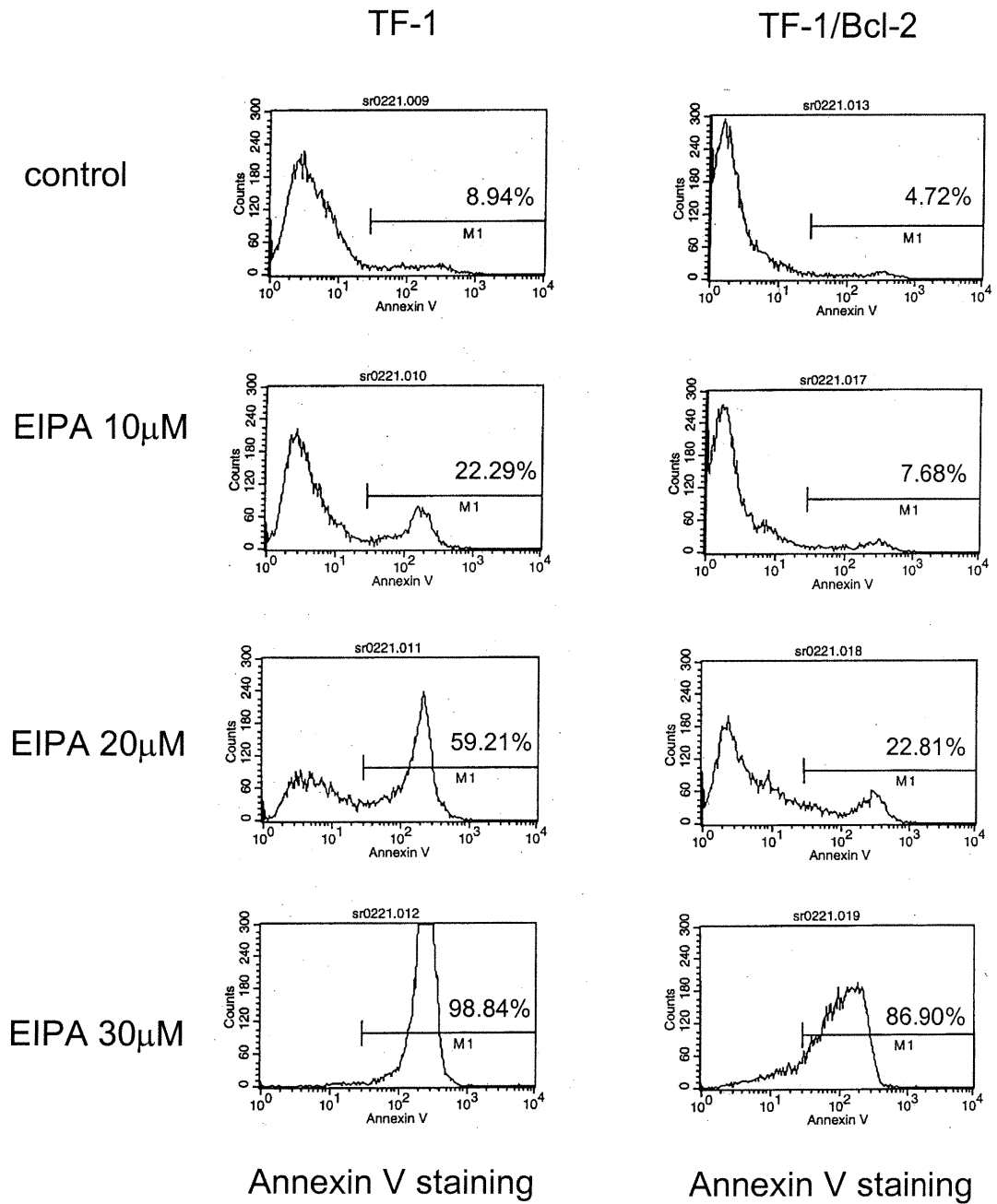


FIGURE 2

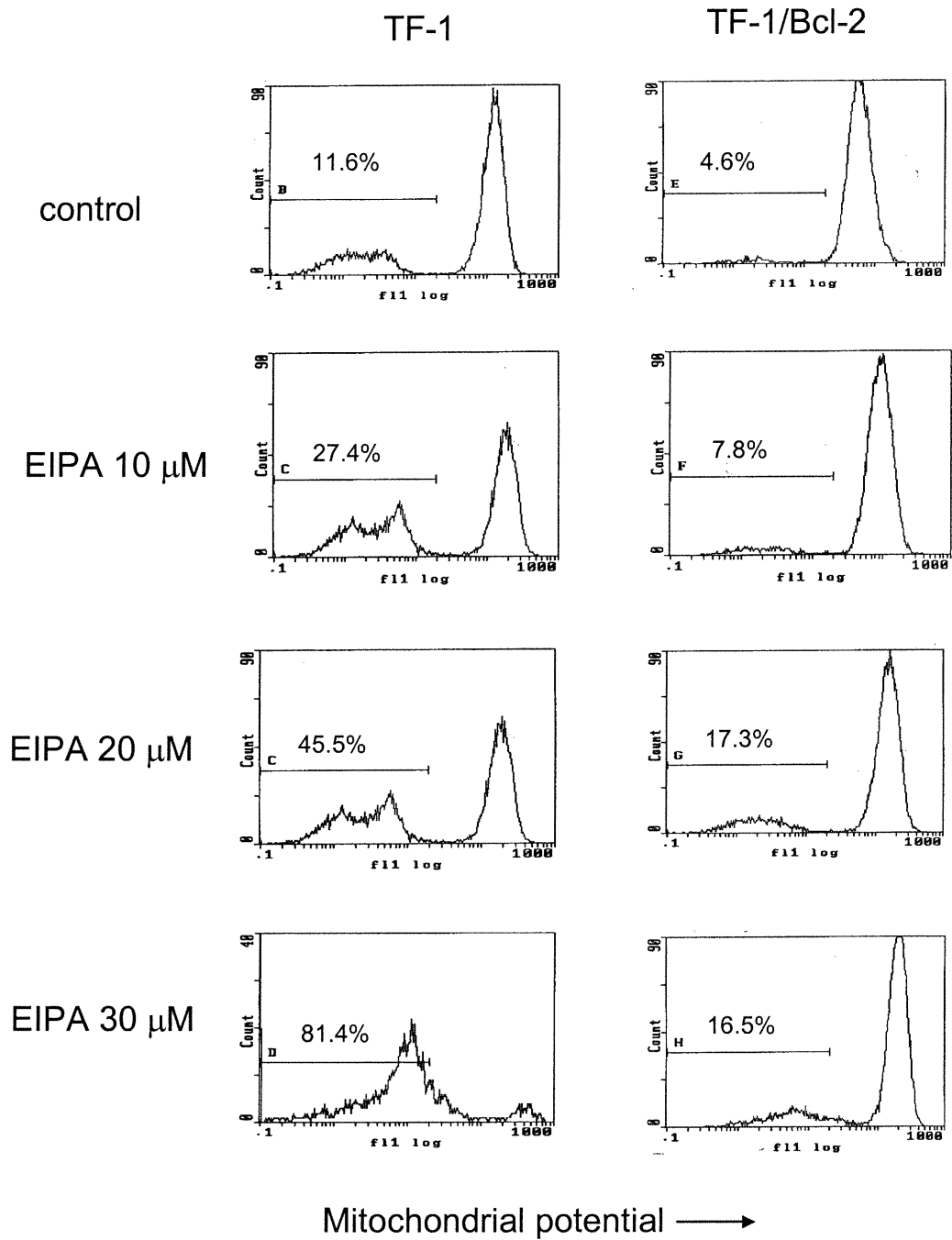


FIGURE 3

