

INFORMATION TO USERS

This manuscript has been reproduced from the microfilm master. UMI films the text directly from the original or copy submitted. Thus, some thesis and dissertation copies are in typewriter face, while others may be from any type of computer printer.

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted. Broken or indistinct print, colored or poor quality illustrations and photographs, print bleedthrough, substandard margins, and improper alignment can adversely affect reproduction.

In the unlikely event that the author did not send UMI a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if unauthorized copyright material had to be removed, a note will indicate the deletion.

Oversize materials (e.g., maps, drawings, charts) are reproduced by sectioning the original, beginning at the upper left-hand corner and continuing from left to right in equal sections with small overlaps.

**ProQuest Information and Learning
300 North Zeeb Road, Ann Arbor, MI 48106-1346 USA
800-521-0600**

UMI[®]

NOTE TO USERS

Page(s) not included in the original manuscript are unavailable from the author or university. The manuscript was microfilmed as received.

29

This reproduction is the best copy available.

UMI

Université de Shebrooke

Régulation différentielle de l'apoptose selon l'état de
différenciation entérocytaire

par

Rémy Gauthier
Anatomie et biologie cellulaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de
maître ès sciences (M.Sc.)
en biologie cellulaire

27 mars 2001



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-74385-3

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	ii
LISTE DES FIGURES.....	vii
ABBREVIATIONS ET SYMBOLES	ix
RÉSUMÉ	xi

I-INTRODUCTION

1. APOPTOSE	1
1.1 Apoptose et généralités	1
1.2 Caractéristiques morphologiques de l'apoptose.....	2
1.3 Homologues Bcl-2	3
1.4 Caspases	12
2. VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUÉES DANS LA SURVIE CELLULAIRE	13
2.1 Voie des kinases MAP : p42 ^{Erk-2} /p44 ^{Erk-1}	15
2.2 Voie de la PI 3-kinase	16
2.2.1 p57 ^{Akt}	17
2.2.2. mTOR.....	19
3. ADHÉSION CELLULAIRE ET SURVIE.....	20
3.1 p125 ^{FAK}	20
3.2 Membres de la famille Src	21
4. ÉPITHÉLIUM INTESTINAL.....	23
5. MODÈLE IN VITRO DE DIFFÉRENCIATION ENTÉROCYTAIRE HUMAIN.....	26

6. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS	30
---------------------------------	----

II-MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. CULTURE CELLULAIRE	31
2. INCUBATION AVEC LES DIFFÉRENTS INHIBITEURS	31
2.1 Inhibiteurs pharmacologiques utilisés.....	32
3. DÉTECTION DE LA DÉGRADATION DE L'ADN INTERNUCLÉOSOMIQUE SUR GEL D'AGAROSE.....	34
4. ANALYSE WESTERN BLOT.....	35
4.1 Solubilisation des protéines.....	35
4.2 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)	36
4.3 Immunodétection des protéines (Western Blot).....	37
4.3.1 Anticorps primaires utilisés.....	37
4.3.2 Anticorps secondaires	41
4.4 Immunodécapage des membranes.....	41
4.5 Analyses densitométriques.....	41

III-RÉSULTATS

1. EXPRESSION DIFFÉRENTIELLE DES HOMOLOGUES BCL-2 SELON L'ÉTAT DE DIFFÉRENCIATION ENTÉROCYTAIRE	43
2. EFFETS DE L'ABSENCE DE SÉRUM SUR LA SURVIE ENTÉROCYTAIRE.....	45
2.1 Traitements.....	45
2.2 Effet de l'absence de sérum sur la survie entérocytaire et sur l'expression	

des homologues Bcl-2 au cours de la différenciation entérocytaire	49
2.3 Effet de l'insuline sur la survie entérocytaire	49
3. RÔLES DES TYROSINES KINASES DANS LA SURVIE ENTÉROCYTAIRE.	52
3.1 Phosphorylation des tyrosines au cours de la différenciation entérocytaire	52
3.2 Effets de l'inhibition des tyrosines kinases sur la survie et sur l'expression des homologues bcl-2 selon l'état de différenciation entérocytaire.....	52
3.3 Effets des traitements sur la phosphorylation des résidus tyrosines.	54
3.3.1 Entérocytes indifférenciés	54
3.3.2 Entérocytes différenciés	55
4. VOIE DES KINASES MAP.....	55
4.1 Expression de p42 ^{Erk-2} au cours de la différenciation entérocytaire.....	55
4.2 Implication des kinases de la voie (MEK-1/2)/(p42 ^{Erk-2} /p44 ^{Erk-1}) dans la survie entérocytaire	57
4.3 Effets de l'inhibition de la voie (MEK-1/2)/(p42 ^{Erk-2} /p44 ^{Erk-1}) sur l'expression des homologues Bcl-2 selon l'état de différenciation entérocytaire.....	57
4.4 Effets des traitements sur les niveaux relatifs d'activation de p42 ^{Erk-2} ..	59
4.4.1 Entérocytes indifférenciés	59
4.4.2 Entérocytes différenciés	61
5. VOIE DE LA PI3-KINASE.....	62
5.1 Expression de p57 ^{Akt} au cours de la différenciation entérocytaire.	62
5.2 Implication de la voie de la PI3-kinase et de la kinase mTOR dans la survie entérocytaire.....	64
5.2.1 Entérocytes indifférenciés.....	64
5.2.2 Entérocytes différenciés	65
5.3 Effets des traitements sur les niveaux relatifs d'activation de p57 ^{Akt}	65
5.3.1. Entérocytes indifférenciés	65
5.3.2 Entérocytes différenciés	67

5.4	Modulation d'expression des homologues Bcl-2	68
5.4.1	Effets de l'inhibition de la PI3-kinase sur l'expression des homologues Bcl-2 selon l'état de différenciation entérocytaire..	68
5.4.2	Effets de l'inhibition de la kinase mTOR sur l'expression des hmologues Bcl-2 selon l'état de différenciation entérocytaire.....	70
6.	KINASE D'ADHÉSION FOCALISÉE (P125 ^{FAK}) ET SURVIE ENTÉROCYTAIRE	70
6.1	L'expression de p125 ^{FAK} augmente au cours de la différenciation entérocytaire tandis que son degré d'activation chute.	70
6.2	Implication de la p125 ^{FAK} dans la survie entérocytaire.....	73
6.3	Effets de l'inhibition de p125 ^{FAK} sur l'expression des homologues Bcl-2 selon l'état de différenciation entérocytaire.....	73
6.4	Effets des traitements sur le degré relatif d'activation de p125 ^{FAK}	75
7.	MEMBRES DE LA FAMILLE SRC (p60 ^{Src} , p59 ^{Fyn} et p54 ^{Rak}).	77
7.1	Expression de p60 ^{Src} , p59 ^{Fyn} et p54 ^{Rak} au cours de la différenciation entérocytaire	77
7.2	Implication des tyrosines kinases membres de la famille Src sur la survie entérocytaire.	78
7.3	Effets de l'inhibition des membres de la famille Src sur l'expression des homologues Bcl-2 selon l'état de différenciation entérocytaire	78
7.4	Effets des traitements sur l' expression de p60 ^{Src} , p59 ^{Fyn} et p54 ^{Rak} selon l'état de différenciation entérocytaire.	80

IV-DISCUSSION

1.	LES HOMOLOGUES BCL-2 SONT EXPRIMÉS DIFFÉRENTIELLEMENT AU COURS DE LA DIFFÉRENCIATION ENTÉROCYTAIRE	83
2.	IMPLICATION DIFFÉRENTIELLE DE LA VOIE DE SIGNALISATION (MEK-1/2)/(P42 ^{ERK-2} /P44 ^{ERK-1}) DANS LA SURVIE ENTÉROCYTAIRE SELON DE	

L'ÉTAT DE DIFFÉRENCIATION CELLULAIRE.....	84
3. IMPLICATION DE LA VOIE DE SIGNALISATION PI 3-K DANS LA SURVIE ENTÉROCYTAIRE SELON L'ÉTAT DE DIFFÉRENCIATION CELLULAIRE.....	87
4. IMPLICATION DES VOIES RELIÉES À L'ADHÉSION CELLULAIRE (PI25 ^{FAK} ET FAMILLE SRC) DANS LA SURVIE ENTÉROCYTAIRE SELON L'ÉTAT DE DIFFÉRENCIATION.....	90
V-CONCLUSIONS	93
REMERCIEMENTS.....	95
BIBLIOGRAPHIE.....	96

LISTE DES FIGURES

I-INTRODUCTION

Figure 1	Représentation schématique de la structure primaire des homologues Bcl-2.....	4
Figure 2	Classification des homologues Bcl-2 selon les types d'interactions observées.....	6
Figure 3	Modèle montrant le rôle des homologues Bcl-2 au sein de l'apoptosome	9
Figure 4	Activation et classification des caspases.....	11
Figure 5	Voies de signalisation impliquées dans la survie cellulaire chez plusieurs types cellulaires.....	14
Figure 6	Compartimentalisation cellulaire et localisation de l'apoptose le long de l'axe crypte-villosité de l'épithélium intestinal humain.....	24
Figure 7	Distribution des homologues Bcl-2 le long de l'axe crypte-villosité intestinale humaine.....	27

III-RÉSULTATS

Figure 8	Établissement de profils distincts d'expression d'homologues Bcl-2 au cours de la différenciation entérocytaire humaine	44
Figure 9	Implication différentielle de voies et/ou de molécules de signalisation dans la survie entérocytaire humaine selon l'état de différenciation cellulaire.....	46
Figure 10	Activation de la capsase-7 suite aux traitements en fonction de l'état de différenciation entérocytaire	47
Figure 11	L'absence de sérum (48 hrs) n'affecte pas l'expression des homologues Bcl-2 chez les cellules Caco-2/15	48
Figure 12	Régulation différentielle de l'expression des homologues Bcl-2 par l'insuline.....	51
Figure 13	Régulation différentielle de l'expression des homologues Bcl-2 par les	

	tyrosines kinases	53
Figure 14	Profils distincts de niveaux relatifs d'activation de p42 ^{Erk-2} au cours de la différenciation entérocytaire.....	56
Figure 15	Régulation différentielle de l'expression des homologues Bcl-2 par la voie (MEK-1/2)/(p42 ^{Erk-2} /p44 ^{Erk-1}).....	58
Figure 16	Régulation de la voie p42 ^{Erk-2} chez les entérocytes indifférenciés et différenciés.....	60
Figure 17	Profils distincts de niveaux relatifs d'activation de p57 ^{Akt} au cours de la différenciation entérocytaire.....	63
Figure 18	Régulation de p57 ^{Akt} chez les entérocytes indifférenciés et différenciés	66
Figure 19	Régulation différentielle de l'expression des homologues Bcl-2 par la voie de la PI 3-K	69
Figure 20	Régulation différentielle de l'expression des homologues Bcl-2 par mTOR.....	71
Figure 21	Régulation de p125 ^{FAK} et des tyrosines kinases Src : p60 ^{Src} , p59 ^{Fyn} , p54 ^{Rak} et des tyrosines kinases selon l'état de différenciation entérocytaire	72
Figure 22	Régulation différentielle de l'expression des homologues Bcl-2 par p125 ^{FAK}	74
Figure 23	Régulation de p125 ^{FAK} , des tyrosines kinases Src : p60 ^{Src} , p59 ^{Fyn} , p54 ^{Rak} et des tyrosines kinases chez les cellules indifférenciées et différenciées...	76
Figure 24	Régulation différentielle de l'expression des homologues Bcl-2 par les tyrosines kinases Src	79

ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES

Note : Comme dans la littérature en général, les acronymes anglophones sont utilisés pour éviter la confusion. Dans la liste des abréviations, le nom est d'abord donné en français puis en anglais (entre parenthèse) dans le but de montrer la provenance de l'acronyme.

APAF-1	Facteur d'activation des protéases apoptotiques-1 (apoptotic protease-activating factor-1)
ATP	Adénosine triphosphate
BH	Homologie à Bcl-2 (Bcl-2 homology)
CHO	Cellules ovariennes d'hamster chinois (chinese hamster ovary cells)
CREB	cAMP response element binding protein
DMEM	Milieu de Eagle modifié par Dulbecco (Dulbecco modified Eagle's medium)
ECL	Enhance chemiluminescence
EDTA	Éthylène diamine tétra acide acétique
EGF	Facteur de croissance épidermique (epidermal growth factor)
ERK	Kinases régulées par des facteurs extracellulaires (extracellular-regulated kinase)
FAK	Kinase d'adhésion focalisée (focal adhesion kinase)
FKHR	Forkhead transcription factor
IAP	Inhibiteurs de l'apoptose (inhibitors of apoptosis)
IRS-1	Substrat du récepteur à l'insuline (insulin-recepteur-substrate)
MAPK	Protéine kinase activée par des mytogènes (mitogen-activated protein kinase)
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney
MEK	MAPK/ERK kinase

mTOR	Mammalian target of rapamycin
PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (polyacrylamide gel electrophoresis)
PBS	Tampon phosphate salin (Phosphate buffer saline)
PC	Post-confluence
PDK-1	Kinase dépendante des lipides phosphatidyl-inositol (phosphatidyl-inositol lipid-dependant kinase)
PFK-2	Phosphofructo-2-kinase
PI 3-kinase	Phosphatidylinositol 3'-OH kinase
Rpm	Révolution par minute
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SEM	Erreur standard sur la moyenne (standard error on mean)
Std.	Standard de poids moléculaire d'ADN
TGF	Facteur de croissance transformant (transforming growth factor)
TE	Tris-EDTA
TKs	Tyrosines kinases
TNF	Tumor necrosis factor
TRANCE-R	TNF-related activation induced cytokine
UV	Rayon ultraviolet
V	Volt
VEGF	Facteur de croissance endothélial vasculaire (vascular endothelial growth factor)

RÉSUMÉ

L'épithélium intestinal humain est un tissu qui se renouvelle continuellement. Les bases moléculaires du processus dynamique de production de cellules dans les cryptes, et de la migration de ces cellules jusqu'à l'apex des villosités où elles entrent en apoptose, demeurent mals connus. En effet, dans le cadre d'un processus dynamique de renouvellement épithélial tissulaire le long de l'axe crypte-villosité, l'apoptose au niveau de l'apex des villosités constitue un processus normal pour les entérocytes tandis que l'apoptose au niveau des cellules cryptales est peu fréquent et sert uniquement à enlever les cellules défectueuses ou endommagées. Cette différence apparente au niveau de l'incidence de l'apoptose suggère l'hypothèse de l'existence de mécanismes de régulation différentiels de survie cellulaire le long de l'axe crypte-villosité.

Des évidences supportent ceci : 1) il existe des différences au niveau de l'incidence de l'apoptose entre les cellules de la crypte et les cellules de la villosité suite à l'irradiation; 2) il existe des profils différentiels d'expression des homologues Bcl-2 le long de l'axe crypte-villosité. Par conséquent, l'hypothèse de travail de mon sujet de recherche est que l'apoptose intestinale humaine est soumise à une régulation distincte selon l'état de différenciation entérocytaire. Les objectifs spécifiques de mon projet de recherche étaient les suivants : 1) établir le profil d'expression des homologues Bcl-2 au cours de la différenciation entérocytaire humaine, 2) identifier les voie(s) de signalisation importante(s) pour la survie entérocytaire et 3) vérifier l'aspect différentiel de l'implication des voies de signalisation par la comparaison entre les entérocytes indifférenciés vs différenciés et ce, à l'aide de la lignée cellulaire Caco-2/15, un modèle *in vitro* de différenciation entérocytaire humaine.

Dans un premier temps, nous avons montré qu'il existe des profils distincts d'expression des homologues Bcl-2 au cours de la différenciation entérocytaire tant pour les anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-X_L et Mcl-1) que pour les pro-apoptotiques (Bax, Bak et Bad). De plus, l'absence de sérum n'affecte pas de façon significative les niveaux d'expression des homologues Bcl-2 étudiés.

Dans un deuxième temps, à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques, nous avons démontré une implication différentielle pour différentes voies de signalisation selon l'état de différenciation. Par exemple, la voie (MEK-1/2)/(p42^{Erk-2}/p44^{Erk-1}) est impliquée dans la survie chez les entérocytes différenciés, mais ne semble pas jouer de rôle dans la survie des entérocytes indifférenciés. D'autre part, la voie de la PI3-kinase est impliquée dans la survie des entérocytes tant indifférenciés que différenciés. Cependant, l'activation de p57^{Akt}, un effecteur en aval de PI3-K, semble être indépendante de PI3-K chez les entérocytes indifférenciés. De plus, p57^{Akt} ne semble pas impliqué dans la survie des entérocytes indifférenciés. Nous avons également démontré que la kinase d'adhésion focalisée p125^{FAK}, une composante importante de la signalisation par l'adhésion cellulaire, est cruciale pour la survie des entérocytes tant indifférenciés que différenciés.

De plus, pour certains traitements ayant le même effet sur la survie tant chez les entérocytes différenciés et indifférenciés, nous observons malgré tout des modulations d'expression différentielles des homologues Bcl-2 selon l'état de différenciation. Suite à l'induction de l'apoptose, nous observons généralement une balance des niveaux d'expression des homologues Bcl-2 qui favorise les pro-apoptotiques. Ceci est accompagné par le clivage et l'activation de la caspase-7 effectrice et ce, peu importe l'état de différenciation.