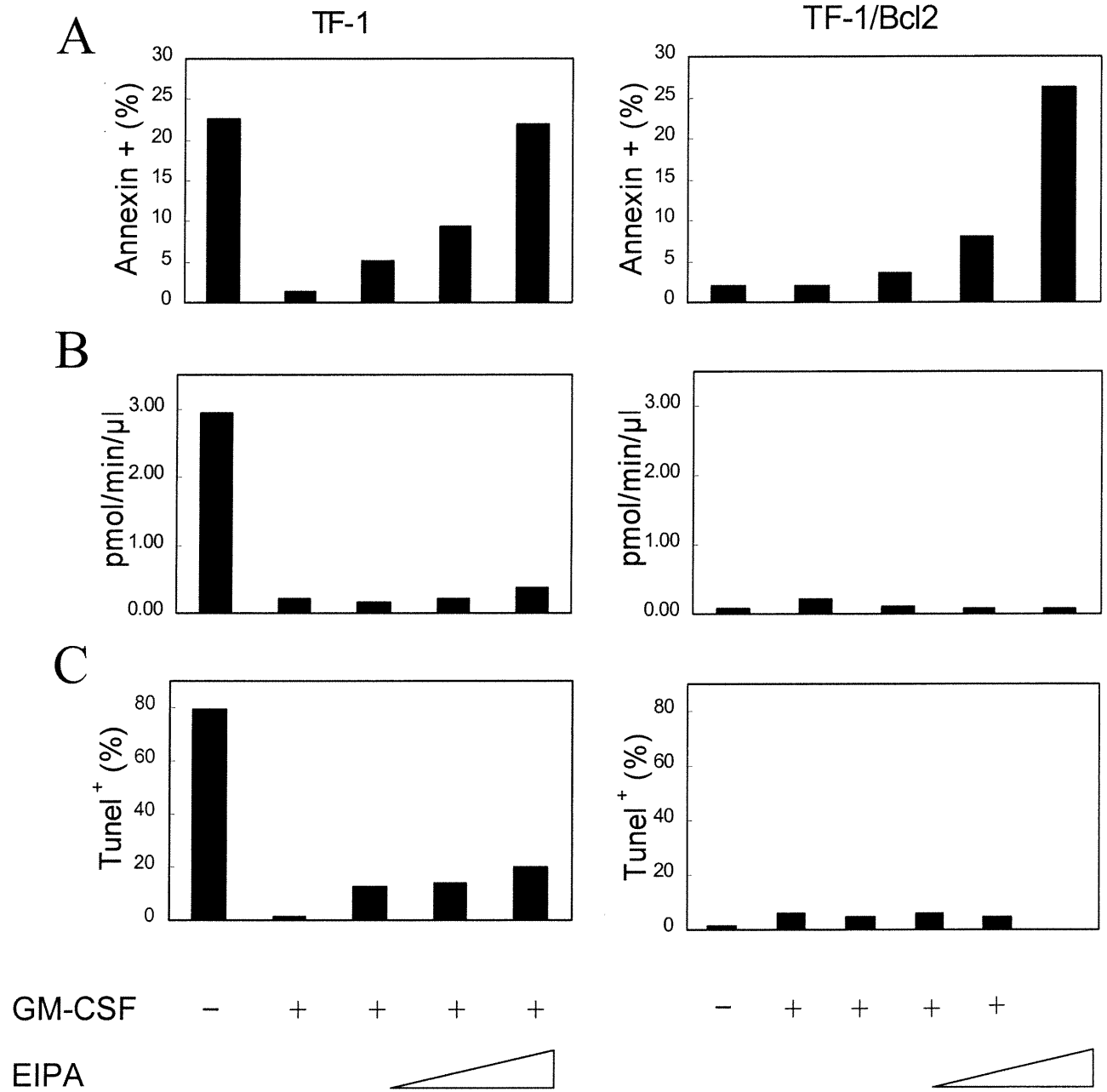


FIGURE 4

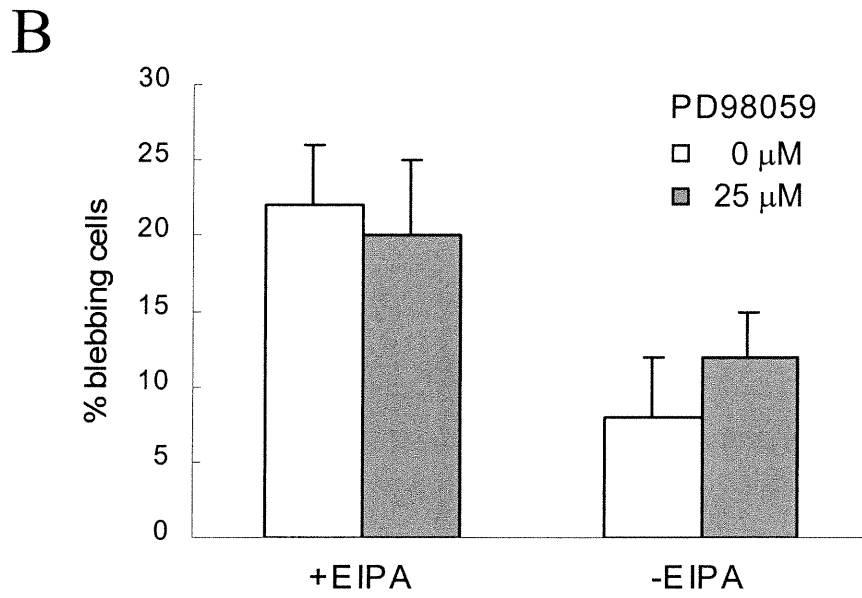
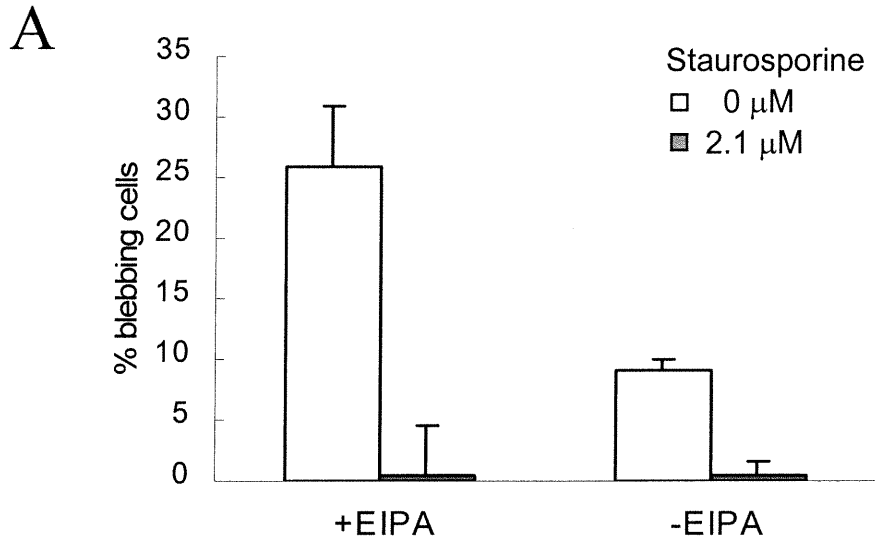


FIGURE 5

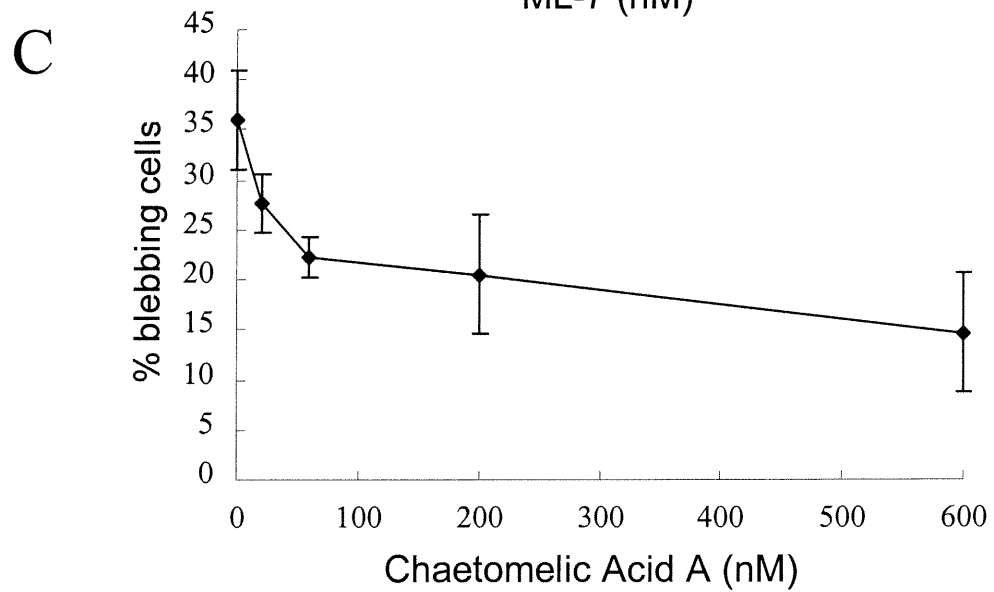
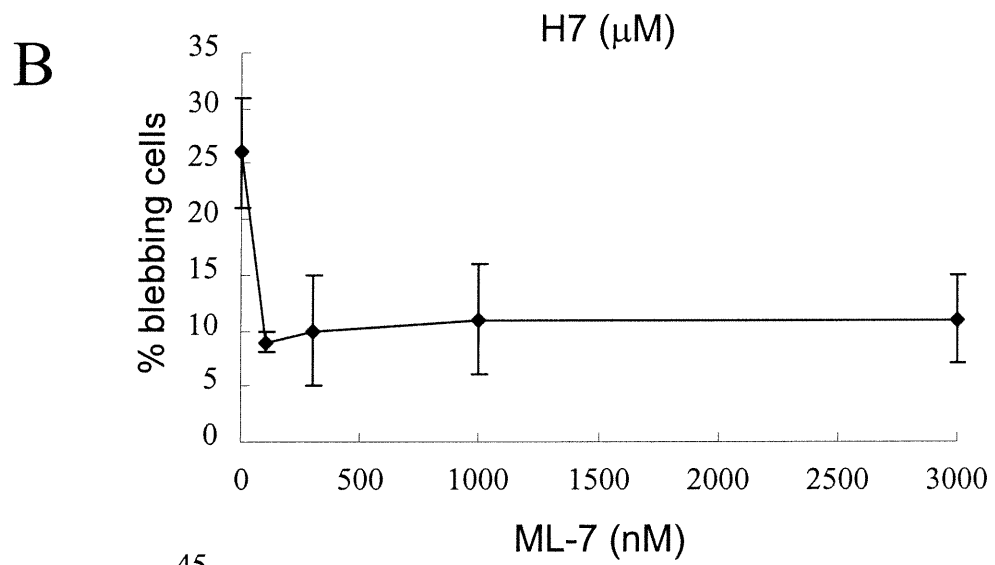
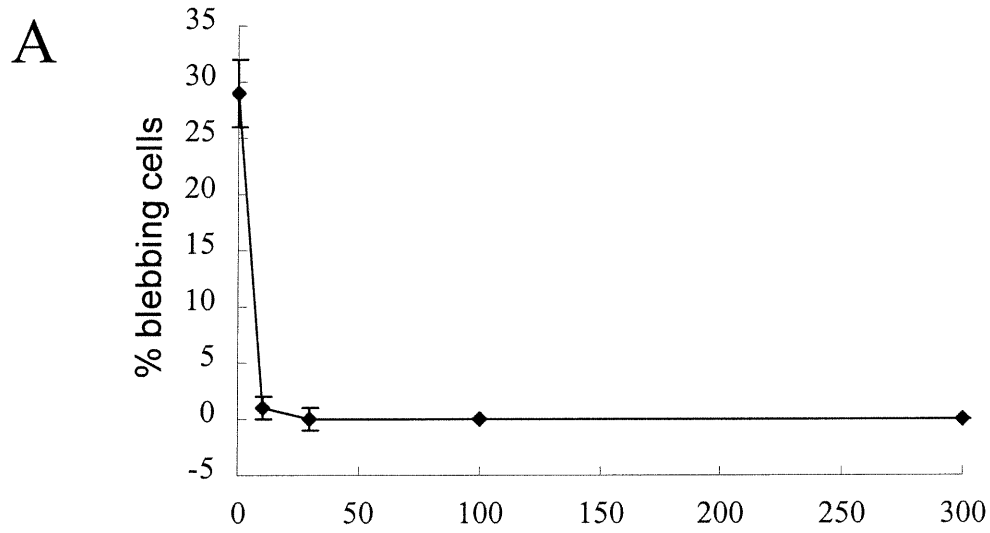
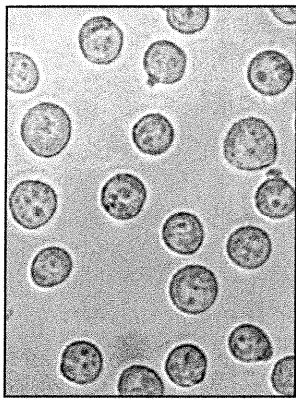
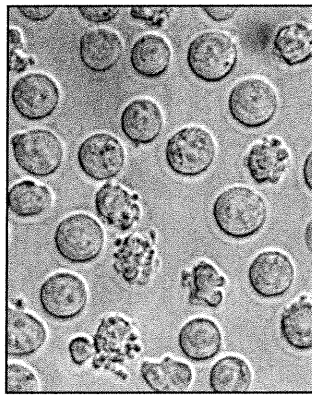


FIGURE 6

- EIPA



+ EIPA



EIPA + Y-27632

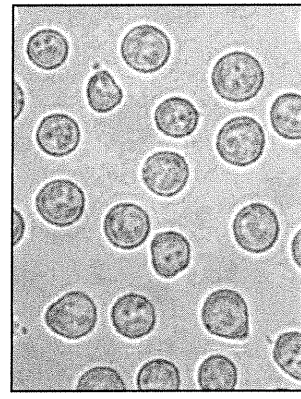


FIGURE 7

CHAPITRE 3

DISCUSSION ET CONCLUSION

L'apoptose est un processus physiologique qui est défini par des modifications morphologiques conservées dans l'évolution incluant la dégradation de l'ADN en fragments nucléosomiaux, la condensation de la chromatine, le bouillonnement membranaire, la contraction de la cellule et la formation de corps apoptotiques. Ces caractéristiques morphologiques distinguent la mort cellulaire par apoptose des autres types de mort cellulaire. Les phénomènes qui accompagnent la mort cellulaire par apoptose sont conservés dans l'évolution; il existe donc nécessairement une pression de sélection sur ces manifestations qui sont probablement essentielles au processus de mort par apoptose. Récemment, quelques équipes ont concentré leurs efforts sur l'élucidation des mécanismes sous-tendants ces phénomènes. Quelques voies de signalisation menant à l'activation de kinases et l'apparition du bouillonnement membranaire ont ainsi été caractérisées (McCarthy *et al*, 1997, Mills *et al*, 1998a, Coleman *et al*, 2001, Sebbagh *et al*, 2001).

ROCK-I est un effecteur de la GTPase Rho. Comme d'autres membres de la famille de Ras (Rac, Cdc42), Rho joue un rôle central dans la régulation de la réorganisation du cytosquelette d'actine (Hall, 1998). Il a été montré par Coleman *et al* (2001) et Sebbagh *et al* (2001) que la kinase ROCK-I est activée lors de l'apoptose par clivage protéolytique de son domaine C-terminal inhibiteur par la caspase-3. La conséquence principale de ce clivage est l'activation dérégulée de la kinase et la phosphorylation de la MLC, ce qui entraîne la formation de boursoflures dans la membrane plasmique.