En résumé, notre étude a permis de montrer une implication différentielle dans la survie selon l'état de différenciation pour les voies p42^{Erk-2}/p44^{Erk-1}, PI3-K et p125^{FAK}. Ceci est couplé à l'établissement de profils distincts d'expression et de régulation des homologues Bcl-2, démontrant ainsi l'existence de mécanismes de survie différentiels selon l'état de différenciation entérocytaire. Dans leur ensemble, ces observations supportent fortement le concept d'une régulation différentielle de la survie entérocytaire humaine le long de l'axe crypte-villosité *in vivo*.

I-INTRODUCTION

1. *Apoptose*

1.1 *Apoptose et généralités*

Jusqu'à ce jour, plusieurs types de mort cellulaire programmée ont été décrits : mort physiologique, mort par sénescence, mort par défense des plantes faces au micro-organismes, mort cellulaire chez les plantes en développement et l'apoptose qui est la forme la mieux caractérisée au niveau moléculaire (Vaux et al., 1999). L'apoptose est régie par un programme génétiquement conservé autant chez les invertébrés que chez les vertébrés (Ellis et al., 1991). L'apoptose est intrinsèque à chaque cellule et peut être induite suite à certains stimuli, tels les agents génotoxiques (oxydants, irradiations), les toxines, les infections virales, ainsi que les chocs thermiques ou osmotiques (Sainsi et Walker, 1998). Cependant, la survie cellulaire n'est pas un processus passif, la cellule ayant constamment besoin de signaux de survie pour empêcher celle-ci d'entrer en apoptose. Ceux-ci peuvent être de nature variable ; par exemple, les hormones, certaines cytokines, les facteurs de croissance, ainsi que la matrice extra-cellulaire (Wu et al., 1995; Wallen et al., 1991; Xia et al., 1995, Meredith et al., 1993; Ruoslahti et Reed, 1994, Frish et Francis, 1994; Boudreau, et al., 1995), jouent des rôles importants dans la survie cellulaire. À tout moment, la cellule est sujette à être induite en apoptose car celle-ci intègre constamment des signaux anti- ou pro-apoptotiques de son environnement extérieur et/ou intérieur, qui décident de la destinée de la cellule. Ce processus dynamique est comparable à une balance ayant des signaux pro-apoptotiques d'un côté et des signaux anti-apoptotiques de l'autre.

L'intégration des signaux de survie se fait principalement par une famille de protéines apparentées appelées homologues Bcl-2, qui jouent un rôle central dans la détermination du devenir de la cellule. En effet, ceux-ci sont responsables de la phase décisionnelle de l'apoptose (Adam et Cory, 1998; Reed et al., 1996). Une fois le processus apoptotique enclenché, il y a activation d'une famille de cystéines protéases à haute spécificité appelées caspases. Leur activité protéolytique est responsable du processus de dégradation que nous observons au cours de l'apoptose. Une fois les caspases activées (machinerie effectrice), l'apoptose est irrémédiablement enclenchée (Adam et Cory, 1998; Reed et al., 1996).

1.2 *Caractéristiques morphologiques de l'apoptose*

Originellement, l'apoptose a été décrite chez des cellules de vertébrés (Kerr et al., 1972). L'apoptose est un processus intrinsèquement régulé qui joue un rôle crucial dans la morphogenèse, le renouvellement et la réparation tissulaire (White, 1996; Jacobson et al., 1997). Elle permet l'élimination des cellules endommagées, surnuméraires ou potentiellement dangereuses pour l'organisme. Au niveau morphologique, l'apoptose est caractérisée par un rétrécissement cellulaire, une vacuolisation membranaire, une condensation de la chromatine, une endonucléolyse de l'ADN génomique (principalement des séquences internucléosomiques correspondant à des multiples de 180 paires de bases, formant une échelle d'ADN lorsque visualisé sur gel d'agarose), un désassemblage d'organelles cellulaires, une fragmentation nucléaire, une protéolyse totale et une cytolyse non-inflammatoire (Reed, 1994; White, 1996; Adams et Cory, 1998; Saini et Walker 1998).

Ces processus mènent à la formation d'un corpuscule apoptotique qui renferme le contenu cellulaire réduit à sa plus simple expression. Ensuite, l'élimination du corpuscule apoptotique s'effectue par phagocytose via les macrophages et/ou via les cellules avoisinantes, ou par exfoliation dans une lumière (Kroemer et al., 1995; Vaux et Strasser, 1996; Hale et al., 1996).

1.3 Homologues Bcl-2

Les homologues Bcl-2 constituent une famille de protéines structurellement apparentées qui affectent l'intégration des signaux pro- et anti-apoptotiques. Ils exercent un rôle crucial dans la phase décisionnelle de l'apoptose (figure 1).

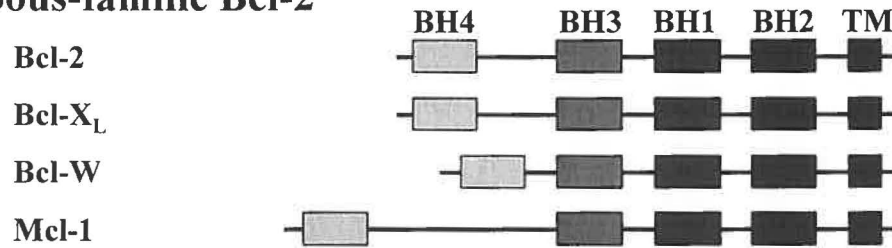
Jusqu'à présent, au moins quinze membres ont été identifiés chez les mammifères (Adam et Cory, 1998). Les homologues Bcl-2 regroupent des membres anti-apoptotiques tels que Bcl-2, Bcl-X_L et Mcl-1, et des membres pro-apoptotiques comme Bax, Bak et Bad. Les homologues Bcl-2 possèdent dans leur séquence polypeptidique au moins un des quatre domaines d'homologie à Bcl-2 (BH1 à BH4). C'est de part les domaines contenus dans leur séquence que les homologues Bcl-2 sont subdivisés en sous-famille. Les anti-apoptotiques de la sous-famille Bcl-2 contiennent les domaines BH1 à BH4, tandis que les autres anti-

Figure 1. Représentation schématique de la structure primaire des homologues Bcl-2. Les homologues Bcl-2 constituent une famille de protéines apparentées qui comprend des membres anti- et pro-apoptotiques. La séquence polypeptidique de chaque homologue Bcl-2 contient au moins un des quatre domaines d'homologie à Bcl-2 (BH1 à BH4). De plus, plusieurs homologues Bcl-2 possèdent un domaine transmembraire (TM) en C-terminal. (A) Les homologues Bcl-2 anti-apoptotiques sont subdivisées en deux sous-familles. Les membres de la sous-famille Bcl-2 contiennent les domaines BH1 à BH4, tandis que les autres anti-apoptotiques possèdent au moins les domaines BH1 et BH2. (B) Les homologues pro-apoptotiques sont également subdivisés en deux sous-familles. Les membres de la sous-famille Bax contiennent les domaines BH1 à BH3, tandis que les pro-apoptotiques ne possédant que le domaine BH3 constituent la deuxième sous-famille.

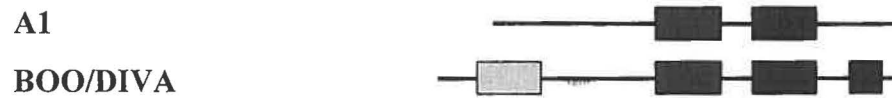
A

Anti-apoptotiques

Sous-famille Bcl-2



Autres



B

Pro-apoptotiques

Sous-famille Bax



Sous-famille BH3

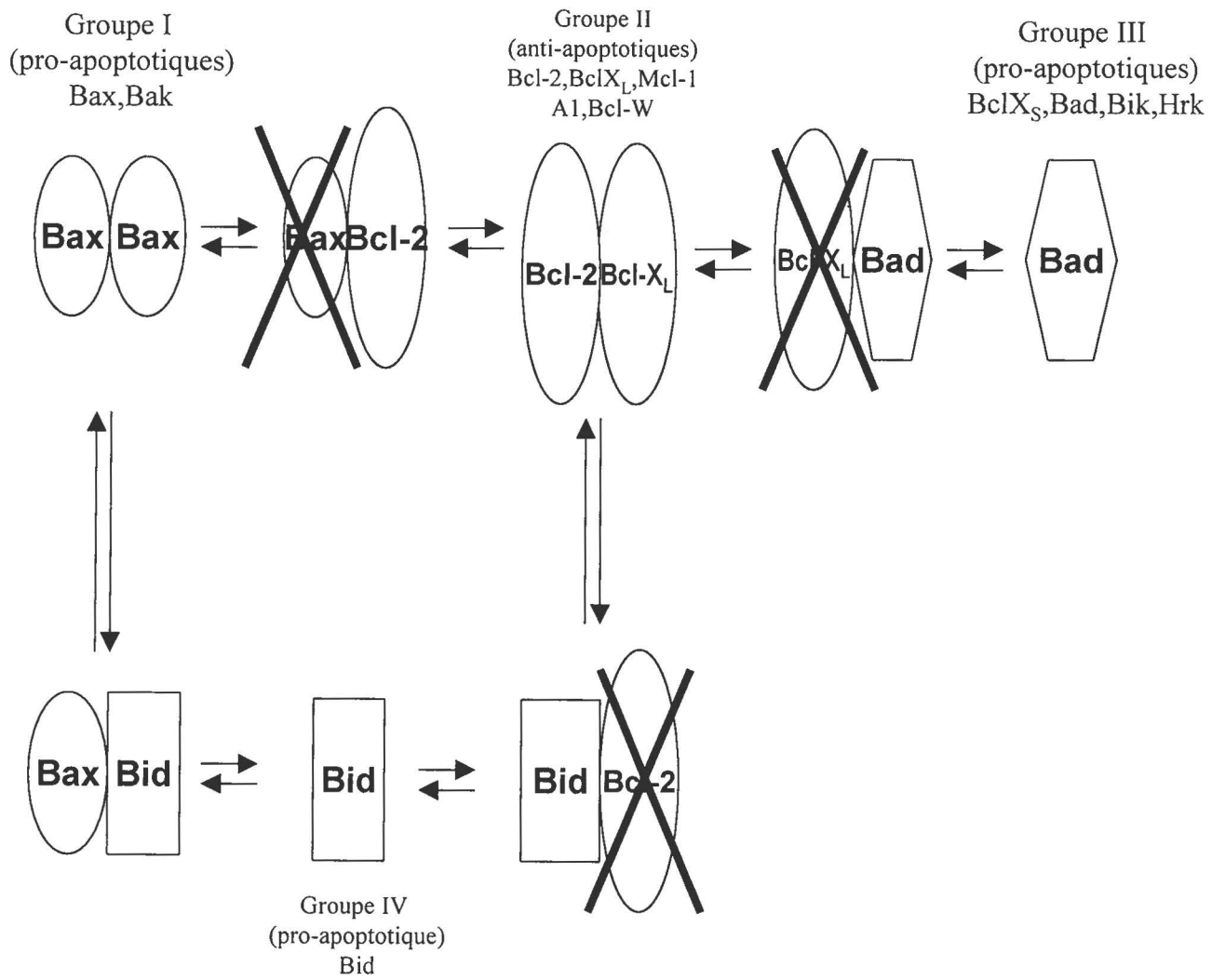


apoptotiques contiennent au minimum les domaines BH1 et BH2. Chez les pro-apoptotiques, il y a la sous-famille Bax, dont les membres contiennent les domaines BH1 à BH3, et les membres de la sous-famille BH3, qui contiennent uniquement le domaine BH3. Certains homologues pro- et anti-apoptotiques possèdent également un domaine transmembranaire qui permet l'ancrage de ceux-ci à différents types de membranes intracellulaires, telles que la membrane mitochondriale externe, la membrane du réticulum endoplasmique ou la membrane nucléaire (Krajewski et al., 1993; Lithgow et al., 1994; Yang et al., 1995; Zha et al., 1996).

Une des propriétés fonctionnelles des homologues Bcl-2 est leur capacité d'homo- ou d'hétérodimérisation, de telles interactions permettant aux membres pro- et anti-apoptotiques de titrer les fonctions des autres. Ce titrage des fonctions dépend de la nature même des interactions en cause (Oltvai et al., 1993; Yang et al., 1995); ces interactions s'effectuent principalement par l'insertion d'une région du domaine BH3 d'un homologue Bcl-2 dans la clef hydrophobique formée par les domaines BH1, BH2 et BH3 d'un autre homologue Bcl-2 (Sattler et al., 1997). Enfin, les domaines BH1, BH2 et BH4 sont nécessaires pour l'activité anti-apoptotique des homologues (Huang et al., 1998), tandis que le domaine BH3 est essentiel et suffisant pour l'activité pro-apoptotique (Chittenden et al., 1995).

La compréhension des interactions entre les différents homologues Bcl-2 relève d'un niveau élevé de complexité : c'est pourquoi les homologues Bcl-2 peuvent être également classifiés en quatre groupes selon le type d'interactions et leurs conséquences (figure 2). Le groupe I comprend les pro-apoptotiques (ex : Bax, Bak) étant capables d'interagir avec des

Figure 2. Classification des homologues Bcl-2 selon les types d'interactions observées. Le groupe I comprend les pro-apoptotiques (ex : Bax, Bak) étant capables d'interagir avec des membres du même groupe, pour ainsi protéger leurs fonctions pro-apoptotiques. Les membres du groupe I peuvent également lier les membres du groupe II, tous des anti-apoptotiques (ex : Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1), menant à l'inhibition de leurs fonctions pro-apoptotiques. Les membres du groupe II sont de plus capables d'homodimérisation pour protéger leur fonctions anti-apoptotiques. Les membres du groupe III, tous des des pro-apoptotiques (ex : Bad, Bik), lient uniquement les membres du groupe II pour inhiber leurs fonctions anti-apoptotiques. Enfin, les membres du groupe IV, des pro-apoptotiques (ex : Bid), lient les membres du groupe I pour protéger les fonctions pro-apoptotiques de ces derniers et lient également les membres du groupe II pour inhiber les fonctions anti-apoptotiques de ceux-ci.



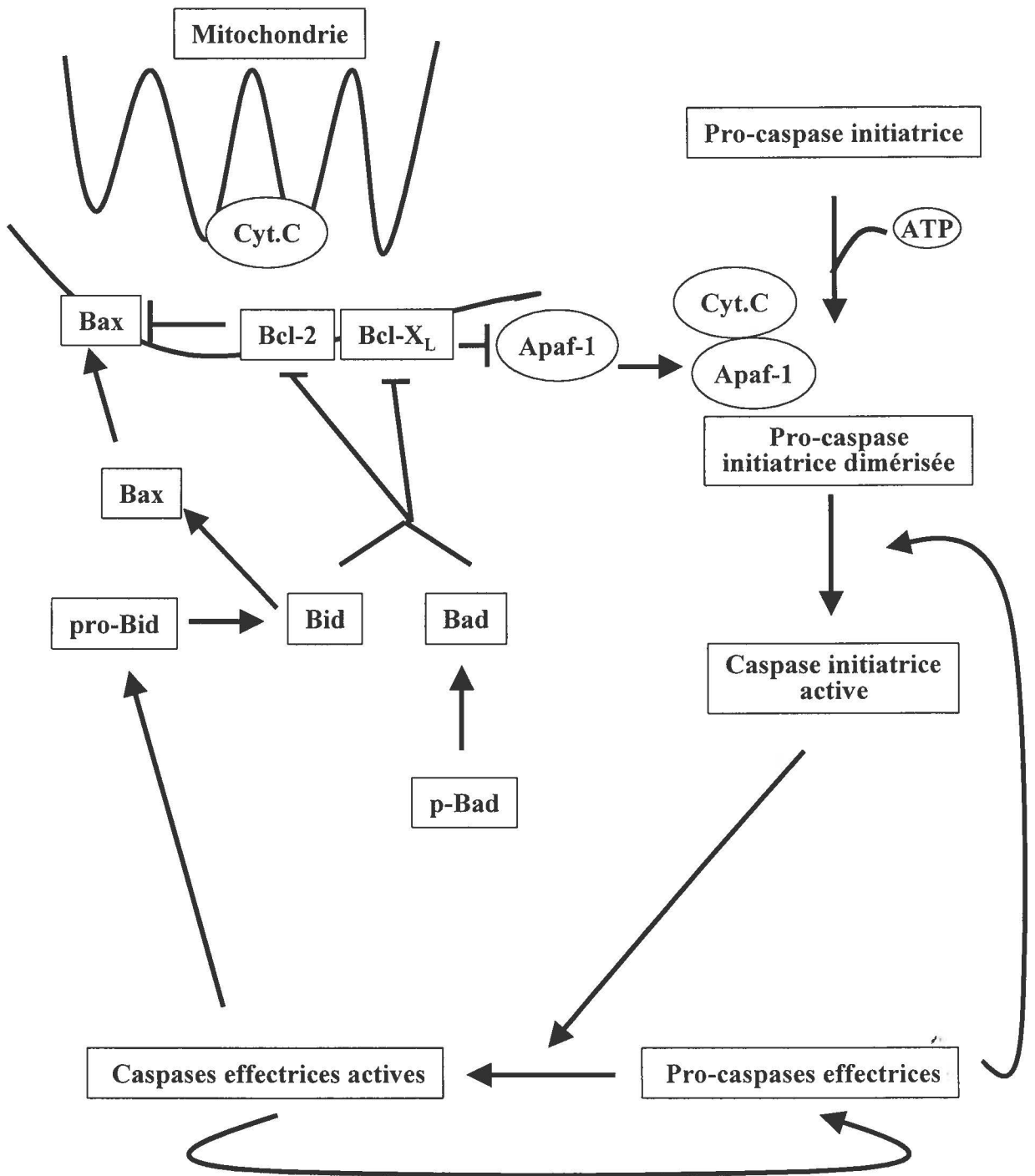
membres du même groupe, pour ainsi protéger leurs fonctions pro-apoptotiques. Les membres du groupe I peuvent également être liés par les membres du groupe II, tous des anti-apoptotiques (ex : Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1), menant à l'inhibition de leurs fonctions pro-apoptotiques. Les membres du groupe II sont également capables d'homodimérisation pour protéger leur fonctions anti-apoptotiques. Les membres du groupe III, tous des pro-apoptotiques (ex : Bad, Bik), lient uniquement les membres du groupe II pour inhiber leurs fonctions anti-apoptotiques. Enfin, les membres du groupe IV, des pro-apoptotiques (ex : Bid), lient les membres du groupe I pour protéger les fonctions pro-apoptotiques de ces derniers et lient également les membres du groupe II pour inhiber les fonctions anti-apoptotiques de ceux-ci (Wang et Reed, 1998).

Étant donné la capacité des homologues Bcl-2 à interagir entre eux, les niveaux d'expression des homologues Bcl-2 pro- et anti-apoptotiques, ainsi que la régulation de leurs fonctions jouent un rôle critique dans la détermination du devenir de la cellule. Il existe différentes façons d'influencer la balance entre les homologues pro- et anti-apoptotiques. Premièrement, les niveaux d'expression peuvent être modulés au niveau de la transcription. Par exemple, le facteur de transcription p53 augmente l'expression de l'homologue pro-apoptotique Bax et diminue l'expression de l'homologue anti-apoptotique Bcl-2 (Miyashita et al., 1994). Dans certains types cellulaires, la voie de signalisation Raf-1/MEK-1/2/(p42^{Erk}-2/p44^{Erk-1}) augmente l'expression des anti-apoptotiques Mcl-1 et/ou Bcl-2 et/ou Bcl-X_L dépendamment du type cellulaire (Townsend et al., 1998; Townsend et al., 1999; Leu et al., 2000). Un deuxième mode de régulation peut s'effectuer au niveau de l'épissage protéolytique du polypeptide ou de l'épissage alternatif de l'ARNm. Par exemple, l'anti-apoptotique Bcl-X_L peut être clivé au niveau de la protéine (Fujita et al., 1998), ou épissé au

niveau de l'ARNm (Boise et al., 1993) pour générer un fragment pro-apoptotique appelé Bcl-X_S. Enfin, la phosphorylation peut également moduler les fonctions de certains homologues Bcl-2. Par exemple, suite à la stimulation par des facteur de croissance, l'anti-apoptotique Bcl-2 est phosphorylé et les cellules deviennent plus résistantes face à l'apoptose (Ip et al., 1998; May et al., 1994; Poommipanit et al., 1999). Plus précisément, une étude a démontré que la phosphorylation de Bcl-2 sur la sérine 87 via l'activation de la voie (MEK-1/2)/(p42^{Erk-2}/p44^{Erk-2}) empêchait la dégradation de Bcl-2 dans le protéasome (Breitschopf et al., 2000). Cependant, la nature des résidus phosphorylés est importante, puisque la phosphorylation de Bcl-2 sur résidus sérine (sérine 70) rend la cellule plus sensible face à l'induction de l'apoptose suite à l'activation du récepteur Fas (Yamamoto et al., 1999). Le pro-apoptotique Bad peut également être phosphorylé suite à l'activation de la voie (MEK-1/2)/(p42^{Erk-2}/p44^{Erk-2}) menant à l'inactivation de ce dernier (Fang et al., 1999). Enfin, l'activité de certains homologues Bcl-2 peut également être régulée par liaison avec des protéines non-homologues. Par exemple, BAG-1 peut lier Bcl-2 (Takayama et al., 1995), permettant ainsi le recrutement de la kinase Raf-1 à la mitochondrie, cette association augmentant l'activité anti-apoptotique de Bcl-2 via la phosphorylation de celui-ci par Raf-1 (Wang et al., 1996).

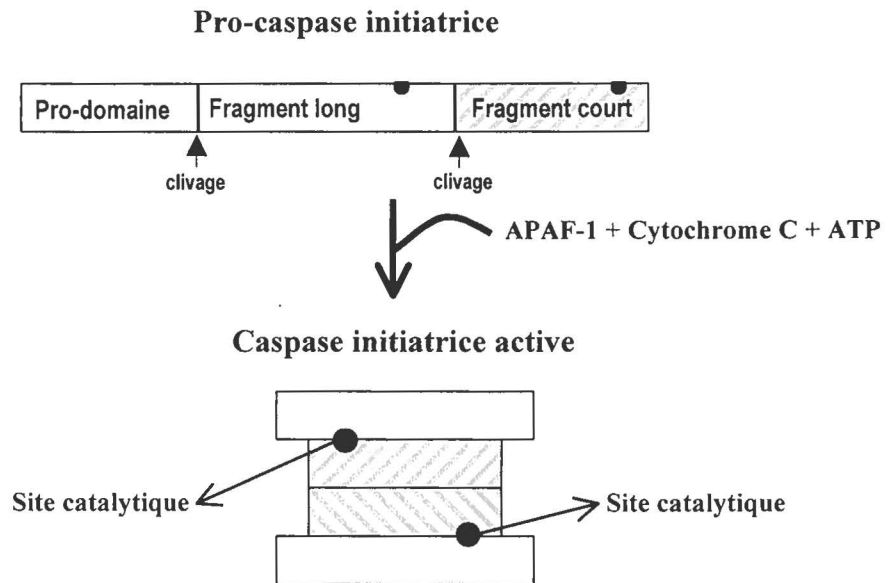
Il est bien établi que les homologues Bcl-2 contrôlent la phase décisionnelle pour l'entrée en apoptose. L'induction de l'apoptose réside dans l'assemblage d'un complexe cytoplasmique appelé apoptosome. L'apoptosome est composé d'APAF-1 (« apoptotic

Figure 3. Modèle montrant le rôle des homologues Bcl-2 au sein de l'apoptosome. Suite à un stimulus apoptotique, il y a expression et/ou activation d'homologues Bcl-2 pro-apoptotiques (Bid, Bax, Bad). Par exemple, la déphosphorylation de Bad permet à ce dernier d'inhiber les anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-X_L. Bcl-2 et Bcl-X_L ne pouvant plus exercer leurs fonctions anti-apoptotiques, ceci permet à Bax de venir détruire l'intégrité membranaire de la mitochondrie permettant ainsi la libération du cytochrome c. Parallèlement, l'inhibition de Bcl-X_L permet la relâche d'APAF-1. L'association du cytochrome c avec APAF-1 en présence d'ATP permet le recrutement d'une pro-caspase initiatrice. La dimérisation des pro-caspases initiatrice au sein de l'apoptosome permet leur activation par autoclivage intermoléculaire. Les caspases initiatrices peuvent ensuite cliver et activer les pro-caspases effectrices. Le pro-apoptotique pro-Bid peut être cliver par les caspases effectrices pour ainsi soutenir le signal pro-apoptotique. Une fois le processus d'activation des caspases amorcé, il s'ensuit une cascade d'activation irréversible qui est amplifiée par des boucles de rétroaction positives.



protease-activating factor-1 »), du cytochrome c et d'un dimère de pro-caspases initiatrices (ex : pro-caspase 9) (Li et al., 1997). Une lutte entre les homologues Bcl-2 pro- et anti-apoptotiques s'effectue pour la séquestration ou la libération des composantes de l'apoptosome (figure 3). Les homologues anti-apoptotiques tels que Bcl-2 et Bcl-X_L lient la surface mitochondriale pour préserver l'intégrité intermembranaire mitochondriale pour empêcher la libération du cytochrome c (Muchmore et al., 1996, Jurgensmeier et al., 1998; Narita et al., 1998; Zamzami et al., 1996). De plus, Bcl-X_L possède la propriété de séquestrer APAF-1, prévenant ainsi l'assemblage de l'apoptosome (Hu et al., 1998; Pan et al., 1998). Suite à un signal pro-apoptotique, l'activation ou/et l'expression d'homologues Bcl-2 pro-apoptotiques, tel que Bik, permet l'hétérodimérisation avec Bcl-X_L pour ainsi libérer APAF-1 (Zou et al., 1997). De plus, les pro-apoptotiques Bax et Bak peuvent également agir à la membrane mitochondriale, détruisant l'intégrité membranaire mitochondriale pour ainsi libérer le cytochrome c (Vander Heiden et al., 1997, Jurgensmeier et al., 1998; Narita et al., 1998). Ensuite, le cytochrome c peut lier APAF-1 en présence d'ATP, pour former un complexe oligomérique qui peut ensuite recruter une pro-caspase initiatrice (ex : pro-caspase 9). La dimérisation des pro-caspases initiatrices au sein de l'apoptosome permet leur activation par autoclivage intermoléculaire (figure 4A) (Srinivasula et al., 1998, Li et al., 1997). Les caspases initiatrices peuvent ensuite cliver et activer les pro-caspases effectrices, qui sont responsables du démantèlement cellulaire caractéristique de l'apoptose. Bien que les homologues Bcl-2 ont un rôle important à jouer au niveau de la mitochondrie, pour le moment, les mécanismes moléculaires précis impliquant ceux-ci ne sont pas encore complètement résolus.

Figure 4. Activation et classification des caspases. (A) Représentation schématique du modèle d'activation au niveau moléculaire des caspases initiatrices. La dimérisation des pro-caspases initiatrices au sein de l'apoptosome en présence du cytochrome c, d'APAF-1 et d'ATP permet leur activation par autoclivage intermoléculaire. Les caspases initiatrices sont clivées sur 2 sites pour ainsi libérer le fragment long et le fragment court du fragment régulateur (pro-domaine). (B) Les caspases peuvent être classifiées selon leurs fonctions biologiques (initiatrices et effectrices d'apoptose, activatrices de cytokines). Cependant, un moyen plus conventionnel de classifier les caspases est par leur propriété à reconnaître des séquences térapeptidiques spécifiques qu'elles clivent.

A**B**

CLASSES DE CASPASES	PRÉFÉRENCE TÉTRAPEPTIDIQUE DE CLIVAGE
Initiatrices d'apoptose	
Caspase-2	DXXD
Caspase-8	(L/V/D)EHD
Caspase-9	(I/V/L)EHD
Caspase-10	N.D.
Exécutrices d'apoptose	
Caspase-3	DEXD
Caspase-6	(V/T/I)EXD
Caspase-7	DEXD
Activatrices de cytokines	
Caspase-1	(W/Y/F)EHD
Caspase-4	(W/Y/F)EHD
Caspase-5	(W/Y/F)EHD
Caspase-13	N.D.

1.4 Caspases

Comme déjà mentionné auparavant, une fois le processus apoptotique enclenché, il y a activation d'une famille de cystéine protéases de haute spécificité appelées caspases. Jusqu'à ce jour, au moins 15 membres ont été classifiés chez les mammifères dont 12 chez l'homme (figure 4B). Celles-ci reconnaissent et clivent spécifiquement les polypeptides après un résidu aspartique. Elles peuvent être classées en trois groupes selon la séquence d'au moins 4 acides aminés qu'elles reconnaissent en N-terminal du site de clivage. La préférence de la reconnaissance du motif térapeptide diffère significativement au sein des caspases, ce qui explique la diversité de leurs fonctions biologiques (Thornberry et al., 1997). De plus, ce ne sont pas toutes les protéines qui possèdent le térapeptide optimum de clivage qui sont clivées, suggérant ainsi la présence d'éléments dans la structure tertiaire qui augmentent leur spécificité biologiques (Thornberry et al., 1997). Dans une cellule normale, nous retrouvons les caspases sous formes latentes (zymogènes).

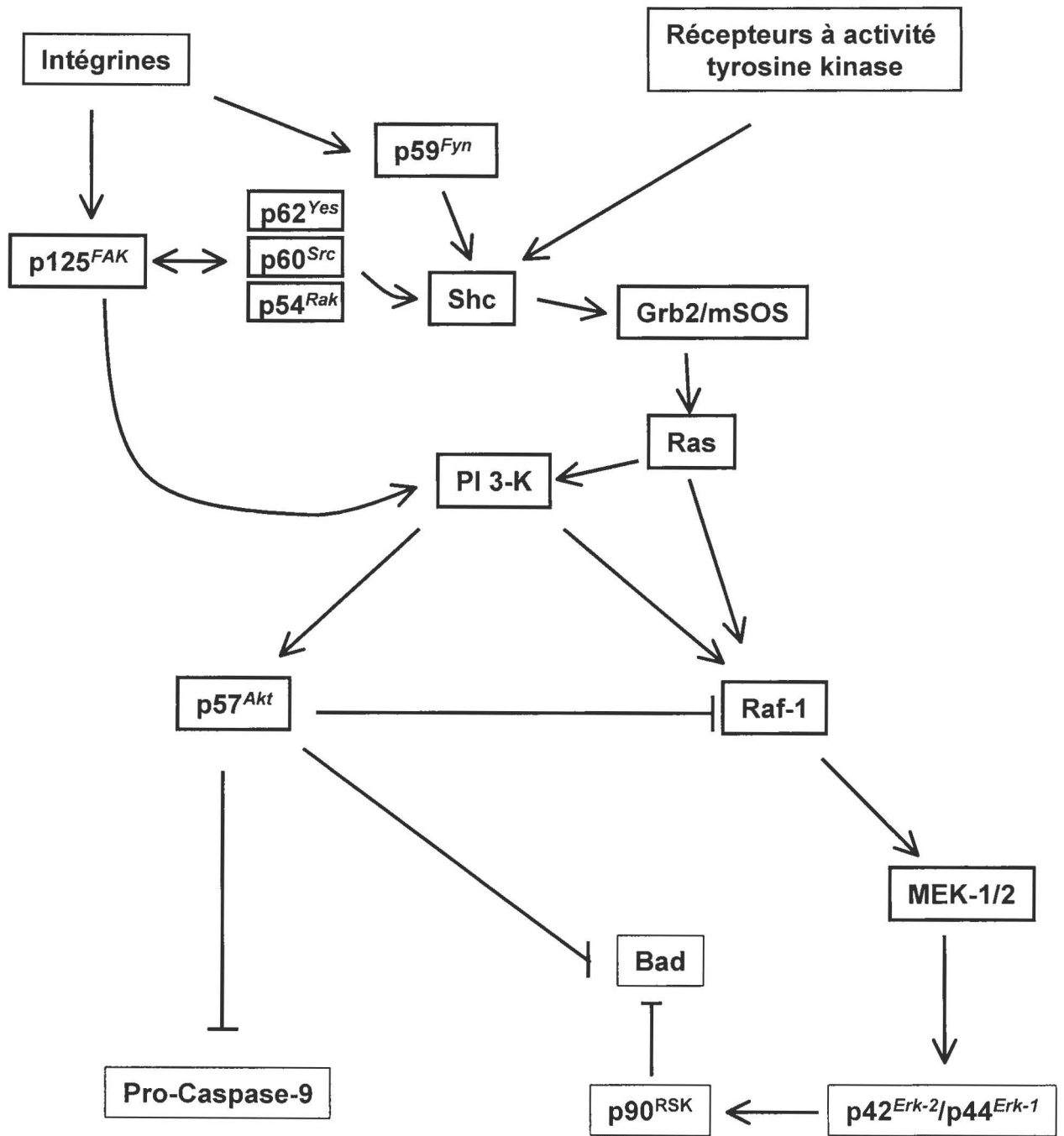
À l'instar de la formation de l'apoptosome (voir ci haut), l'activation et/ou les fonctions des caspases peuvent être régulées directement. Par exemple, certaines caspases peuvent être phosphorylées pour être inactivées (Cardone et al., 1998). Il existe également une famille de protéines nommée IAP (« inhibitor of apoptosis ») qui ont la capacité d'interagir directement avec le site actif de plusieurs caspases pour ainsi les inhiber (Devereaux et al., 1997; Roy et al., 1997). Il existe une hiérarchie au niveau de l'activation des caspases. Par exemple, la caspase-9 initiatrice peut cliver et activer les caspases effectrices -3 et -7 (Faleiro et al., 1997; Li et al., 1997, Stennicke et al., 1998). Les caspases activées peuvent inhiber par clivage protéolytique plusieurs protéines impliquées dans la

signalisation de la survie telles que p57^{Akt}, Raf-1, p125^{FAK} (Widmann et al., 1998; Wen et al., 1997; Gervais et al., 1998, Levkau et al., 1998, Bachelder et al., 1999; Rokudai et al., 2000) et certains homologues Bcl-2 anti-apoptotiques tels que Bcl-2 et Bcl-X_L (Xue et Horvitz, 1997; Cheng et al., 1997; Clem et al., 1998; Grandgirard et al., 1998). Ainsi, une fois le processus d'activation des caspases amorcé, il s'ensuit une cascade d'activation irréversible qui est amplifiée par des boucles de rétroaction positives.