Une certaine controverse existe quant à l'importance relative de l'activation des caspases dans le bouillonnement membranaire. Dans certains modèles déficients en caspase-3 on n'observe pas de bouillonnement membranaire lors de l'induction de l'apoptose (Zheng *et al*, 1998, Janicke *et al*, 1998), alors que dans d'autres modèles le bouillonnement membranaire n'est pas affecté par l'inhibition des caspases (Mills *et al*, 1998a, Huot *et al*, 1998, McCarthy *et al*,

1997). Avant la phase de bouillonnement membranaire, les cellules se détachent de leur matrice extracellulaire et adoptent une forme sphérique (Huot *et al*, 1998). Ces modifications sont très similaires aux effets de Rho sur le réarrangement du cytosquelette (Hall, 1998). Dans certains modèles expérimentaux, l'inhibition de Rho par l'exotoxine C3 inhibe le bouillonnement membranaire, ce qui suggère que des effecteurs de Rho (probablement la kinase ROCK) sont impliqués dans le bouillonnement membranaire, et ce, en réponse à l'activation de Rho. D'autre part, il a été observé que l'introduction d'une forme active de Rho dans une lignée cellulaire de neuroblastomes entraîne la formation de protrusions membranaires ressemblant à du bouillonnement membranaire (Hirose *et al*, 1998). En résumé, il est probable que ROCK contrôle l'apparition du bouillonnement membranaire, et que, en fonction du type cellulaire, l'activation de ROCK résulte de son clivage protéolytique par la caspase-3 ou d'une stimulation soutenue de la GTPase Rho.

Discussion du modèle expérimental.

Le modèle expérimental que nous avons développé, permet de générer une population de cellules présentant du bouillonnement membranaire de façon rapide et synchrone en réponse à l'inhibition de l'échangeur Na^+/H^+ par l'EIPA. Ce modèle a également comme particularité de dissocier les événements apoptotiques précoces que sont le bouillonnement membranaire et l'externalisation des résidus phosphatidylsérine à la membrane plasmique. Les données que nous avons obtenues nous ont révélé que le bouillonnement membranaire observé dans les deux premières heures suivant l'exposition à l'EIPA est indépendant de l'activité de la caspase-3. De plus, en utilisant une lignée cellulaire de transfectants Bcl-2 nous avons empêché l'activation de voies apoptotiques par la mitochondrie en prévenant la relocalisation du

cytochrome *c* au niveau du cytoplasme. Ceci nous a permis de contrer la formation de l'apoptosome et l'activation subséquente des caspases.

Cette approche, en limitant les voies activées aux voies mitochondrie-indépendantes et caspase-3-indépendantes, nous a permis de disséquer les événements apoptotiques précoces et de mettre en évidence une nouvelle voie régulant le bouillonnement membranaire qui semble impliquer la kinase ROCK-1 et dont l'activation est indépendante de la caspase-3.

Implication d'une nouvelle voie caspase-3-indépendante dans le bouillonnement membranaire.

Les résultats initiaux que nous avons obtenus nous indiquent très clairement que des phénomènes de phosphorylation sont impliqués dans le bouillonnement membranaire. La staurosporine, un inhibiteur à large spectre inhibe complètement le bouillonnement membranaire induit par l'EIPA. H7, un inhibiteur couvrant un spectre plus étroit, supprime lui aussi complètement le bouillonnement membranaire. Toutefois, ML-7, un inhibiteur sélectif de la MLCK inhibe, mais seulement de façon partielle, le bouillonnement membranaire. L'inhibition maximale que nous observons avec ML-7 est atteinte à une valeur de trois fois inférieure au IC_{50} de ML-7 pour la MLCK, ce qui laisse supposer qu'une kinase autre que la MLCK est activée dans notre modèle expérimental de bouillonnement membranaire.

La protéine Rho est connue pour être impliquée dans les phénomènes de réorganisation du cytosquelette. Mills *et al* (1998a) ont rapporté une inhibition du bouillonnement membranaire dans un modèle où les caspases sont maintenues inhibées par un agent pharmacologique (z-VAD-FMK) et que la Rho GTPase est inhibée par l'exotoxine C3 transférase. Afin de tester l'implication possible de la RhoGTPase et de sa kinase effectrice, ROCK, nous

avons utilisé un inhibiteur de modification lipidique, l'acide chaetomelique A. L'acide chaetomelique A est un inhibiteur de farnésyltransférase et de géranylgéranyltransférase, des enzymes impliquées dans la modification post-transcriptionnelle des protéines. La protéine Rho, lorsqu'elle est activée, acquiert une ancre lipidique qui la relocalise à la membrane plasmique, où elle interagit avec ses effecteurs (Hall, 1998). Nos résultats indiquent qu'une protéine modifiée par une ancre farnésyl ou géranylgéranyl est impliquée dans le bouillonnement membranaire. Étant donné les évidences rapportées dans la littérature quant à l'implication possible de la protéine Rho dans le bouillonnement membranaire (Mills *et al*, 1998a) nous avons par la suite utilisé un inhibiteur spécifique de la kinase de Rho (Y-27632) afin d'étudier plus précisément la fonction de Rho et de sa kinase effectrice ROCK dans le bouillonnement membranaire.

L'inhibition de ROCK, la kinase de Rho, par Y-27632 nous indique clairement que ROCK est essentielle au bouillonnement membranaire et que ROCK peut être activée en l'absence d'activité caspase-3. Cependant, comme ces conclusions sont tirées à partir d'expériences effectuées avec des inhibiteurs pharmacologiques nous devons considérer qu'il est possible que ces résultats soient en partie faussés par certaines limitations propres à l'utilisation des inhibiteurs pharmacologiques. Afin de confirmer l'implication de ROCK il existe des approches alternatives très intéressantes tels l'utilisation d'un oligonucléotide antisens ou d'une forme dominant-négative de la kinase ROCK afin d'étudier la perte de fonction spécifique de ROCK dans un modèle cellulaire d'apoptose.

Récemment, il a été démontré que la kinase dépendante de Rho est impliquée dans le bouillonnement membranaire. ROCK, en étant activée directement par la caspase-3. Cette activation protéolytique a pour effet de lever la régulation par la GTPase Rho (Coleman *et al*, 2001, Sebbagh *et al*, 2001). Nos résultats

indiquent que la ROCK peut également être activée par un signal apoptotique sans passer par la caspase-3.

Étant donné la précocité avec laquelle se manifeste le bouillonnement membranaire dans notre modèle, on peut se demander si le bouillonnement membranaire que l'on observe après vingt minutes de traitement à l'EIPA représente une des premières étapes d'un processus apoptotique qui s'enclenche, ou bien résulte d'une activation plus ou moins directe de la kinase ROCK-I. En effet, certaines études montrent que le bouillonnement membranaire peut être un phénomène indépendant de l'apoptose (l'introduction d'une forme tronquée constitutivement active de ROCK engendre du bouillonnement membranaire sans apoptose (Coleman *et al*, 2001)), Chose intéressante, il a été montré que ROCK régule l'activité de l'échangeur Na^+/H^+ en altérant son niveau de phosphorylation (Tominaga *et al*, 1998). Jusqu'à ce jour, aucune étude n'a démontré l'existence d'un mécanisme de rétro-contrôle entre l'échangeur Na^+/H^+ et ROCK-I où la modification de l'activité de l'échangeur aurait pour effet d'activer ou d'inhiber ROCK-I. Cependant, nos résultats suggèrent l'existence d'une telle boucle. Il est possible qu'une inhibition de l'échangeur Na^+/H^+ puisse entraîner une rétro-activation de ROCK, dans le but physiologique de contrer l'acidification du pH intracellulaire et que l'activation de ROCK-I ait pour effet d'engendrer du bouillonnement membranaire. Afin de savoir si ROCK-I est impliqué dans ce phénomène précoce de bouillonnement membranaire il pourrait être intéressant de mesurer l'activité kinase ROCK-I après vingt minutes de traitement à l'EIPA. De plus, il pourrait être intéressant de mesurer les niveaux de phosphorylation de l'échangeur Na^+/H^+ dans ces mêmes conditions.