2. Voies de signalisation impliquées dans la survie cellulaire

Les signaux extra-cellulaires ont une grande importance dans la détermination de la survie cellulaire. De tels signaux de survie viennent en autres des facteurs de croissance (ex : insuline), et/ou de l'adhésion cellulaire (Anderson, 1997; Frisch et Ruoslahti, 1997; Giancotti et Ruoslahti, 1999; Datta et al., 1999; Cross et al., 2000; Whitehead et al., 2000), et impliquent souvent des voies de signalisation communes (Anderson, 1997; Parsons et Parsons, 1997; Datta et al., 1999; Giancotti et Ruoslahti, 1999; Cross et al., 2000; Whitehead et al., 2000). Parmi les voies de signalisation impliquées dans la survie connues jusqu'à maintenant, les voies des kinases MAP (p42^{Erk-2}/p44^{Erk-1}) et de la PI 3-K/p57^{Akt} ont reçu beaucoup d'attention (figure 5) (Anderson, 1997; Datta et al., 1999, Giancotti et Ruoslahti, 1999; Cross et al., 2000). L'implication de ces voies de signalisation dans la survie varie selon le type cellulaire et selon les stimuli reçus, augmentant ainsi la complexité et la spécificité de la régulation de l'apoptose (Gajewski et Thompson, 1996; Anderson, 1997;

Figure 5. Voies de signalisation impliquées dans la survie cellulaire chez plusieurs types cellulaires. Les récepteurs à activité tyrosine kinase et les intégrines médient des voies de signalisation de survie communes : la voie des kinases MAP et la voie PI 3-K/p57^{Akt}. Au niveau de la survie médiée par l'adhésion cellulaire (intégrines), p125^{FAK} et les tyrosines kinases membres de la famille Src sont responsables de la transmission et de l'activation des voies en aval médiant les signaux de survie. Les récepteurs à activité tyrosine kinase activent ces voies de survie via la protéine adaptatrice Shc. Ces voies sont directement impliquées dans le contrôle de la survie. Par exemple, p90^{RSK}, une composant de la voie des kinases MAP et p57^{Akt}, une composante de la voie de la PI 3-kinase, sont capables de phosphoryler et d'inactiver l'homologue Bcl-2 pro-apoptotique Bad. De plus, p57^{Akt} est capable de phosphoryler la pro-caspase-9 pour la maintenir dans un état inactif.



Adams et Cory, 1998; Datta et al., 1999; Coppelino et Dedhar, 2000; Cross et al., 2000; Whitehead et al., 2000).

2.1 Voie des kinases MAP : (MEK-1/2)/(p42^{Erk-2}/p44^{Erk-1})

La voie des kinases MAP est activée par divers facteurs de croissance, cytokines, hormones, neurotransmetteurs, composantes de la matrice extracellulaire et autres stimuli. L'inhibition de l'apoptose par cette voie dépend souvent du type cellulaire impliqué ainsi que de la nature des stimuli médiant la survie. Plusieurs études suggèrent que l'activation de p42^{Erk-2}/p44^{Erk-1} protège contre des stimuli pro-apoptotiques tels que l'activation de récepteur Fas (Holmstrom et al., 1998; Yeh et al., 1998), l'absence de sérum (Xia et al., 1995; Gardner et Johnson, 1996; Kinoshita et al., 1997) et de la perturbation de l'adhésion cellulaire (anoïkose)(Le Gall et al., 2000).

Cependant, les substrats de p42^{Erk-2}/p44^{Erk-1} impliqués dans la survie ne sont pas très bien connus pour le moment. p90^{RSK}, une kinase en aval de p42^{Erk-2}/p44^{Erk-1}, est capable de phosphoryler l'homologue Bcl-2 pro-apoptotique Bad sur résidus sérine (ser-112 et ser-155) (Tan et al., 1999; Tan et al., 2000). La phosphorylation sur la sérine 155 de Bad empêche l'hétérodimérisation de celui-ci avec l'homologue Bcl-2 anti-apoptotique Bcl-X_L (Tan et al., 2000; Datta et al., 2000; Lizcano et al., 2000; Zhou et al., 2000). De plus, la phosphorylation sur la sérine 112 permet la séquestration et l'inactivation de Bad par une protéine 14-3-3 (Tan et al., 1999).

La kinase Raf-1 est un activateur en amont de p42^{Erk-2}/p44^{Erk-1}, cependant celle-ci pourrait avoir un rôle dans la suppression de l'apoptose qui est indépendant de cette fonction. En effet, la protéine anti-apoptotique BAG-1 peut amener la kinase Raf-1 à la membrane mitochondriale permettant à celle-ci de phosphoryler l'anti-apoptotique Bcl-2 pour ainsi augmenter les fonctions anti-apoptotiques de ce dernier (Wang et al., 1996). De plus, il a également été démontré que Raf-1 était également capable de phosphoryler le pro-apoptotique Bad sur résidus sérine pour l'inhiber (Zha et al., 1996). Cependant, une étude effectuée chez les cellules Rat-1 sur-exprimant c-Myc a déjà rapporté que l'activation de Raf-1 à la membrane cytoplasmique induit l'apoptose (Kauffmann-Zeh et al, 1997). Ces études supportent le concept que des protéines spécifiques impliquées dans la signalisation peuvent exercer des effets pro- ou anti-apoptotiques, dépendamment de la nature des substrats ainsi que de la localisation cellulaire (Kauffmann-Zeh et al, 1997).

2.2 Voie de la PI 3-kinase

À l'instar de la voie p42^{Erk-2}/p44^{Erk-1}, l'activité PI 3-kinase est induite par plusieurs stimuli anti-apoptotiques tels que les récepteurs de facteurs de croissance possédant une activité tyrosine kinase intrinsèque (ex : récepteur à l'insuline) (Segal et Greenberg, 1996) et également via les intégrines (suite à la liaison à leur ligand) (Clark et Brugge, 1995). Par exemple, la PI 3-kinase est recrutée au récepteur EGF et aux autres récepteurs à activité tyrosine kinase suite à la liaison de leur ligand. Initialement, il a été démontré que l'activité PI 3-kinase était requise en absence de sérum pour la survie des cellules neuronales. (Yao et al., 1995). Par la suite, il a été démontré que l'activité PI 3-kinase était requise pour la

survie d'une grande variété de types cellulaires (Wymann et Pirola, 1998; Datta et al., 1999; Chan et al., 1999; Vanhaesebroeck et Alessi, 2000). Même en absence de facteurs de croissance, des cellules transfectées avec la PI 3-kinase constitutivement active, rendent celles-ci résistantes à l'apoptose (Wymann et Pirola, 1998; Datta et al., 1999; Chan et al., 1999; Vanhaesebroeck et Alessi, 2000).

2.2.1 $p57^{Akt}$

Plusieurs études ont tenté d'identifier les cibles de PI 3-kinase impliquées dans la suppression de l'apoptose. Des études récentes montrent que l'activité de $p57^{Akt}$, qui est principalement activée par les seconds messagers de la PI 3-kinase (phosphoinositides), serait suffisante pour rendre les cellules résistantes face à l'apoptose. De nombreuses études ont démontré que des transfections de $p57^{Akt}$ constitutivement actif, et dans certains cas de $p57^{Akt}$ normal (« wild-type »), bloquent l'apoptose induite par des stimuli apoptotiques tels que l'absence de facteurs de croissance, l'irradiation aux UVs, la perturbation de l'adhésion cellulaire, la perturbation du cycle cellulaire, les dommages à l'ADN et le traitement de cellules avec un anticorps anti-Fas ou avec le TGF β (Wymann et Pirola, 1998; Datta et al., 1999; Chan et al., 1999; Vanhaesebroeck et Alessi, 2000). L'activité $p57^{Akt}$, à elle seule, est souvent suffisante pour protéger les cellules de l'apoptose en surpassant la nécessité de l'activation de la PI 3-kinase, tandis qu'un mutant $p57^{Akt}$ inactif inhibe l'effet protecteur de la PI 3-kinase. Ainsi, l'activité de $p57^{Akt}$ serait nécessaire et suffisante pour médier les fonctions anti-apoptotiques de PI 3-kinase. D'ailleurs, l'expression d'un mutant dominant

négatif de p57^{lkl} bloque l'habileté de plusieurs facteurs de croissance à promouvoir la survie (Dudek et al., 1997; Kennedy et al., 1997; Khawaja et al., 1997; Kulik et al., 1997; Songyang et al., 1997; Berra et al., 1998; Chen et al., 1998; Crowder et Freeman, 1998; Gerber et al., 1998; Kulik et Weber, 1998; Yano et al., 1998; Weiner et Chun, 1999).

L'effet protecteur de p57^{Akt} s'explique par la suppression de nombreuses composantes directement impliquées dans la machinerie apoptotique. Tout d'abord, p57^{Akt} peut phosphoryler le pro-apoptotique Bad sur les sérines 136 et 112 (Datta et al., 1997; Del Peso et al., 1997; Blume-Jensen et al., 1998; Wang et al., 1999). Comme mentionné auparavant, ces phosphorylations contribuent au recrutement de Bad par une protéine 14-3-3 qui amène Bad dans une voie de dégradation (Muslin et al., 1996; Yaffe et al., 1997). De plus, p57^{Akt} peut phosphoryler la pro-caspase 9, une caspase initiateur, pour empêcher son activation (Cardone et al., 1998). D'ailleurs, p57^{Akt} peut phosphoryler également certains facteurs de transcription de la famille « forkhead » (FKHR, FKHLI, AFX) impliqués dans l'expression de ligands apoptotiques tels que Fas et TNF α (« Tumor necrosis factor ») (Sung et al., 1991; Rhoades et al., 1992; Dockrell et al., 1998; Faris et al., 1998; Li-Weber et al., 1998; Le-Niculescu et al., 1999), pour ainsi les retenir dans le cytoplasme, et ainsi les empêcher d'aller agir sur leurs cibles transcriptionnelles dans le noyau (Brunet et al., 1999; Kops et al., 1999; Biggs et al., 1999). Enfin, p57^{Akt} peut phosphoryler CREB, E2F et NF- κ B, des facteurs de transcription qui sont impliqués dans la signalisation via l'insuline ou via des voies de signalisation impliquées dans la survie cellulaire (Kandel et Hay, 1999). Mentionnons que NF- κ B est impliqué dans l'expression de plusieurs protéines anti-apoptotiques tels que les protéines IAP1 et IAP2 (« inhibitor-of-apoptosis ») (Wang et al., 1999; Wang et al., 1998).

2.2.2 *mTOR*

L'activation de la kinase mTOR (« mammalian target of rapamycin ») est une autre conséquence de l'activité de la PI 3-kinase (Toker, 2000; Sekulic et al., 2000; Scott et al., 1998; Gingras et al., 1998). mTOR est impliqué dans le contrôle de la transcription via l'activation de composantes de la machinerie cellulaire responsable de la synthèse protéique (Brunn, G.J. et al., 1997; Gingras et al., 1998; Beretta et al., 1996; Dennis et al., 1999). Présentement, peu d'études ont démontré un rôle de mTOR dans la survie cellulaire. Cependant, une étude a déjà rapporté que la voie des kinases MAP et une voie rapamycine-sensible (présument mTOR) médient des signaux de survie Ras-dépendant chez les cellules myéloïdes (Kinoshita et al., 1997). Donc, mTOR pourrait être potentiellement impliqué dans la survie cellulaire.

3. Adhésion cellulaire et survie

3.1 $p125^{FAK}$

Pour survivre, les cellules doivent interagir avec leur matrice extracellulaire. La perte de liens entre la cellule et sa matrice induit l'apoptose dans plusieurs types cellulaires (Meredith et al., 1993; Frisch et Francis, 1994). Cette forme particulière d'apoptose est appelée anoïkose, un mot grec qui signifie "sans abri" (Frisch et Francis, 1994). Les signaux de survie cellulaire engendrés via l'adhésion cellulaire sont médiés principalement via les intégrines (figure 5), des récepteurs transmembranaires hétérodimériques composés d'une sous-unité α et d'une sous-unité β . Il existe plusieurs types d'intégrines liant ainsi un ou plusieurs constituants différents avec différentes affinités. Cependant, la survie d'un type cellulaire donné implique souvent un constituant et une intégrine spécifique. Par exemple, les cellules épithéliales de glandes mammaires entrent en anoïkose lorsqu'elles sont cultivées sur une matrice de collagène ou de fibronectine. Cependant, elles survivent lorsqu'elles sont cultivées sur une matrice de laminine ou sur une lame basale complète (Bourdreau et al., 1995). D'autres études indiquent également que les cellules ovariennes de hamster chinois (CHO) cultivées sur matrice de fibronectine sont protégées de l'anoïkose grâce à la surexpression forcée de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$, tandis que la surexpression forcée de l'intégrine $\alpha \nu \beta 1$ n'a pas cet effet (Zhang et al., 1995).

Le recrutement et l'activation de la tyrosine kinase $p125^{FAK}$ (« focal adhesion kinase ») est un événement précoce qui survient suite à la liaison de la plupart des intégrines de type

$\beta 1$ (Giancotti et Ruoslahti, 1999). La kinase $p125^{FAK}$ joue un rôle majeur dans la survie cellulaire (Frisch et al., 1996; Ilic et al., 1998). L'utilisation d'ARNm antisens $p125^{FAK}$ (Xu et al., 1996), ou l'inhibition de $p125^{FAK}$ avec un anticorps spécifique (Hungerford et al., 1996), augmentent l'incidence d'anoïkose chez plusieurs types cellulaires. De plus, l'utilisation d'un mutant de $p125^{FAK}$ constitutivement actif protège les cellules épithéliales (MDCK) de l'anoïkose et permet la prolifération en absence d'adhésion (Frisch et al., 1996). Suite à son activation, $p125^{FAK}$ s'autophosphoryle sur la tyrosine 397 permettant ainsi la transmission de signaux de survie. La phosphorylation sur la tyrosine 397 de $p125^{FAK}$ permet le recrutement de tyrosines kinases membres de la famille Src, de la sous unité régulatrice p85 de la PI 3-kinase (Chen et al., 1996) ou de la protéine adaptatrice Shc (Schlaepfer et al., 1998). De plus, suite à la liaison des tyrosines kinases membre de la famille Src à $p125^{FAK}$, celles-ci peuvent phosphoryler la tyrosine 925 de $p125^{FAK}$ créant ainsi un site de liaison pour le complexe Grb-2/mSOS menant ainsi à l'activation de la voie Ras/Raf-1/MEK-1/2/(p42^{Erk-2}/p44^{Erk-1}) (Schlaepfer et al., 1994). La liaison de Shc à $p125^{FAK}$ permet également d'activer p42^{Erk-2}/p44^{Erk-1} via le recrutement du complexe Grb-2/mSOS via Shc (Schlaepfer et al., 1998). $p125^{FAK}$ peut également activer directement la PI 3-kinase ou bien l'activer indirectement via Src (Chen et al., 1996).

3.2 Membres de la famille Src

Les membres de la famille Src sont des tyrosines kinases qui semblent jouer un rôle important dans l'adhésion cellulaire. Les tyrosines kinases de la famille Src comptent plus

de 10 membres et sont divisées en trois sous-famille selon leur distribution tissulaire. Dans la première famille il y a Src (p60^{Src}), Fyn (p59^{Fyn}) et Yes (p62^{Yes}) qui sont exprimés de façon ubiquitaire (Brown et Cooper, 1966). Dans la deuxième famille, il y a Lyn, Hck, Frg, Blk et Lck qui sont exprimés principalement au niveau des tissus hématopoïétiques (Bolen et Brugge, 1997). Finalement, il y a Rak (p54^{Rak}) et Iydk/Bsk qui sont exprimés dans les tissus épithéliaux (Lee et al., 1994; Oberg-Welsh et Welsh, 1995).

Les membres de la famille Src jouent des rôles dans plusieurs processus cellulaires tels que l'adhésion, la migration, la prolifération, le réorganisation du cytosquelette, la différenciation et la survie. Cette grande diversité d'action s'explique par le fait que ces tyrosines kinases peuvent s'associer à plusieurs types de récepteurs cellulaires et ainsi phosphoryler de nombreux substrats. Par exemple, les membres de la famille Src peuvent être activées par des récepteurs à activité tyrosine kinase (Luttrell et al., 1988), par des récepteurs couplés aux protéines G (Rodriguez-Fernandez et Rozengurt, 1996) et par les intégrines (Hirst et al., 1986). Parmi les substrats phosphorylés, il y a notamment des kinases tels que PI 3-K et p125^{FAK} et RasGAP, des protéines structurales telles que la cavéoline et des protéines adaptatrices tel que Shc (Brown et Cooper, 1996).

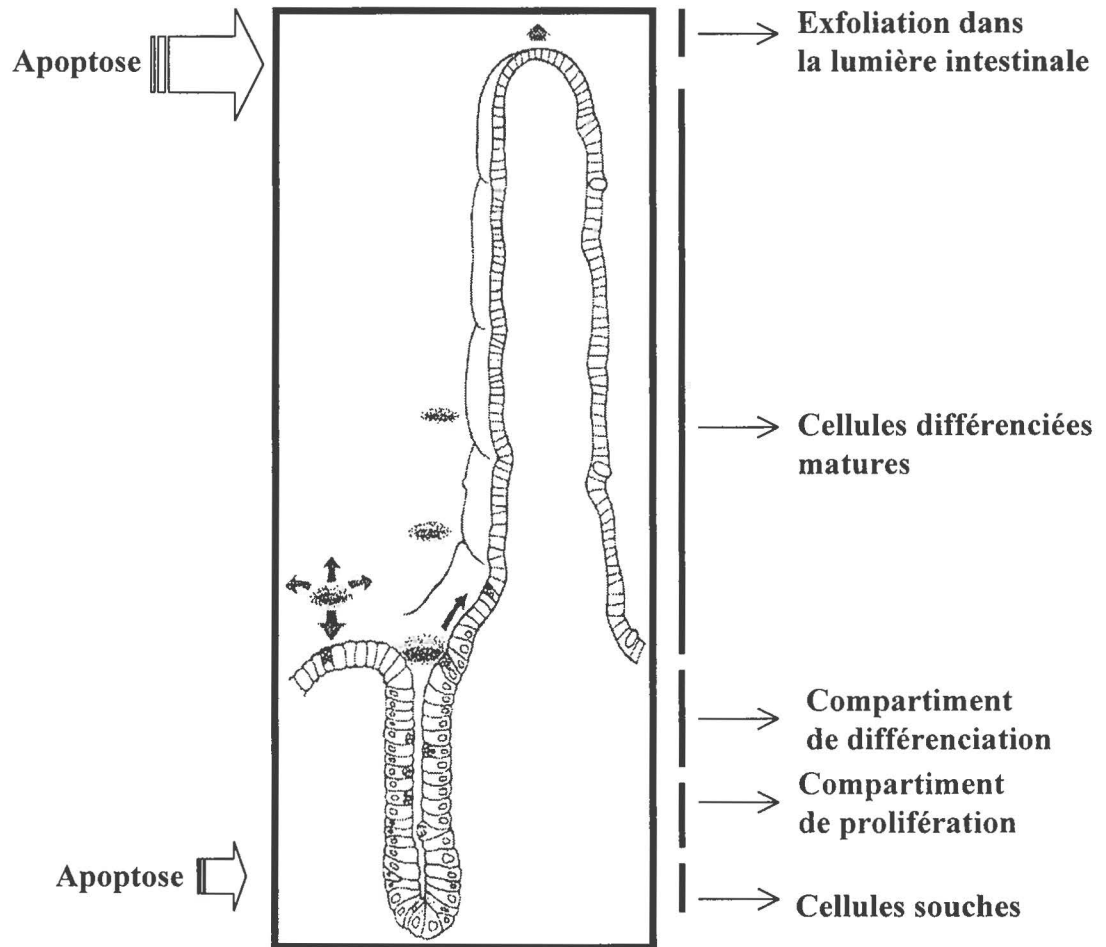
Il existe différentes façons pour les tyrosines kinases Src de médier des signaux potentiellement impliqués dans la survie (figure 5). Comme mentionné auparavant, p60^{Src} joue un rôle important dans l'activation de p42^{Erk-2}/p44^{Erk-1} via p125^{FAK}. Cependant, certaines intégrines β 1 peuvent également activer p42^{Erk-2}/p44^{Erk-1} via p59^{Fyn} en faisant intervenir la protéine adaptatrice Shc en amont du complexe Grb-2/mSOS. Dans ce cas-ci,

la cavéoline-1 sert d'intermédiaire entre p59^{Fyn} et la sous-unité α de l'intégrine concernée (Wary et al., 1998). Plus récemment, il a été démontré que p60^{Src}, couplé au récepteur à activé tyrosine kinase « VEGF-R » ou au récepteur « TRANCE-R » de type « TNF-like-R », active la voie PI 3-K/p57^{Akt} pour ainsi promouvoir la survie cellulaire (Wong et al., 1999; Eliceiri et al., 1999; Schlessinger, 2000).

4. *Épithélium intestinal*

L'épithélium de l'intestin grêle est un modèle très utile pour étudier les mécanismes impliqués dans le renouvellement tissulaire. Ce système de renouvellement cellulaire continu et rapide est composé de cellules spatialement compartimentalisées : les cellules souches à la base de la crypte, ainsi qu'un compartiment de prolifération et un de différenciation, situés respectivement dans les $\frac{1}{2}$ inférieures et supérieures de la crypte ainsi qu'un compartiment de cellules différenciées au niveau des villosités (figure 6) (Leblond, 1981; Gordon et Hermiston, 1994; Jones et Gores, 1997; Potten, 1997). Un tel "gradient" de différenciation entérocytaire le long de l'axe crypte-villosité est également plus défini par des propriétés fonctionnelles que les entérocytes pleinement différenciés possèdent et qui les distinguent des cellules cryptales (Leblond, 1981; Gordon et Hermiston, 1994; Ménard et Beaulieu, 1994). Les bases moléculaires du processus dynamique de production de cellules dans les cryptes, et de la migration de ces cellules jusqu'à l'apex des villosités, demeurent cependant mal connus (Gordon et Hermiston, 1994; Jones et Gores, 1997; Potten, 1997).

Figure 6. Compartimentalisation spatiale cellulaire et localisation de l'apoptose le long de l'axe crypte-villosité de l'épithélium intestinal humain. Les cellules souches sont situées à la base de la crypte, le compartiment de prolifération qui comprend les cellules prolifératives est situé dans la région inférieure de la crypte et le compartiment de différenciation qui comprend les cellules à divers stades de différenciation est situé au niveau de la villosité. L'apoptose au niveau de l'apex des villosités constitue un processus normal pour les entérocytes tandis que l'apoptose au niveau des cellules cryptales est peu fréquent et sert uniquement à enlever les cellules défectueuses ou endommagées.



Dans le cadre d'un processus dynamique de renouvellement épithélial tissulaire le long de l'axe crypte-villosité, les mécanismes moléculaires d'apoptose qui font partie intégrante de ce processus, sont également mal connus. Cependant, il est admis que l'apoptose au niveau de l'apex des villosités constitue un processus normal pour les entérocytes, tandis que l'apoptose au niveau des cellules cryptales est peu fréquente et sert uniquement à enlever les cellules défectueuses ou endommagées (figure 6) (Potten, 1992; Moss et Holt, 1996; Potten; 1997, Vachon et al., 2000). Cette différence apparente au niveau du devenir des entérocytes indifférenciés et différenciés suggère des mécanismes de régulation distincts de survie le long de l'axe crypte-villosité (Potten, 1992; Moss et Holt, 1996; Potten; 1997, Gauthier et al., 2001;). Ce concept est d'ailleurs supporté par les observations suivantes : 1) l'augmentation notable de l'apoptose cryptale par rapport à l'apoptose villositaire, chez les rongeurs, suite à l'irradiation ou à la présence d'agents chimiothérapeutiques (Potten, 1992; Hall et al., 1994; Merritt et al., 1995; Hirose et al., 1997; Potten, 1997; Pritchard et al., 1999); 2) le constat, chez les souris « knout-out » $bcl-2^{-/-}$ et $bax^{-/-}$, d'une incidence d'apoptose différentielle le long de l'axe crypte-villosité (Wilson et Potten, 1996; Potten, 1997; Pritchard et al., 1999) et 3); l'expression différentielle des homologues Bcl-2 le long de l'axe crypte villosité (Vachon et al., 2000; LeBrun et al., 1993; Krajewski et al., 1994b, 1994c, 1995; Wang et al., 1996; Adams et Cory, 1998; Inohara et al., 1998; Song et al., 1999).

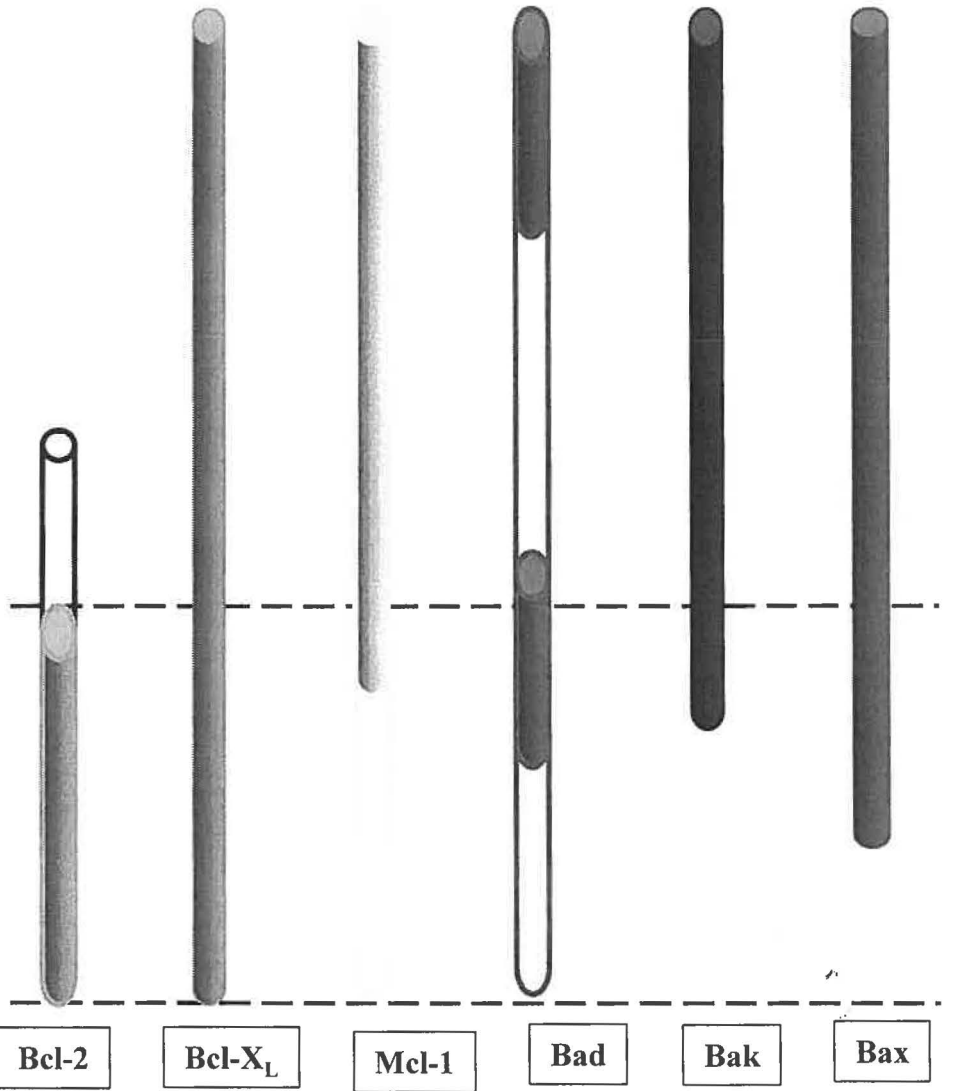
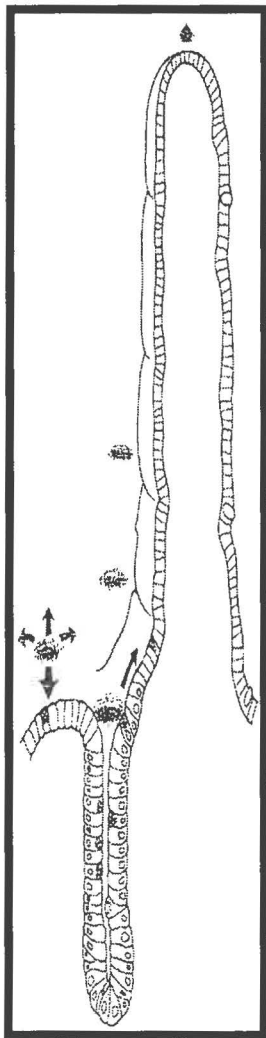
Étant donné que les homologues Bcl-2 sont impliqués dans le contrôle de l'apoptose et jouent un rôle clef dans la survie, plusieurs autres études ont montré des évidences selon lesquelles certains homologues Bcl-2 pourraient jouer des rôles cruciaux dans le

développement et/ou dans le maintien de certains tissus (Vachon et al., 2000; LeBrun et al., 1993; Krajewski et al., 1994b, 1994c, 1995; Hale et al., 1996; White, 1996; Jacobson et al., 1997; Adam et Cory, 1998; Metcalfe et al., 1999). Présentement, il existe peu d'études portant sur l'expression différentielle des homologues Bcl-2 le long de l'axe crypte-villosité de l'intestin grêle humain. Cependant, une étude récente a démontré que la présence de patrons différentiels d'expression des homologues Bcl-2 *in vivo* le long de l'axe crypte-villosité de l'intestin grêle humain est jumelée à une incidence d'apoptose différentielle le long de l'axe (figure 7) (Vachon et al., 2000). Étant donné l'implication des homologues Bcl-2 dans la lutte pour la survie, la caractérisation individuelle du profil d'expression de ces derniers le long de l'axe crypte-villosité devient essentielle pour comprendre le contrôle de l'apoptose au niveau moléculaire dans des tissus spécifiques lors du développement et/ou dans un processus de renouvellement tissulaire.

5. Modèle in vitro de différenciation entérocytaire humaine

Pour le moment, il n'existe aucun modèle cellulaire *in vitro* capable de reconstituer pleinement le processus de différenciation le long de l'axe crypte-villosité humaine. Les cellules HIEC (« human intestinal epithelial cells ») sont des cellules de la crypte qui ne peuvent être induites à se différencier (Perreault et Beaulieu, 1996). Ces cellules sont utiles pour des études portant sur la régulation de la prolifération entérocytaire. Il existe également les cultures primaires d'entérocytes normaux pleinement différenciés comme les PCDE (« Primary cultures of differentiated enterocytes ») (Perreault et Beaulieu, 1998). Étant donné leur incapacité à proliférer due à l'absence de cellules prolifératives, les PCDE

Figure 7. Distribution des homologues Bcl-2 le long de l'axe crypte-villosité de l'intestin grêle fœtal humain (18-20 sem). Nous observons pour les homologues Bcl-2 anti-apoptotiques : Bcl-2, Bcl-X_L et Mcl-1 et pour les pro-apoptotiques : Bax, Bak et Bad, des profils d'expression différentiels le long de l'axe crypte-villosité.



Bcl-2

Bcl-X_L

Mcl-1

Bad

Bak

Bax

peuvent être maintenues seulement en tant que cultures primaires, et pour de très courtes durées (Pageot et al., 2000). Il existe également les cellules tsFHI (« temperature-sensitive fetal human intestinal cells ») qui ont été transformées à l'aide d'un antigène SV40 thermo-sensible (Quaroni et Beaulieu, 1997). À la température permissive (32°C), les tsFHI prolifèrent et exhibent la présence de marqueurs de cellules cryptales. À la température non-permissive (39°C), les cellules cessent irréversiblement de proliférer et acquièrent un phénotype de cellules plus différenciées (Quaroni et Beaulieu, 1997; Pageot et al., 2000).

Les cellules de la lignée Caco-2 représentent un excellent modèle *in vitro* pour l'étude de la régulation de la différenciation entérocytaire (Beaulieu et Quaroni, 1991; Vachon et Beaulieu, 1992; Vachon et al., 1996). Les cellules Caco-2 sont une lignée provenant d'un adénocarcinome de côlon humain (Fogh et al., 1977). De plus, parmi toutes les lignées cellulaires de ce type établies jusqu'à maintenant, les cellules Caco-2 sont uniques dans leur propriété à pouvoir initier leur différenciation dès l'atteinte de la confluence, acquérant ainsi (après 20-30 jours post-confluence) un degré de différenciation entérocytaire morphologique et fonctionnel qui s'apparente fortement au phénotype de l'entérocyte pleinement différencié (Pinto et al., 1983; Zweibaum et Chantret, 1989; Vachon et Beaulieu, 1992; Vachon et al., 1996). Durant ce processus, la prolifération cellulaire diminue et les cellules atteignent un nombre stationnaire (Pinto et al., 1983; Zweibaum et Chantret, 1989; Beaulieu et Quaroni, 1991; Jumarie et Malo, 1991). Chez les cellules Caco-2, l'acquisition graduelle des caractéristiques d'entérocytes différenciés à partir de l'atteinte de la confluence est reconnue comme étant un processus hautement régularisé (Zweibaum et Chantret, 1989; Ménard et Beaulieu, 1994). Pour nos études, nous avons utilisé les Caco-2/15, un clone (provenant de

NOTE TO USERS

Page(s) not included in the original manuscript are unavailable from the author or university. The manuscript was microfilmed as received.

29

This reproduction is the best copy available.