Proposition d'un modèle théorique.

Un résumé des données que nous avons obtenues est présenté à la Figure VI. Un stimulus apoptotique (par exemple : déprivation en facteur de croissance) active différentes voies de signalisation qui mènent à la mort par apoptose et à la constellation de phénomènes qui la caractérise : dégradation de l'ADN en fragments nucléosomiaux, condensation de la chromatine, bouillonnement membranaire... L'EIPA, un inhibiteur de l'échangeur Na^+/H^+ , a été utilisé comme stimulus apoptotique car il n'entraîne pas l'activation de la caspase-3 de façon précoce (en dedans de deux heures après ajout de l'inhibiteur) tel que montré à la figure 4. La kinase dépendante de Rho ROCK-I est activée suite à un clivage protéolytique par la caspase-3 (Sebbagh *et al*, 2001). ROCK-I activée phosphoryle la chaîne légère de la myosine et entraîne la contraction du réseau sous cortical d'actine en stimulant l'interaction entre les filaments d'actine et de myosine. Il est possible que le stimulus apoptotique entraîne une activation de la Rho GTPase et une activation de ROCK-I, indépendamment de l'activation des caspases. Mills *et al* (1998a) ont rapporté une inhibition du bouillonnement membranaire suite à l'inhibition de la Rho GTPase dans des conditions expérimentales où les caspases étaient inhibées par un inhibiteur pharmacologique. À la lumière de ces travaux, il semble exister principalement deux voies de signalisation menant à l'apparition de bouillonnement membranaire : une voie dépendante de Rho et une voie caspase-3 dépendante menant à l'activation de la kinase ROCK-I.

La présence de deux voies de signalisation convergeant vers la phosphorylation de la MLC peut sembler redondante. Cependant, cela peut avoir une fonction importante, comme par exemple de maintenir la MLC dans un état catalytiquement actif (phosphorylé) indépendamment du niveau d'activation de la MLCK et de ROCK-I. En effet, la MLCK est une Ca^+ /Calmodulin kinase qui dépend des niveaux intracellulaires de Ca^+ . La présence de deux voies de signalisation activées de façon indépendante peut

avoir pour fonction de diminuer les risques que le signal apoptotique de bouillonnement membranaire soit court-circuité par des événements apoptotiques pouvant affecter la voie de Rho ou les niveaux intracellulaires de Ca^+ .

L'inhibition de PAK-2 durant l'apoptose, une kinase également activée par les Rho GTPases, a également pour effet d'interférer avec le bouillonnement membranaire. Comme ROCK-I, PAK-2 est clivé durant l'apoptose, ce qui a pour conséquence de produire une forme constitutivement active de la kinase (Rudel, et Bokoch, 1997). Cependant, on ignore toujours si une forme activée de PAK-2 est suffisante pour induire l'apoptose. Il serait intéressant de déterminer si PAK-2 influence le niveau de phosphorylation de la MLC durant l'apoptose.

Fonctions du bouillonnement membranaire et de l'apoptose.

L'apoptose a pour fonction d'éliminer les cellules sans pour autant éliciter de réponse inflammatoire ou endommager les cellules avoisinantes. Quoiqu'on reconnaisse bien l'importance de l'apoptose et son rôle dans le maintien de l'intégrité des organismes, on ignore encore quelle est la fonction propre du bouillonnement membranaire. Plusieurs théories à ce sujet ont été émises. On croit que le bouillonnement membranaire est un moyen mécanique de signaler aux cellules voisines qu'elles doivent se préparer à phagocyter une cellule apoptotique comme l'est l'externalisation des résidus phosphatidylsérine, un signal servant à stimuler la phagocytose de la cellule (Wu *et al*, 1998). Il a aussi été proposé que la fonction du bouillonnement membranaire soit de dépléter la cellule en ATP, ou encore de favoriser la formation de corps apoptotiques contenant un homogénat cellulaire.

Il est possible que la mort cellulaire par apoptose (donc l'arrêt du fonctionnement coordonné des voies intracellulaires) ait été à l'origine un mécanisme pour combattre les infections dans les organismes primitifs (Vaux et Hacker, 1995), ou encore, une façon de recycler la matière cellulaire lorsqu'il y a rareté de nutriments, comme c'est le cas pour certains métazoaires (Cikala *et al*, 1999). Chez les organismes pluricellulaires complexes l'apoptose fait surtout partie des stratégies permettant de préserver l'équilibre de leur milieu interne. L'apoptose permet de moduler le nombre de cellules afin de restructurer un tissu lésé, se débarrasser de cellules en excès ou potentiellement dangereuses, infectées par des virus ou ayant subies des transformations néoplasiques.

L'apoptose n'est pas un événement rare mais bien un moyen utilisé continuellement par les organismes afin de préserver leur intégrité. Les modifications morphologiques qui caractérisent l'apoptose pourraient bien être des moyens évolués permettant d'éliminer et de recycler le plus efficacement possible les cellules indésirables. En premier lieu, l'élimination d'une cellule sans fuite de liquide intracellulaire a pour effet de prévenir l'élicitation d'une réponse inflammatoire locale, ce qui aurait pour conséquence d'altérer la fonction des tissus voisins et de les léser. Des anomalies reliées à l'apoptose et à l'élimination des cellules apoptotiques ont récemment été reliées à des maladies autoimmunes dont le lupus érythémateux systémique (Bijl *et al*, 2001).

Le bouillonnement membranaire en permettant la formation de petits corps apoptotiques pourrait donc avoir pour fonction de favoriser une élimination efficace, rapide et sans danger des cellules apoptotiques, en facilitant la phagocytose par les cellules voisines et en prévenant ainsi l'altération de la membrane plasmique des cellules mortes et conséquemment, la fuite de leur contenu cytoplasmique dans le milieu extracellulaire.

Conclusion.

Nous avons identifié une nouvelle voie apoptotique indépendante de la caspase-3 et impliquée dans le bouillonnement membranaire. De plus, cette voie semble de toute évidence converger sur la kinase dépendante de Rho, ROCK-I. L'identification de cette nouvelle voie est un argument supplémentaire en faveur de l'existence de voies caspase-indépendantes impliquées dans la régulation de phénomènes apoptotiques.