UMI

6. *Hypothèse et objectifs*

Étant donné 1) qu'il existe des différences au niveau de l'incidence de l'apoptose entre les cellules de la crypte et les cellules de la villosité suite aux irradiations, et 2) qu'il existe des patrons différentiels d'expression des homologues Bcl-2 le long de l'axe crypte-villosité chez l'homme, notre hypothèse est que *l'apoptose entérocytaire humaine serait soumise à une régulation distincte selon l'état de différenciation cellulaire*. Les objectifs spécifiques du présent projet de recherche nous permettant de vérifier notre hypothèse sont les suivants :

- 1) Établir le profil d'expression des homologues Bcl-2 au cours de la différenciation entérocytaire;
- 2) Identifier les voie(s) de signalisation importante(s) pour la survie entérocytaire;
- 3) Vérifier l'aspect différentiel de l'implication des voies de signalisation en fonction de l'état différencié ;

et ce, à l'aide de la lignée cellulaire Caco-2/15, un modèle *in vitro* de différenciation entérocytaire humaine. La lignée cellulaire Caco-2/15, un clone provenant de la lignée parentale Caco-2, a déjà été amplement caractérisée (Beaulieu et Quaroni, 1991; Vachon et Beaulieu, 1992; Vachon et al., 1996).

II-MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. *Culture cellulaire*

La lignée cellulaire Caco-2/15, un clone qui provient de la lignée parentale Caco-2 (HTB27; American Type Culture Collection, Rockville, MD), nous a été gracieusement donnée par le Dr J.-F. Beaulieu (Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC). Ces cellules ont été cultivées dans un milieu de culture DMEM (Gibco BRL, Burlington, Ont.) supplémenté de 10 % (v/v) de sérum de veau fœtal (ICN biomedicals, Aurora, OH), d'antibiotiques (50 U/ml de pénicilline et 50 ug/ml de streptomycine), de 4 mM de glutamine et de 20 mM HEPES (Gibco BRL). Les cellules ont été incubées à 37 °C sous une atmosphère humide composée de 95 % d'air et de 5 % CO₂. Le milieu étant changé au 48 heures jusqu'au niveau de confluence désiré.

2. *Incubation avec les différents inhibiteurs*

Dans le but d'identifier des voies de signalisation impliquées dans la survie des cellules Caco-2/15 selon leur état indifférencié ((-2 jours post-confluence (PC)) ou pleinement différencié (30 jours PC), nous avons utilisé différents inhibiteurs pharmacologiques inhibant des molécules et/ou des voies de signalisation connues pour promouvoir la survie dans plusieurs types cellulaires. Les inhibiteurs et/ou les facteurs de croissance utilisés ont été ajoutés à du milieu sans sérum (milieu DMEM supplémenté ne contenant pas de sérum) pré-chauffé à 37 °C. Avant chaque traitement, les Caco-2/15 étaient

lavées 2 fois avec du milieu sans sérum pour enlever les constituants du sérum déposés. Finalement, après dissolution des différents inhibiteurs et facteurs de croissance dans le milieu sans sérum, ceux-ci ont été utilisés pour remplacer le milieu standard de culture. La durée des traitements était de 48 heures.

2.1 *Inhibiteurs pharmacologiques utilisés*

La génistéine (Sigma), inhibiteur à large spectre des tyrosines kinases, a été utilisé à une concentration de 150 μM (Miyamoto et al., 1995 ; Anderson, 1997). Nous avons de plus utilisé l'herbimycine A (Sigma, Oakville, Ont.), un inhibiteur des tyrosines kinases de la famille Src, à une concentration de 1 μM (Park et al., 1991, Parsons et Parsons, 1997). Suite à une courbe dose-réponse (données non-illustrées) effectuée avec le PD98059 (Calbiochem), nous avons déterminé que la concentration effective pour qu'il y ait induction d'apoptose (visualisation d'échelle internucléosomique) suite à l'utilisation de cet inhibiteur sélectif de MEK-1 et -2, un activateur en amont de $\text{p42}^{\text{Erk-2}}/\text{p44}^{\text{Erk-1}}$, se situait à 20 μM (Dudley et al., 1995 ; Allesi et al., 1995 ; Scheid et al., 1999 ; Boucher et al., 2000 ; Le Gall et al., 2000). Suite à l'établissement d'une courbe dose-réponse (donnée non-illustrées) effectuée avec le LY294002 (Calbiochem), nous avons déterminé que la concentration effective pour qu'il y ait induction d'apoptose (visualisation d'échelle internucléosomique) suite à l'utilisation de cet inhibiteur spécifique de la PI 3-kinase, se situait à 30 μM (Rosen et al., 1998 ; Rosen et al., 2000 ; Vlahos et al., 1994 ; Datta et al., 1999 ; Le Gall et al., 2000). La rapamycine (Sigma), inhibiteur de la kinase mTOR, a été utilisé à une concentration de

20 ng/ml, une concentration couramment utilisée (Aagaard-Tillery et al., 1994 ; Abraham, 1998 ; Datta et al., 1999). Enfin, la cytochalasine D (Sigma), un agent qui affecte la signalisation reliée à l'adhésion en inhibant en outre la tyrosine kinase p125^{FAK} a été utilisée à 1 µM (Lipfert et al., 1992 ; Oktay et al., 1999 ; Wary et al., 1999).

Tableau 1. Inhibiteurs pharmacologiques utilisés

Inhibiteurs	Kinases inhibée	Concentration utilisée	Source
Génistéine	TKs	150 µM	Sigma
Cytochalasine D	FAK	1 µM	Sigma
Herbimycine A	TKs Src	1 µM	Sigma
PD 98059	MEK 1-2	20 µM	Calbiochem
Ly 294002	PI-3 kinase	30 µM	Calbiochem
Rapamycine	mTOR	20 ng/ml	Sigma

Les traitements comprenaient aussi la présence d'insuline (10 ng/ml), un facteur de survie bien connu (Ménard et Arsenault, 1985; 1987; Ménard, 1989), dans du milieu sans sérum (contrôle), le milieu sans sérum seul et le milieu en présence de sérum 10 % (conditions habituelles de culture).

3. Détection de la dégradation de l'ADN internucléosomiques sur gel d'agarose

L'impact des différents inhibiteurs sur la survie cellulaire a été évalué par détection de la dégradation de l'ADN internucléosomiques (une caractéristique de l'apoptose) sur gel d'agarose. Le protocole utilisé était une version légèrement modifiée de la technique décrite par Frisch et al. (1994). Dans la première étape de ce protocole, le milieu de culture et les cellules ont été récupérés dans un tube de 12 ml et centrifugé à 2000 rpm dans une centrifugeuse Centra CL3R (International Equipment Company (IEC), Needham Height, MA) pendant 5 minutes. Ensuite, le surnageant a été décanté et le culot rincé doucement avec du PBS 1X. Les cellules ont été de nouveau centrifugées selon les conditions décrites auparavant et ont subi un autre lavage au PBS 1X. Dans la seconde étape, 600 µl de tampon de lyse (0.5 % Triton X-100, 10 mM TRIS, 10 mM EDTA) ont été ajoutés aux cellules contenues dans le tube de 12 ml. Le lysat a été ensuite transféré dans un microtube (Sarstedt) puis lysé pendant 20 minutes sur glace (4 °C). Pour les extractions, 2 pétris de 100 mm ont été utilisés pour les cellules sous-confluentes et un seul pétri pour les cellules post-confluentes. Ensuite, les échantillons ont été centrifugés à 13 000 rpm pendant 30 minutes à 4 °C (microfugeuse Micro 12 ; Fischer Scientific, Nepean, Ont.). Par la suite, le surnageant de chaque microtube a été respectivement transféré dans un nouveau microtube, trois extractions phénol(25)/chloroforme(24)/isoamyl(1) (Fischer Scientific) ont été effectuées. Après les trois extractions, 380 µl de la phase aqueuse ont été récupérés pour chaque échantillon, auxquels 40 µl d'acétate de sodium (3 M, pH 8), 1.5 µl de glycogène (20 mg/ml) et 1 ml d'éthanol 100 % ont été rajoutés. La précipitation de l'ADN a été effectuée toute la nuit à 4 °C. Suite à une centrifugation à 13 000 rpm pendant 15 minutes (4 °C), les

culots d'ADN obtenus ont été lavés avec 500 µl d'éthanol 70 % (-20 °C) puis séchés à l'air ambiant sous hotte. Ils ont ensuite été resuspendus dans 30 µl de TE (Tris 10 mM pH 8, 1 mM EDTA) et incubés en présence de 80 µg/ml d'ARNase A (Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, Qc) pendant 1 heure à 37°C. Les contenus en ADN des échantillons ont été mesurés par spectrophotométrie (Genesis 5 ; Milton Roy, Rochester, NY) à 260 nm et 20 µg de chaque échantillon ont été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose (BIO-RAD, Hercules, CA) 1,5% contenant 0,0001% de bromure d'éthidium (Fischer Scientific). L'électrophorèse a été effectuée à 100 V dans un tampon TAE (40 mM Tris, 0,2 % acide acétique glacial et 1mM EDTA) qui a également été utilisé pour dissoudre l'agarose. Finalement, le gel a été photographié sous UV grâce à un trans-illuminateur et à une caméra digitale « Alpha Imager 1200 Documentation and Analysis system » (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA).

4. Analyse western blot

4.1 Solubilisation des protéines

Une fois le milieu de culture enlevé, les cellules (pétri de 100 mm) ont été lavées à deux reprises avec du PBS 1X. Par la suite, 300 µl de tampon de solubilisation Laemmli (Tris-HCl 125 mM [pH 6,8], 0,23 % de SDS, 10 % de glycérol, 0,005 % de bleu de bromophénol (Sigma) et 5 % de β-mercatoéthanol (BIO-RAD)) ont été ajoutés pour chaque pétri de 100 mm contenant des cellules sous-confluentes (et 1 ml dans les autres cas). Les échantillons ont été récupérés dans un microtube, soniqués sur glace (Ultrasonic processor ;

Mandel Scientific, St-Laurent, Qc) 4 fois pendant 5 secondes puis chauffés à 100 °C (Standard Heatblock, ; VWR Canlab, Ville Mont-Royal, Qc) pendant une période de 5 minutes. Finalement, les débris cellulaires restants ont été éliminés suite à une centrifugation de 10 minutes à 13 000 rpm (microfugeuse Micromax ; IEC) et les surnageants ont été conservés à -20 °C.

4.2 *Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)*

Suite au dosage selon la méthode modifiée de Lowry (Peterson G.L., 1977), cinquante microgrammes de protéines ont été prélevés pour chaque échantillon, puis ceux-ci ont été chauffés à 100°C pendant 5 minutes et centrifugés avant d'être séparés sur gel de polyacrylamide dénaturant 4-15 % ou 15 % (Ready gel Tris 15 % ; BIO-RAD). Un marqueur de poids moléculaire coloré a également été déposé sur le gel (7,2-212 kD Broad Range ; BIO-RAD). L'électrophorèse a été effectuée à 100 volts dans un tampon composé de 25 mM Tris, 0,1 % SDS et 192 mM glycine. Une fois la migration complétée, les protéines ont été soumises à un électrotransfert liquide (100 V, 1 heure) sur une membrane de nitrocellulose (Gibco BRL) pré-incubée 10 minutes dans le tampon de transfert (25 mM Tris, 192 mM glycine et 20 % méthanol). L'efficacité du transfert a été vérifiée par coloration de la membrane au rouge de Ponceau (Sigma) 0,2 %. Les membranes ont été ensuite décolorées dans du PBS 1X contenant 0,05 % de tween-20 (BIO-RAD).

4.3 Immunodétection des protéines (*Western Blot*)

Les membranes ont d'abord été saturées en protéines (blocage) grâce à une incubation minimale d'une heure dans une solution de lait écrémé en poudre 10 % dissout dans le PBS/tween-20 0,05 % (blotto). Les membranes ont ensuite été incubées, selon l'anticorps utilisé, dans la solution d'anticorps primaire (diluée dans le blotto), pour une période de 16 heures à 4 °C, ou soit pour des périodes variant de 1 à 3 heures à température de la pièce. Par la suite, les membranes ont été soumises à quatre lavages de 10 minutes sous agitation dans une solution de PBS/tween-20 0,05 %. Cette étape a été suivie d'une incubation d'une heure à la température de la pièce avec la solution d'anticorps secondaire couplés à la peroxydase diluée dans le blotto. Les membranes ont alors été lavées 2 fois avec la solution PBS/tween-20 0,05 % et 2 fois avec du PBS seul, pour des périodes de 10 minutes. Les bandes immunoréactives ont finalement été révélées par l'ajout de la solution ECL (Amersham Life Science, Piscataway, NJ), suivi d'expositions sur des films « Hyper film ECL » (Amersham Life Science).

4.3.1 *Anticorps primaires utilisés*

A) *Anticorps polyclonaux produits chez le lapin.*

Les anticorps polyclonaux dirigés contre Bcl-2 (1701) (Krajewski et al., 1994a), Bax (Ab 1712) (Krajewski et al., 1994b) (PC66) (Calbiochem), Bcl-X_L (Ab 1695-5) (Krajewski et al., 1994c), Bak (Ab 1764) (Krajewska et al. 1996 ; Krajewski et al. 1996), Mcl-1 (Ab

1682) (Krajewski et al. 1994a, 1995) nous ont été gracieusement fournis par le Dr J.C. Reed (The Burham Institute, La Jolla, CA). Nous avons également utilisé les anticorps polyclonaux dirigés contre p59^{Fyn} (Ab FYN3) et p125^{FAK} (Ab C-903) (Santa Cruz); pp42/pp44 (Ab 9101), p42/p44 (Ab 9102), pp57^{Akt} (Ser473) (Ab 9271); p57^{Akt} (Ab 9272) et CASP-7 (Ab 9492) (NEB); et pp125^{FAK} (Tyr397) (Ab 07-012) (Upstate Biotechnology).

B) *Anticorps monoclonaux d'origine de souris*

Nous avons utilisé des anticorps monoclonaux dirigés contre Bad (mAb 48) (Transduction Laboratories, Missisauga, Ont.), la cytokératine 18 (mAb CY-90) (Sigma), les phosphotyrosines (mAb PY99) (Santa Cruz), p54^{Rak} (mAb VH55) gracieusement donné par Dr. W.G. Cance (University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC) et p60^{Src} (mAb 327) gracieusement donné par Dr. J.S. Brugge (Harvard Medical School, Boston, MA).

Tableau 2. Anticorps dirigés contre les homologues Bcl-2 utilisés pour les analyses Western blot

Anticorps primaire					
Anticorps	Type	Protéine reconnue	Espèce	Dilution	Source
Ab 1701	Polyclonal	Bcl-2	humain	1/1000	J.C. Reed
Ab 1712	Polyclonal	Bax	humain	1/1000	J.C. Reed
Ab 1695-5	Polyclonal	Bcl-X _L	humain souris	1/1000	J.C. Reed
Ab 1682	Polyclonal	Mcl-1	humain	1/1000	J.C. Reed
Ab 1764	Polyclonal	Bak	humain	1/1000	J.C. Reed
mAb 48	Monoclonal	Bad	humain	1/500	Transduction Laboratories

Tableau 3. Anticorps de voies de signalisation utilisés pour les analyses Western blot

Anticorps primaire					
Anticorps	Type	Protéine reconnue	Espèce	Dilution	Source
Ab FYN 3	Polyclonal	p59 ^{Fyn}	rat souris humain	1/1000	Santa cruz
Ab c-903	Polyclonal	p125 ^{FAK}	humain souris rat	1/3000	Santa Cruz
Ab 07-012	Polyclonal	pp125 ^{FAK}	humain souris rat	1/500	Upstate Biotechnology
Ab 9102	Polyclonal	p42/p44	humain souris rat	1/1000	NEB
Ab 9101	Polyclonal	pp42/pp44	humain souris rat	1/1000	NEB
Ab 9271	Polyclonal	p57 ^{Akt} (Ser 473)	humain souris rat	1/1000	NEB
Ab 9492	Polyclonal	CASP-7 et CASP-7 clivée	humain souris, rat	1/1500	NEB
Ab 9272	Polyclonal	p57 ^{Akt}	humain souris, rat	1/1000	NEB
mAb CY90	Monoclonal	K18	humain	1/10 000	Sigma
mAb 327	Monoclonal	p60 ^{Src}	humain	1/1000	J.S. Brugge
mAb VH55	Monoclonal	p54 ^{Rak}	humain	1/2	W.G. Cance
mAb PY99	Monoclonal	p-tyrosines		1/250	Santa Cruz

4.3.2 *Anticorps secondaires*

Nous avons utilisé les anticorps secondaires couplés à la peroxydase NA 9340 (Amersham) dirigés contre des IgG de lapin et NA 931 (Amersham) dirigé contre des IgG de souris.

4.4 *Immunodécapage des membranes*

Pour certaines expériences d'analyse en Western Blot, les membranes ont été immunodécapées, suite à une première utilisation, par une incubation de 20 minutes à température de la pièce dans une solution de 100 mM glycine à pH 2,9. Ensuite les membranes ont été lavées à trois reprises pendant 5 minutes avec du PBS. Le Western Blot subséquent a été amorcé à l'étape du blocage (avant l'incubation avec l'anticorps primaire).

4.5 *Analyses densitométriques et statistiques*

Puisque la réponse des films aux photons est non-linéaire, les bandes ont été estimées par densitométrie grâce au « Alpha Imager 1200 Documentation and Analysis system » (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA). L'aire sous la courbe a été évaluée pour chaque bande. Pour chaque traitement, les niveaux d'expression relatifs des molécules analysées ont été évalués par rapport à ceux des cultures contrôles en déterminant l'aire totale sous le pic (AU×mm) en vue d'établir le ratio traitement/contrôle×100 (étant exprimé

comme le "% du contrôle"). Les données obtenues représentent la moyenne \pm SEM d'au moins trois expériences i.e. trois séries d'échantillons distincts ($n \geq 3$). L'erreur sur les valeurs est le SEM (« Standard error on mean »). Les différences statistiquement significatives ont été obtenus pour un intervalle de confiance de 95% ($0.001 \leq p \leq 0.01$) grâce au « Student t Test ».

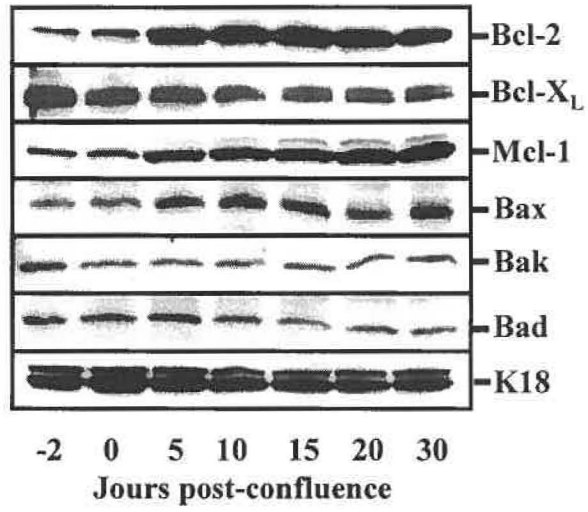
III-RÉSULTATS

1. Expression différentielle des homologues Bcl-2 selon l'état de différenciation entérocytaire

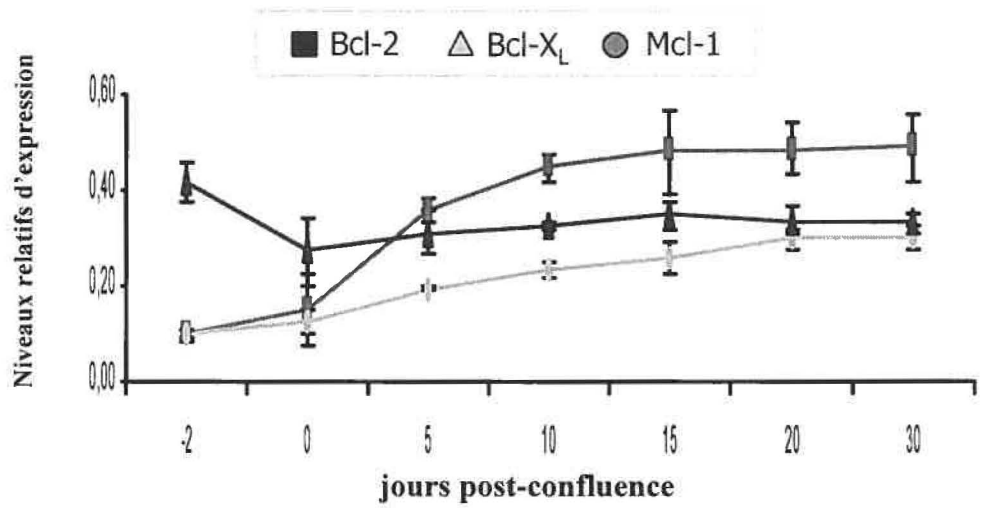
Dans un premier temps, nous avons analysé par Western Blot l'expression des homologues Bcl-2 au cours de la différenciation entérocytaire des cellules Caco-2/15. Pour chacun des différents homologues Bcl-2 étudiés, nous observons l'établissement d'un profil distinct d'expression. Pour les homologues anti-apoptotiques, nous observons : 1) une augmentation d'expression de Bcl-2 à partir de l'atteinte de la confluence qui atteint un plateau à 10 jours PC (figures 8A et 8B) (l'augmentation entre -2 et 30 jours PC est statistiquement significative) ; 2) une baisse non significative de l'expression de Bcl-X_L à l'atteinte de la confluence qui se maintient par la suite à des niveaux stables pour le reste du processus de différenciation (figures 8A et 8B); et 3) une augmentation graduelle de Mcl-1 au cours de la différenciation (figures 8A et 8B) (l'augmentation entre -2 et 30 jours PC est statistiquement significative). Pour ce qui est des homologues pro-apoptotiques, nous observons : 1) des augmentations successives de Bax au cours de la différenciation entre -2 et 5 et entre 20 et 30 jours PC (figures 8A et 8C) (l'augmentation entre -2 et 30 jours PC est statistiquement significative); 2) une baisse d'expression significative de Bak entre -2 et 0 jours, suivie d'une augmentation graduelle qui n'atteint cependant jamais les niveaux de départ (figures 8A et 8C) (la différence d'expression entre -2 et 30 jours PC n'est pas statistiquement significative); et 3) une baisse d'expression de Bad à l'atteinte de la confluence, suivie d'une stabilisation des niveaux d'expression jusqu'à 30 jours PC (figures

Figure 8. Établissement de profils distincts d'expression d'homologues Bcl-2 au cours de la différenciation entérocytaire humaine. (A) Les cellules Caco-2/15 ont été cultivées à divers stades de différenciation (-2, 0, 5, 10 , 15, 20 et 30 jours PC) en présence de 10% de sérum, puis lysées dans le tampon de Laemmli pour séparation des protéines par SDS-PAGE (15%). Suite à un électrotransfert sur membrane de nitrocellulose, un immunobuvardage a été effectué avec des anticorps spécifiques pour différents homologues Bcl-2 : 1) anti-apoptotiques : Bcl-2 (~26 kD), Bcl-X_L (~28-30 kD) et Mcl-1 (~39-42 kD) et 2) pro-apoptotiques : Bax (~21 kD), Bak (~25-28 kD) et Bad (~28-32 kD). Un anticorps dirigé contre la cytokératine 18 (K18) a été utilisé pour vérifier l'équité en quantité de protéines pour chaque échantillon. (B) Les protéines ont été scannées, puis les niveaux d'expression des protéines ont été évalués par rapport aux niveaux de cytokératine 18 (K18) en déterminant l'aire totale sous le pic (AU×mm) pour établir le ratio [(homologue Bcl-2/K18) ×100%] (% du contrôle). Les points reliés par la courbe représentant la moyenne ± SEM (« standard error on mean ») pour chaque stade de différenciation pour au moins 3 expériences séparées (n≥3).

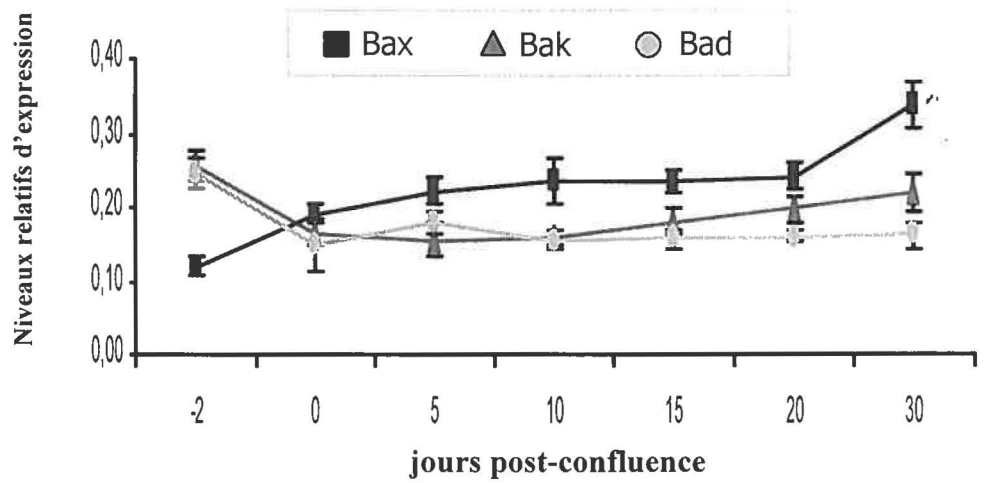
A



B



C



8A et 8C) (la diminution entre -2 et 30 jours PC est statistiquement significative). Ces observations montrent l'établissement d'un patron d'expression différentiel pour ces homologues Bcl-2 au cours de la différenciation, indiquant ainsi que les entérocytes différenciés expriment un profil d'expression distinct de celui des cellules indifférenciées, similairement à la situation retrouvée *in vivo* au niveau de l'axe crypte-villosité.

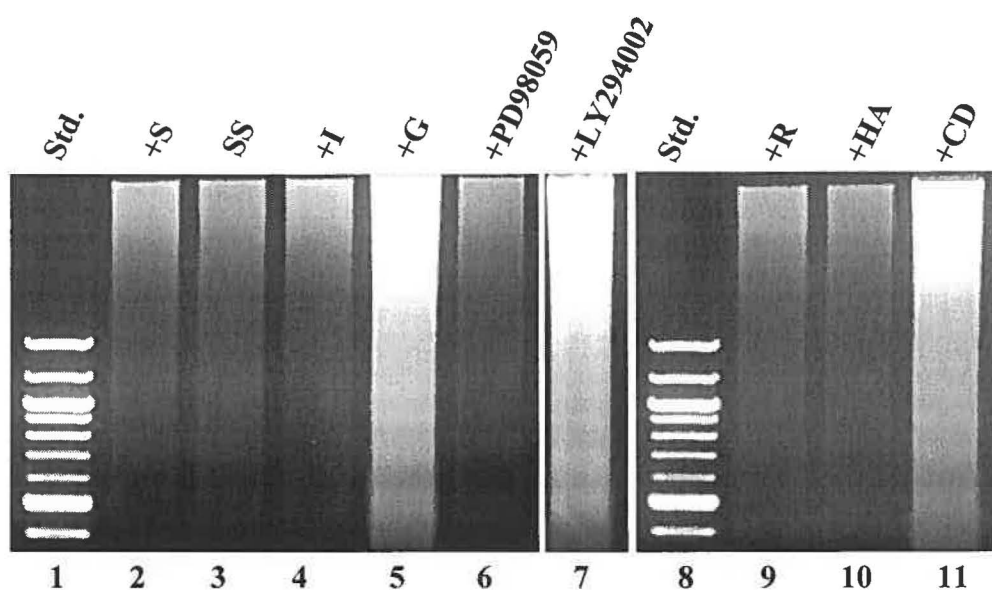
2. Effets de l'absence de sérum sur la survie entérocytaire

2.1 Traitements

Dans le but d'identifier des voies de signalisation importantes pour la survie chez les cellules Caco-2/15, nous avons utilisé différents inhibiteurs pharmacologiques des voies de signalisation reconnues pour promouvoir la survie cellulaire. Nos traitements de 48 heures ont été effectués chez des cellules indifférenciées (-2 PC) et chez des cellules pleinement différenciées (30 PC). L'induction d'apoptose a été visualisée par la présence d'un échelonnage de l'ADN internucléosomique et par la détection de la caspase-7 effectrice sous sa forme active (clivée). Enfin, nous avons analysé l'effet de nos traitements sur l'expression des homologues Bcl-2.

Figure 9. Implication différentielle de voies et/ou de molécules de signalisation dans la survie entérocytaire humaine selon l'état de différenciation cellulaire. (A et B) Visualisation de la fragmentation de l'ADN internucléosomique sur gel d'agarose 1.5% (20 µg d'ADN/puit). (A) Les cellules Caco-2/15 indifférenciées (-2 jours PC) ont été incubées pendant 48 heures en présence de sérum 10% (+S), en absence de sérum (SS), en présence de 10 µg/ml d'insuline (+I), en présence de 150 µM de génistéine (+G), en présence de 20 µM de PD98059 (+PD), en présence de 30 µM de LY294002 (+LY), en présence de 20 ng/ml de rapamycine (+R), en présence de 1µM d'herbimycine A (+HA), ou en présence de 1 µM de cytochalasine D (+CD). La génistéine (piste 5), le LY294002 (piste 7) et la cytochalasine D (piste 11) induisent l'apoptose chez les cellules Caco-2/15 indifférenciées. (B) Les cellules Caco-2/15 différenciées (30 jours PC) ont été incubées pendant 48 heures en présence de sérum 10% (+S), en absence de sérum (SS), en présence de 10 µg/ml d'insuline (+I), en présence de 150 µM de génistéine (+G), en présence de 20 µM de PD98059 (+PD), en présence de 30 µM de LY294002 (+LY), en présence de 20 ng/ml de rapamycine (+R), en présence de 1µM d'herbimycine A (+HA) et en présence de 1 µM de cytochalasine D (+CD). La génistéine (piste 5), le PD98059 (piste 6), le LY294004 (piste 7), et la cytochalasine D (piste 11) induisent l'apoptose chez les cellules Caco-2/15 différenciées. (A et B) Tous les traitements, exception du traitement avec sérum (+S), ont été effectués en absence de sérum. Les pistes 1 et 8 représentent les standards de poids moléculaire d'ADN. Abréviations : Std.= standard de poids moléculaire d'ADN.

A



B

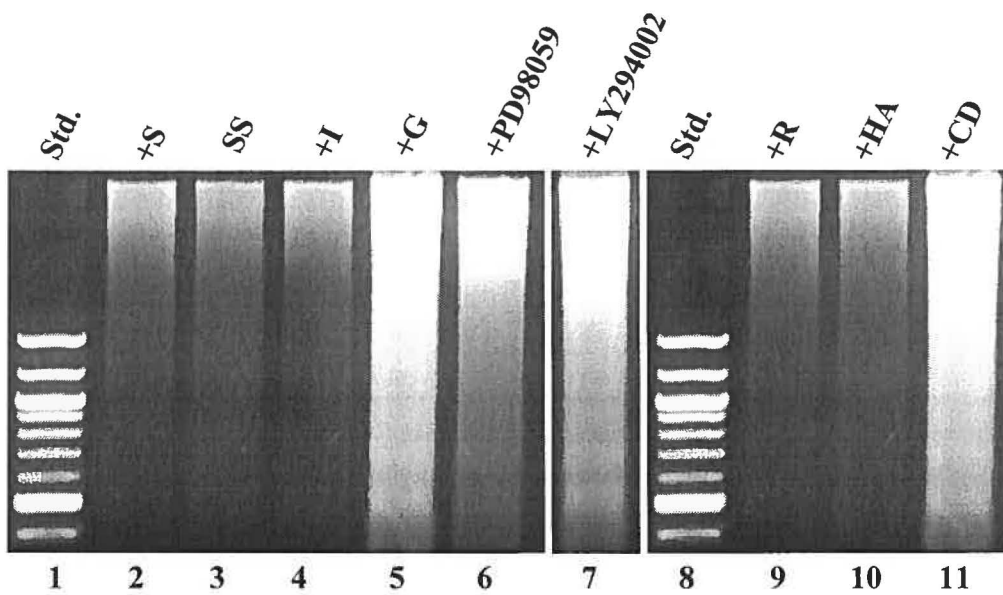


Figure 10. Activation de la caspase-7 suite aux traitements en fonction de l'état de différenciation entérocytaire. (A) Niveaux relatifs de la caspase-7 clivée à -2 jours PC et à 30 jours PC suite à un traitement de 48 heures : en présence de 10 % de sérum (+S), en absence de sérum (SS); en présence de 150 μ M de génistéine (+G), en présence de 1 μ M de cytochalasine D (+CD), en présence de 1 μ M d'herbimycine A (+HA), en présence de 20 μ M de PD98059 (+PD), en présence de 30 μ M de LY294002 (+LY), ou en présence de 10 μ g/ml d'insuline (+I). Les protéines totales ont été lysées dans le tampon de Laemmli, puis séparées par SDS-PAGE (4-15%). Suite à un électrotransfert sur membrane de nitrocellulose. Un immunobuvardage a été effectué pour la détection de la forme clivée de la caspase-7. Un anticorps dirigé contre la cytokératine 18 (K18) a été utilisé pour vérifier l'équité en quantité de protéines pour chaque échantillon.