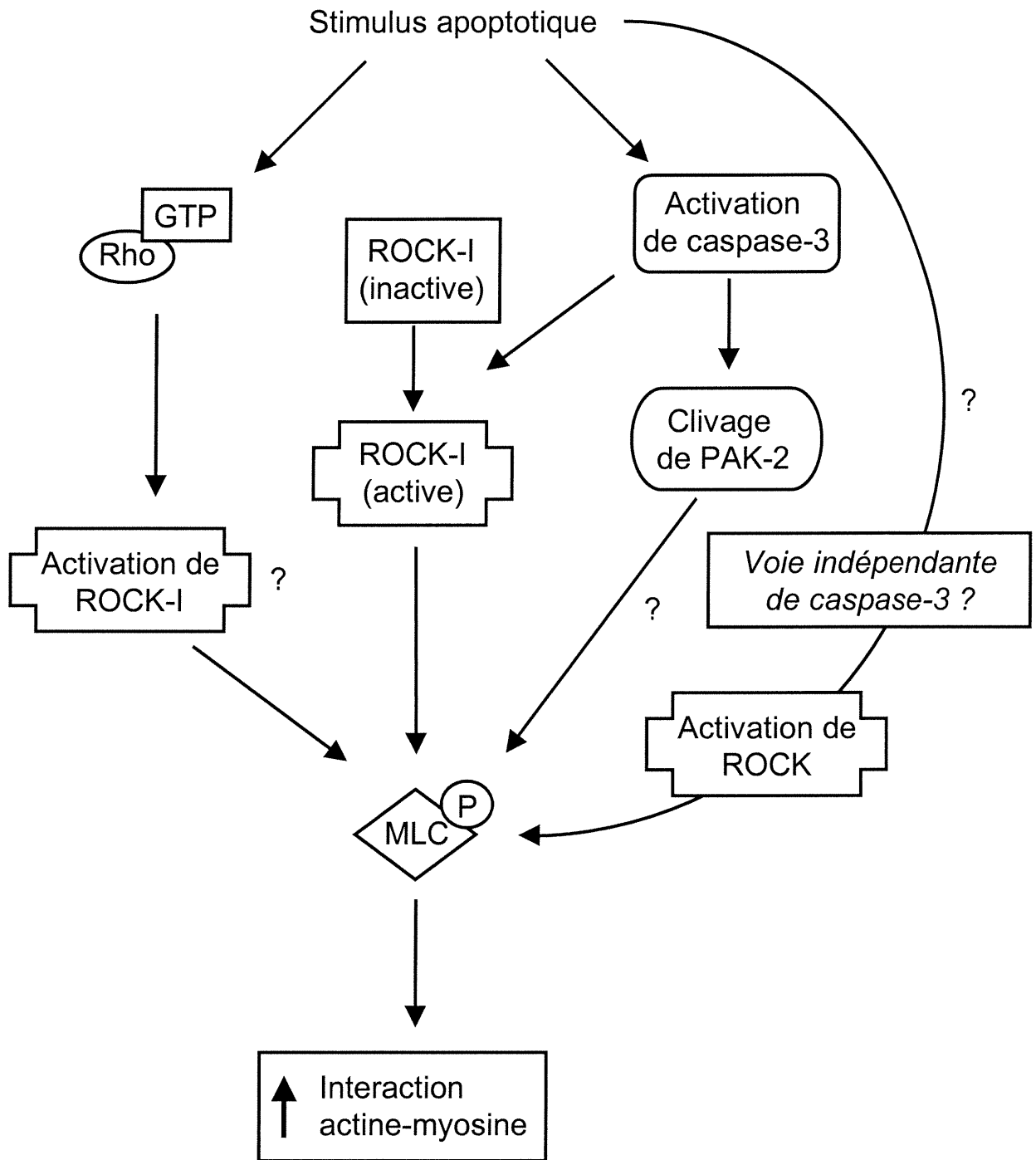


FIGURE VII

BIBLIOGRAPHIE

Adams, J.M., Cory, S., (1998), The Bcl-2 protein family : arbiters of cell survival. *Science* 281 : 1322-1326.

Amano, M., Ito, M., Kimura, K., Fukata, Y., Chihara, K., Nakano, T., Matsuura, Y., Kaibuchi, K., (1996), Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Journal of Biological Chemistry* 271: 20246-20249.

Alessi, D., MacDougall, L.K., Sola, M.M., Ikebe, M., 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. *European Journal of Biochemistry* 210 : 1023-1035.

Antonsson, B., Martinou, J.C., (2000) The Bcl-2 protein family. *Experimental Cell Research* 256 : 50-57.

Bannerman, D.D., Sathymoorthy, M., Goldblum, S.E., (1998), Bacterial lipopolysaccharide disrupts endothelial monolayer integrity and survival signaling events through caspase cleavage of adherens junction proteins. *Journal of Biological Chemistry* 273 : 35371-35380.

Bar-Sagi, D., Hall, A., (2000), Ras and Rho GTPases : A family reunion. *Cell* 103 : 227-238.

Bijl, M., Limburg, P.C., Kallenberg, C.G., (2001), New insights into the pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE) : the role of apoptosis. *Netherlands Journal of Medicine* 59 : 66-75.

Bishop, A.L., Hall, A., (2000), Rho GTPases and their effector proteins, *Biochemical Journal* 348 : 241-255.

Brancolini, C., Lazarevic, D., Rodriguez, J., Schneider, C., (1997), Dismantling cell-cell contacts during apoptosis is coupled to a caspase-dependant proteolytic cleavage of β -catenin. *Journal of Cell Biology* 139 : 759-771.

Brenner, C., Cadiou, H., Viera, H.L., Zamzani, N., Marzo, I., Xie, Z., Leber, B., Andrews, D., Duclohier, H., Reed, J.C., Kroemer, G., (2000), Bcl-2 and Bax regulates the channel activity of the mitochondrial adenine nucleotide translocator. *Oncogene* 19 : 329-336.

Buendia, B., Santa-Maria, A., Courvalin, J.C., (1999), Caspase-dependant proteolysis of integral and peripheral proteins of nuclear membranes and nuclear pore complex proteins during apoptosis. *Journal of Cell Science* 112 : 1743-1753.

Burns, J.C., Friedmann, T., Driever, W., Burrascano, M., Yee, J.K., (1993), Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: Concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and non mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 90: 8033-8037.

Caceres-Cortes, J., Rajotte, D., Dumouchel, J., Haddad, P., Hoang, T., (1994), Product of the steel locus suppresses apoptosis in hemopoietic cells. Comparison with pathways activated by granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *Journal of Biological Chemistry* 269 :12084-91.

Cain, K., Bratton, S.B., Langlais, C., Walker, G., Brown, D.G., Sun, X.M., Cohen, G.M., (2000), Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes. *Journal of Biological Chemistry* 275 : 6067-6070.

Castedo, M., Macho, A., Zamzami, N., Hirsch, T., Marchetti, P., Kroemer, G., (1995), Mitochondrial perturbations define lymphocytes undergoing apoptotic depletion in vivo. *European Journal of Immunology* 25 : 3277-3282.

Chitale, K., Wingard, C.J., Clinton Webb, R., Branam, H., Stopper, V.S., Lewis, R.W., Mills, T.M., (2001), Antagonism of Rho-kinase stimulates rat penile erection via a nitric oxide-independent pathway. *Nature Medicine* 7 : 119-22.

Cikala, M., Wilm, B., Hobmayer, E., Bottger, A., David, C.N., (1999), Identification of caspases and apoptosis in the simple metazoan Hydra. *Current Biology* 9 : 959-962.

Coleman, M.L., Sahai, E.A., Yeo, M., Bosch, M., Dewar, A., Olson, M.F., (2001), Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK-I. *Nature Cell Biology* 3 : 339-345.

Couldwell, W.T., Hinton, D.R., He, S., Chen, T.C., Sebat, I., Weiss, M.H., Law, R.E., (1994), Protein kinase C inhibitors induce apoptosis in human malignant glioma cell lines. *FEBS Letters* 345 :43-6.

Cotter, T.G., Lennon, S.V., Glynn, J.M., Green, D.R., (1992), Microfilaments-disrupting agents prevent the formation of apoptotic bodies in tumor cells undergoing apoptosis. *Cancer Research* 52 : 997-1005.

Cragoe, E.J., Jr., Woltersdorf, O.W., Jr., Bicking J.B., Kwong, S.F., Jones, J.H., (1967), *Journal of Medical Chemistry* 10 : 66-75.

Crompton, M., (1999), The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death., *Biochemical Journal* 341 : 233-249.

Cryns, V.L., Bergeron, H., Zhu, H., Li, H., Yuan, J., (1996), Specific cleavage of alfa-fodrin during Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is mediated by an interleukin-1 beta-converting enzyme/Ced-3 protease distinct from the poly(ADP-ribose) polymerase protease. *Journal of Biological Chemistry* 271 : 31277-31282.

Cunningham, C.C., Gorlin, J.B., Kwatkowski, D.J., Hartwig, J.H., Janmey, P.A., Byers, R., Stossel, T.P., (1992), Actin-binding protein requirement for cortical stability and efficient locomotion. *Science* 255 : 325-327.

Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., Wang, X., (2000), mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102 : 33-42.

Earnshaw, W.C., Martins, L.M., Kaufmann, S.H., (1999), Mammalian caspases : Structure, activation, substrates, and functions during apoptosis, *Annual Review of Biochemistry* 68 : 383-424.

Fesus, L., (1993), Biochemical events in naturally occurring forms of cell death. *FEBS Letters* 328 : 1-5.

Garcia, A.M., Rowell, C., Ackermann, K., Kowalczyk, J.J., Lewis, M.D., (1993), Peptidomimetic inhibitors of Ras farnesylation and function in whole cells. *Journal of Biological Chemistry* 268 :18415-8.

Geske, F.J., Lieberman, R., Strange, R., Gerschenson, L.E., (2001), Early stages of p53-induced apoptosis are reversible. *Cell Death and Differentiation* 8 : 182-191.

Gibbs, J.B., Pompliano, D.L., Mosser, S.D., Rands, E., Lingham, R.B., Singh, S.B., Scolnick, E.M., Kohl, N.E., Oliff, A., (1993), Selective inhibition of farnesyl-protein transferase blocks ras processing in vivo. *Journal of Biological Chemistry* 268: 7617-20.

Gross, A., McDonnell, J.M., Korsmeyer, S.J., (1999), BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes and Development* 13 : 1899-1911.

Häcker, G., (2000), The morphology of apoptosis, *Cell Tissue Research* 301 : 5-17.

Hall, A, (1998), Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279 : 509-514.

Hatefi, Y., (1985), The mitochondrial electron transport and oxydative phosphorylation system. *Annual Review of Biochemistry* 54 : 1015-1069.

Hawley, R.G., Fong, A.Z., Lu, M., Hawlwy, T.S., (1994), The Hox-11 homeobox-containing gene of human leukemia immortalizes murine hematopoietic precursors. *Oncogene* 9 : 1-12.

Hengartner, M.O., (2000), The biochemistry of apoptosis, *Nature* 40 : 770-776.

Hirata, H., Takahashi, A., Kobayashi, S., Yonehara, S., Sawai, H., Okazaki, T., Yamamoto, K., Sasada, M., (1998), Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in Fas-induced apoptosis. *Journal of Experimental Medicine* 187 : 587-600.

Hirose, M., Ishizaki, T., Watanabe, N., Uehata, M., Kranenburg, O., Moolenaar, W.H., Matsumura, F., Maekawa, M., Bito, H., Narumiya, S., (1998), Molecular dissection of the Rho-associated protein kinase (p160ROCK)-regulated neurite remodelling in neuroblastoma N1E-115 cells. *Journal of Cell Biology* 141 : 1625-1636.

Huot, J., Houle, F., Rousseau, S., Deschesnes, R.G., Shah, G.M., Landry, J., (1998), SAPK2/p38-dependant F-actin reorganisation regulates early membrane blebbing during stress-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 143 : 1361-1373.

Janicke, R., Ng, U., Sprengart, M.L., Porter, A.G., (1998), Caspase-3 is required for alpha-fodrin cleavage but dispensable for cleavage of other substrates in apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 273 : 15540-15545.

Jarvis, W.D., Turner, A.J., Povirk, L.F., Traylor, R.S., Grant, S., (1994), Induction of apoptotic DNA fragmentation and cell death in HL-60 human promyelocytic leukemia cells by pharmacological inhibitors of protein kinase C. *Cancer Research* 54 : 1707-14.

Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R., (1972), Apoptosis : a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 26 : 239-257.

Kimura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., Yamamori, B., Feng, J., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A., Kaibuchi, K., (1996), Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* 273 : 245-248.

Knepper-Nicolai, B., Savill, J., Brown, S.B., 1998, Constitutive apoptosis in human neutrophils requires synergy between calpains and the proteasome downstream of caspases. *Journal of Biological Chemistry* 273 : 30530-30536.

Kohama, K., Ye, L.H., Hayakawa, K., Okagaki, T., (1996), Myosin light chain kinase : an actin binding protein that regulates an ATP-dependent interaction with myosin. *Trends in Pharmacological Science* 17 : 284-287.

Kondo, T., Takeuchi, K., Doi, Y., Yonemura, S., Nagata, S., Tsukita, S., (1997), ERM (erzin/radixin/moesin)-based molecular mechanism of microvillar breakdown at an early stage of apoptosis. *Journal of Cell Biology* 149 : 749-758.

Koopman, G., Reutelingsperger, C.P., Kuijten, G.A., Keehnen, R.M., Pals, S.T., van Oers M.H., (1994), Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84 : 1415-1420.

Kothakota, S. Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K., McGarry T.J., Kirschner, M.W., Kohts, K., (1997), Caspase-3-generated fragment of gelsolin : effector of morphological change in apoptosis. *Science* 278 : 294-298.

Korsmeyer, S.J., (1999), BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer research* 59 : 1693-1700.

Kureishi, Y., Kobayashi, S., Amano, M., Kimura, K., Kanaide, H., Nakano, T., Kaibuchi, K., Ito, M., (1997), Rho-associated kinase directly induces smooth muscle contraction through myosin light chain phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 272 : 12257-12260.

Krammer, P.H., (2000), CP95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407 : 789-795.

Krørup, T., Jakobsen, L.D., Jensen, B.S., Hoffmann, E.K., (1998), Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransport in Ehrlich cells: regulation by protein phosphatases and kinases. *American Journal of Physiology* 275: C239-50.

Krosi, G., He, G., Lefrancois, M., Charron, F., Romeo, P.-H., Jolicoeur, P., Kisch, I., Nemer, M., Hoang, T.,(1998), Transcription factor SCL is required for c-kit expression and c-Kit function in hemopoietic cells. *The Journal of Experimental Medicine* 188 : 439-450.

Langlois, W.J., Sasaoka, T., Saltiel, A.R., Olefsky, J.M., (1995), Negative feedback regulation and desensitization of insulin- and epidermal growth factor-stimulated p21ras activation. *Journal of Biological Chemistry* 270 : 25320-3.

Laster, S., M., Mackenzie, J.M., Jr., (1996), Bleb formation and F-actin distribution during mitosis and tumor-necrosis factor-induced apoptosis. *Microscopy Research Techniques* 34 : 272-280.

Lee, N., MacDonald, H., Reinhard, C., Halenbeck, R., Roulston, A., Shi, T., Williams, L.T., (1997), Activation of hPAK65 by caspase cleavage induces some of the morphological and biochemical changes of apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 94 : 13642-13647.

Levkau, B., Herren, B., Koyama, H., Ross, R., Raines, E.W., (1998), Caspase-mediated cleavage of focal adhesion kinase pp125FAK and disassembly of focal adhesion in human endothelial cell apoptosis. *Journal of Experimental Medicine* 187 : 579-586.

Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., Wang, X., (1997), Cytochrome c and dATP-dependant formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91 : 479-489.

Lorenzo, H.K., Susin, S.A., Penninger, J., Kroemer, G., (1999), Apoptosis inducing factor (AIF) : a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death and Differentiation* 6 : 516-524.

Mancini, M., Nicholson, D.W., Roy, S., Thornberry, N.A., Peterson, E.P., Casciola-Rosen, L.A., Rosen, A., (1998), The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: implications for apoptotic signaling. *Journal of Cell Biology* 140 : 1485-95

Martin, S.J., Reutelingsperger, C.P., McGahon A.J., Rader, J.A., van Schie R.C., LaFace, D.M., Green, D.R., (1995), Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus : inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *Journal of Experimental Medicine* 182 : 1545-1556.

Matsuyama, S., Llopis, J., Deveraux, Q., Tsien, R., Reed, J., (2000), Changes in intramitochondrial and cytosolic pH : Early events that modulate caspase activation during apoptosis. *Nature Cell Biology* 2 : 318-325.

McCarthy, N.J., Whyte, M.K.B., Gilbert, C.S., Evan, G.I., (1997), Inhibition of Ced-3/ICE-related proteases does not prevent cell death induced by oncogenes, DNA damage or the Bcl-2 homologue Bak. *Journal of Cell Biology* 136 : 215-227.

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

Mills, J.C., Lee, V.M.-Y., Pittman, R.N., (1998b), Activation of a PP2a-like phosphatase and dephosphorylation of tau protein characterize onset of the execution phase of apoptosis. *Journal of Cell Science* 111 : 625-626.

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

Mitchison, T.J., Cramer, L.P., (1996), Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell* 84 : 371-379.

Muchmore, S.W., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R.P., Harlan, J.E., Yoon, H.S., Nettesheim, D., Chang, B.S., Thompson, C.B., (1996), X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 381 : 335-341.

Muzio, M., Stockwell, B.R., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Dixit, V.M., (1998), An induced proximity model for caspase-8 activation. *Journal of Biological Chemistry* 273 : 2926-2930.

Nagata, K., Puls, T., Hirokawa, N., Hall, A., (1998), The MAP kinase kinase kinase MLK2 is co-localized with activated JNK along microtubules and associates with kinesin superfamily motor KIF3. *European Molecular Biology Organization Journal* 17 : 149-158.

Nagata, S., (2000), Apoptotic DNA fragmentation. *Experimental Cell Research* 256 : 1-18.

Nicholson, D.W., (2000), From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature* 407 : 810-6.

Noel J, Pouyssegur J. (1995), Hormonal regulation, pharmacology, and membrane sorting of vertebrate Na⁺/H⁺ exchanger isoforms. *American Journal of Physiology* 268 : C283-96.

Ory, D.S., Neugeboren, B.A., Mulligan, R., (1996), A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93: 11400-11406.

Rajotte, D., Haddad, P, Haman, A. et al. (1992), Role of protein kinase C and the Na⁺/H⁺ antiporter in suppression of apoptosis by granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3. *Journal of Biological Chemistry* 267: 9980-9987.

Reszka, A., Bulinski, J., Drebs, E.G., Fischer, E.H., (1997), Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase 2 regulates cytoskeletal organisation and chemotaxis via catalytic and microtubule-specific interactions. *Molecular Biology of the Cell* 8 : 1219-1232.

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

Robertson, G.S., Crocker, S.J., Nicholson, D.W., Schulz, J.B., (2000), Neuroprotection by the inhibition of apoptosis. *Brain Pathology* 10 : 282-292.

Rodriguez, J., Lazebnik, Y., (1999) Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes and Development* 13 :3179-3184.

Roy, S., Bayly, C.I., Gareau, Y., Houtzager, V.M., Kargman, S., Keen, S.L.C., Rowland, K., Seiden, I.M., Thornberry, N.A., Nicholson, D.W., (2001), Maintenance of caspase-3 proenzyme dormancy by an intrinsic « safety catch » regulatory tripeptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 98 : 6132-6137.

Rudel, T., Bokoch, G.M., (1997), Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK-2. *Science* 276 : 1571-1574.

Sanders, L.C., Matsumura, F., Bokoch, G.M., de Lanerolle, P., (1999), Inhibition of myosin light chain kinase by p21-activated kinase. *Science* 283 : 2083-2085.

Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H., Peter, M.E., (1998), Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *European Molecular Biology Organization Journal* 17 : 1675-1687.

Sebbagh, M., Renvoizé, C., Hamelin, J., Riché, N., Bertoglio, J., Bréard, (2001), Caspase-3-mediated cleavage of ROCK-I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nature Cell Biology* 3 : 346-352.

Sgonc R., Boeck, G., Dietrich, H., et al. (1994), Simultaneous determination of cell surface antigens and apoptosis. *Trends in Genetics* 10 : 41-42.

Socolovsky, M., Lodish, H.F., Daley, G.Q., (1998), Control of hematopoietic differentiationL lack of specificity in signalling by cytokine receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95 : 6573-6575.

Stoffel, R., Ziegler, S., Ghilardi, N., Ledermann, B., de Sauvage, F.J., Skoda, R.C., (1999), Permissive role of thrombopoietin and granulocyte colony-stimulating factor receptors in hemopoietic cell fate decisions *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96 : 698-702.

Thornberry, N.A., Rano, T.A., Peterson, E.P., Rasper, D.M., Timkey, T., Garcia-Calvo, M., Houtzager, V.M., Nordstrom, P.A., Roy, S., Vaillancourt, J.P., Chapman, K.T., Nicholson, D.W. (1997), A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 272 : 17907-17911.

Tominaga, T., Ishizaki, T., Narumiya, S., Barber, D., (1998), p160ROCK mediates RhoA activation of Na-H exchange. *European Molecular Biology Organization Journal* 17 : 4712-4722.

Torgerson, R.R., McNiven, M.A., (1998), The actin-myosin cytoskeleton mediates reversible agonist-induced membrane blebbing. *Journal of Cell Science* 111 : 2911-2922.

Tsien, R.Y., Pozzan, T., Rink, T.J., (1982), Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator. *Journal of Cell Biology* 94 : 325-334.

Kitamura, T., Tange, T., Terasawa, T., Chiba, S., Kuwaki, T., Miyagawa, K., Piao, Y.F., Miyazono, K., Urabe, A., and Takaku, F. (1989), Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates dependently on GM-CSF, IL-3, or erythropoietin. *Journal of Cell Physiology* 140 : 323-334

Van de Water, B., Nagelkerke, J.F., Stevens, J.L., (1999), Dephosphorylation of focal adhesion kinase (FAK) and loss of focal contacts precede caspase-mediated cleavage of FAK during apoptosis in renal epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry* 274 : 22490-22497.

Vaux, D.L., Hacker, G., (1995), Hypothesis : apoptosis caused by cytotoxins represents a defensive response that evolved to combat intracellular pathogens. *Clin Exp Pharm Physiol* 22 : 861-863.

Wang, K.K.W., Posmatur, R., Nath, R., McGinnis, K., Whitton, M., Talanian, R.V., Glantz, S.B., Morrow, J.S., (1998), Simultaneous degradation of alphaIIb and betaIIb-spectrin by caspase 3 (CPP32) in apoptotic cells. *Journal of Biological Chemistry* 273 : 22490-22497.

Weber, C.H., Vincenz, C., (2001), The death domain superfamily: a tale of two interfaces ? *Trends in Biochemical Sciences* 26 : 475-481.

Wen, L.P., Farni, J.A., Troie, J.L., Guan, K., Orth, K., Rosen, G.D., (1997), Cleavage of focal adhesion kinase by caspases during apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 272 : 26056-26061.

Wu, Y.C., Horvitz, H.R., (1998), The *C. elegans* cell corpse engulfment gene *ced-7* encodes a protein similar to ABC transporter. *Cell* 93 : 951-960.

Wyllie, A.H., (1980a), Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284 : 555-556.

Wyllie, A.H., Kerr, J.F., Currie, A.R., (1980b), Cell death : the significance of apoptosis. *International Review of Cytology* 68 : 251-306.

Wyllie, A.H., (1981), Cell death: a new classification separating apoptosis from necrosis. In Cell Death in Biology and Pathology, ed. ID Bowen, RA Lockshin, pp. 9-34. London: Chapman & Hall.

Zamzani, N., El Hamel, C., Maise, C., Brenner, C., Munoz-Pinedo, C., Belzacq, A.S., Costantini, P., Viera, H., Loeffler, M., Molle, G., Kroemer, G., (2000), Bid acts on the permeability transition pore complex to induce apoptosis. *Oncogene* 19 : 6342-6350.

Zheng, T.S., Schlosser, S.F., Dao, T., Hingorani, R., Crispe, I.N., Boyer, J.L., Flavell, R.A. *et al*, (1998), Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95 : 13618-13623.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier ma directrice de recherche, le Dr Trang Hoang, pour m'avoir orientée dans mes travaux et m'avoir laissé une grande liberté d'action. Je tiens également à souligner que je lui suis extrêmement reconnaissante de m'avoir encouragée à poursuivre ma maîtrise malgré les contraintes que m'imposaient mes études en médecine. Je tiens aussi à remercier et à saluer mes amis du laboratoire qui m'ont souvent aidé dans mes travaux et avec qui j'ai passé de bons moments.

Finalement, je remercie ma mère, Francine Boivin, qui m'a toujours encouragée dans mes études et sans qui je n'aurais pas terminé ce mémoire.