A

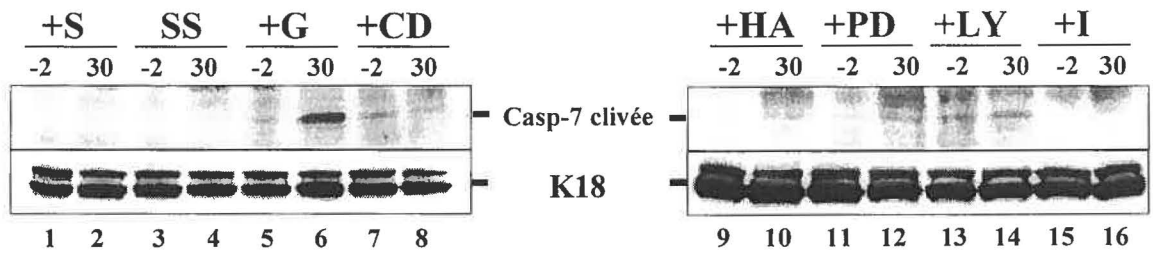
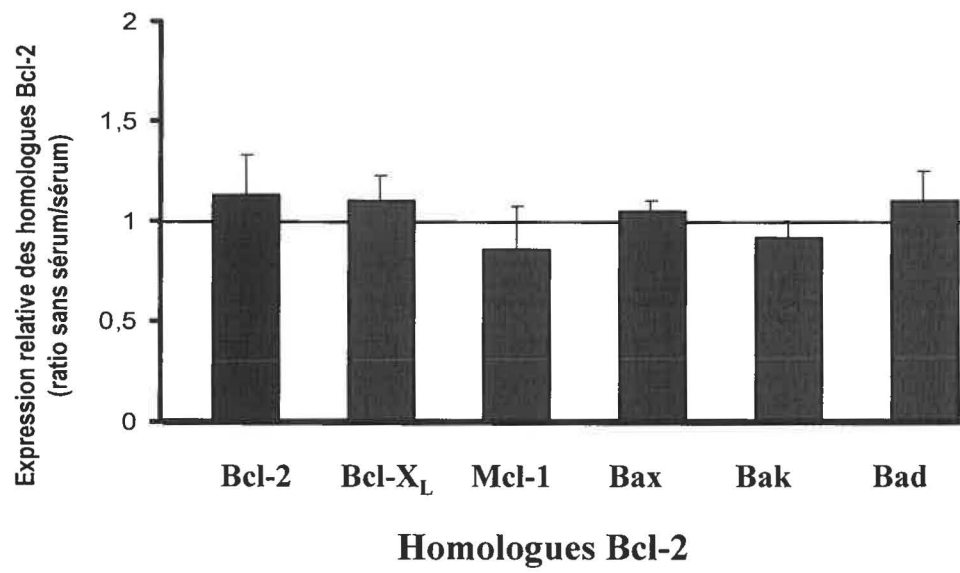


Figure 11. L'absence de sérum (48 hrs) n'affecte pas l'expression des homologues Bcl-2 chez les cellules Caco-2/15. Les cellules Caco-2/15 ont été cultivées à divers stades de différenciation (-2, 0, 5, 10, 15, 20 et 30 jours PC) en présence de 10% de sérum (+S) ou en absence de sérum (SS), puis lysées dans le tampon de Laemmli pour ensuite séparer les protéines par SDS-PAGE (15%). Suite à un électrotransfert sur membrane de nitrocellulose, un immunoburvardage a été effectué avec des anticorps spécifiques pour différents homologues Bcl-2 : 1) anti-apoptotiques : Bcl-2 (~26 kD), Bcl-X_L (~28-30 kD) et Mcl-1 (~39-42 kD) et 2) pro-apoptotiques : Bax (~21 kD), Bak (~25-28 kD) et Bad (~28-32 kD). Les protéines ont été scannées, puis les niveaux relatifs d'expression des protéines en absence de sérum (SS) ont été évalués par rapport aux niveaux d'expression en présence de sérum (+S) en déterminant l'aire totale sous le pic (AU×mm) pour ainsi établir le ratio (SS/+S) et ce, pour chaque stade de différenciation. Les colonnes représentant la moyenne ± SEM pour au moins 3 expériences séparées (n≥3) où 1 = 100% du contrôle (+S).



2.2 Effet de l'absence de sérum sur la survie entérocytaire et sur l'expression des homologues Bcl-2 au cours de la différenciation entérocytaire

La présence ou l'absence de sérum n'induit pas l'apoptose chez les entérocytes indifférenciés (figure 9A, pistes 2 et 3) ni chez les entérocytes différenciés (figure 9B, pistes 2 et 3). De plus, ces états de survie corrélerent avec l'absence de la caspase-7 effectrice sous sa forme active (figure 10, pistes 1-4). Tel qu'indiqué à la figure 11, nous constatons que l'absence de sérum n'a pas d'effet significatif sur les niveaux relatifs d'expression des homologues Bcl-2 anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-X_L et Mcl-1) et pro-apoptotiques (Bax, Bak et Bad) et ce, peu importe l'état de différenciation. C'est pour cette raison que les données qui vont suivre seront exprimées en "% du contrôle", la situation sans sérum (SS) constituant la situation "contrôle".

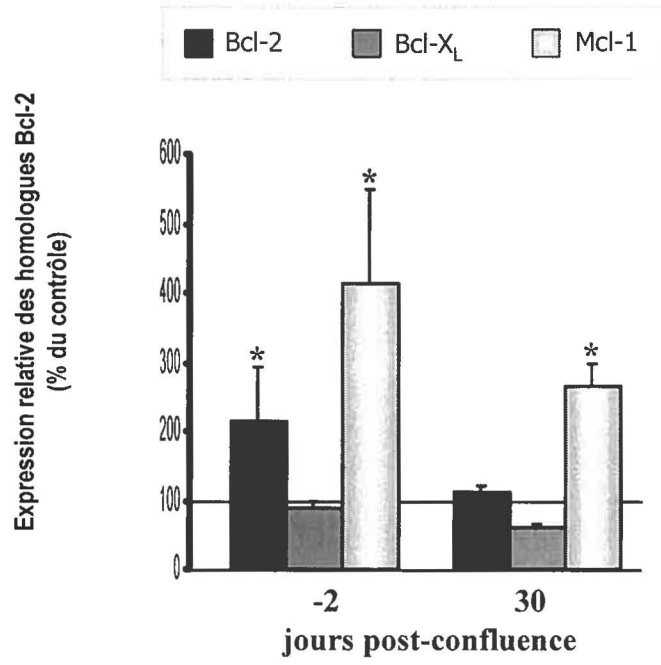
2.3 Effet de l'insuline sur la survie entérocytaire

La présence d'insuline (+I) promouvoit la survie, et ce, peu importe l'état de différenciation (figure 9A, piste 4 et figure 9B, piste 4). De plus, cet état de survie corréle avec l'absence de la caspase-7 effectrice sous sa forme active (figure 10A, pistes 15, et 16). L'insuline provoque également une augmentation des niveaux relatifs d'expression des anti-apoptotiques Bcl-2 et Mcl-1 à -2 jours PC (figure 12A, -2 PC) et fait baisser l'expression des pro-apoptotiques Bax et Bak (figure 12B, -2 PC). À 30 jours PC, l'insuline provoque une hausse d'expression de l'anti-apoptotique Mcl-1 (figure 12A, 30 PC) et une baisse du

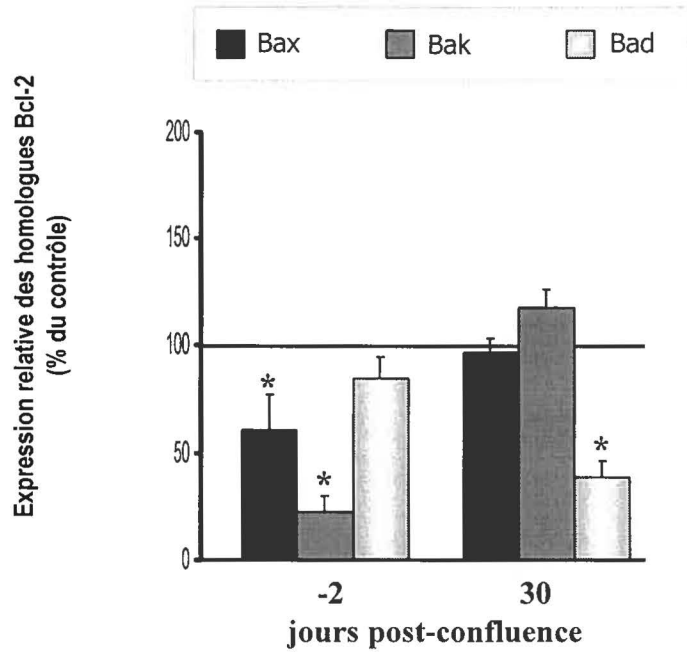
pro-apoptotique Bad (figure 12B, 30 PC). En résumé, l'insuline provoque des modulations d'expression des homologues Bcl-2 à -2 et à 30 jours PC qui penchent nettement en faveur des anti-apoptotiques; cependant les homologues spécifiquement affectés diffèrent selon l'état de différenciation.

Figure 12. Régulation différentielle de l'expression des homologues Bcl-2 par l'insuline. Expression relative des homologues Bcl-2 : (A) anti-apoptotiques : Bcl-2 (~26 kD), Bcl-X_L (~28-30 kD) et Mcl-1 (~39-42 kD) et (B) pro-apoptotiques : Bax (~21 kD), Bak (~25-28 kD) et Bad (~28-32 kD) chez les cellules Caco-2/15 indifférenciées (-2 jours PC) et chez des cellules pleinement différenciées (30 jours PC) traitées pendant 48 heures en présence de 10 µg/ml d'insuline (+I). Les protéines totales ont été lysées dans le tampon de Laemmli, puis séparées par SDS-PAGE (15%). Suite à un électrotransfert sur membrane de nitrocellulose, un immunobuvardage a été effectué avec des anticorps spécifiques (voir figure 1A) et les protéines ont été scannées par densitométrie au laser. Les niveaux relatifs d'expression des protéines analysées en présence d'insuline (+I) ont été évalués en comparant ceux-ci avec les niveaux d'expression en absence de sérum (SS) par la détermination de l'aire totale sous le pic (AU×mm) pour ainsi établir le ratio [(+I/SS)×100%] (% du contrôle). Les colonnes représentant la moyenne ± SEM pour au moins 3 expériences séparées (n≥3) où 100 % du contrôle représente les niveaux d'expression dans les cultures contrôles (SS). À -2 et à 30 jours PC, les différences statistiquement significatives ($0.001 \leq p \leq 0.01$) pour les (A) anti-apoptotiques et pour les (B) pro-apoptotiques sont indiquées par un astérisque.

A



B



3. Rôles des tyrosines kinases dans la survie entérocytaire

3.1 Phosphorylation des tyrosines au cours de la différenciation entérocytaire

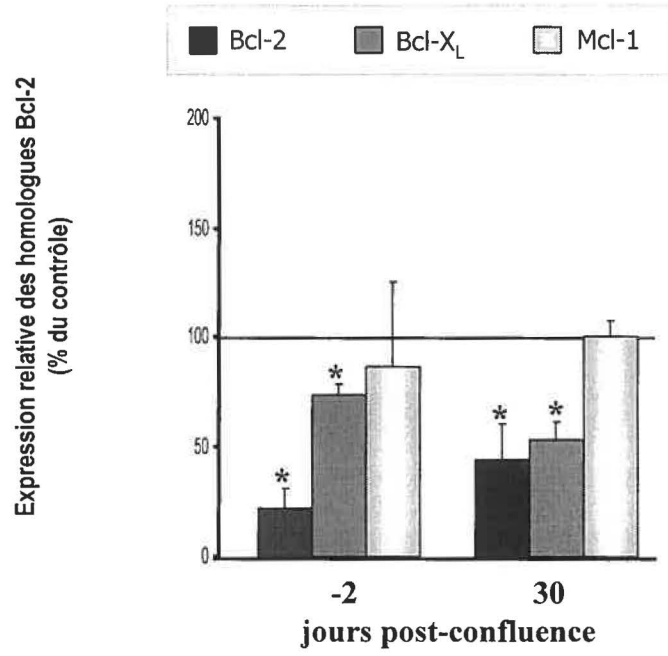
L'analyse western des protéines phosphorylées sur résidus tyrosine indique qu'il existe différents patrons de phosphorylation selon l'état de différenciation (figure 21B). Ces différences indiquent qu'il y a des changements qui s'effectuent au cours du processus de différenciation. Ceci suggère la présence de mécanismes cellulaires différents, activés ou inactivés. D'ailleurs, la différenciation entérocytaire est bien connue pour être accompagnée de changements dans les réponses hormonales et les propriétés d'adhésion cellulaire (Vachon et Beaulieu, 1995)

3.2 Effets de l'inhibition des tyrosines kinases sur la survie et sur l'expression des homologues Bcl-2 selon l'état de différenciation entérocytaire

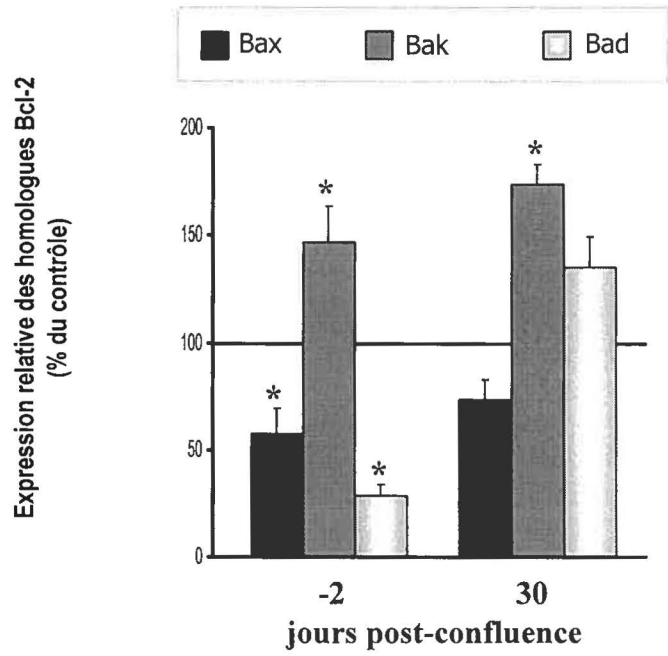
L'inhibition des tyrosines kinases avec la génistéine 150 μ M induit l'apoptose après 48 heures de traitement, et ce, peu importe l'état de différenciation (figure 9A, piste 5 et figure 9B, piste 5). De plus, l'induction d'apoptose corrèle avec la présence de la caspase-7 effectrice sous sa forme active (figure 10, pistes 5 et 6). Au niveau de l'expression des homologues Bcl-2 à -2 jours PC, nous observons une baisse d'expression des anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-X_L (figure 13A, -2 PC), et des pro-apoptotiques Bax et Bad (figure 13B, -2 PC), ainsi qu'une augmentation d'expression du pro-apoptotique Bak (figure 13B, -2

Figure 13. Régulation différentielle de l'expression des homologues Bcl-2 par les tyrosines kinases. Expression relative des homologues Bcl-2 : (A) anti-apoptotiques : Bcl-2 (~26 kD), Bcl-X_L (~28-30 kD) et Mcl-1 (~39-42 kD) et (B) pro-apoptotiques : Bax (~21 kD), Bak (~25-28 kD) et Bad (~28-32 kD) chez les cellules Caco-2/15 indifférenciées (-2 jours PC) et chez des cellules pleinement différenciées (30 jours PC) traitées pendant 48 heures en présence de 150 µM de génistéine (+G). Les protéines totales ont été lysées dans le tampon de Laemmli, puis séparées par SDS-PAGE (15%). Suite à un électrotransfert sur membrane de nitrocellulose, un immunobuvardage a été effectué avec des anticorps spécifiques (voir figure 1A) et les protéines ont été scannées par densitométrie au laser. Les niveaux relatifs d'expression des protéines analysées en présence de génistéine (+G) ont été évalués en comparant ceux-ci avec les niveaux d'expression en absence de sérum (SS) par la détermination de l'aire totale sous le pic (AU×mm) pour ainsi établir le ratio [(+G/SS)×100%] (% du contrôle). Les colonnes représentant la moyenne ± SEM pour au moins 3 expériences séparées (n≥3) où 100 % du contrôle représente les niveaux d'expression dans les cultures contrôles (SS). À -2 et à 30 jours PC, les différences statistiquement significatives (0.001 ≤ p ≤ 0.01) pour les (A) anti-apoptotiques et pour les (B) pro-apoptotiques sont indiquées par un astérisque.

A



B



PC). À 30 jours PC, nous observons une baisse d'expression des anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-X_L (figure 13A, 30 PC), ainsi qu'une hausse du pro-apoptique Bak (figure 13B, 30 PC). Ainsi, quoique la génistéine induit l'apoptose tant chez les cellules indifférenciées que différenciées, les homologues Bcl-2 affectés ne sont pas les mêmes.

3.3. Effets des traitements sur la phosphorylation des résidus tyrosine

3.3.1 Entérocytes indifférenciés

Nous pouvons affirmer que notre traitement avec la génistéine est efficace à -2 jours PC puisque l'inhibition des tyrosines kinases (+G) fait baisser les niveaux de phosphorylation sur résidus tyrosine (figure 23B, piste5).

De plus, nous constatons que la phosphorylation sur résidus tyrosine est affectée spécifiquement par certains traitements. Par exemple, la présence de sérum (+S) et l'inhibition de p125^{FAK} (+CD) font baisser la phosphorylation sur résidus tyrosine à -2 jours PC (figure 23B, pistes 1 et 7). Par contre, l'inhibition des membres de la famille Src (+HA), l'inhibition de (MEK-1/2)/(p42^{Erk-2}/p44^{Erk-1}) (+PD), l'inhibition de PI3-K (+LY) et la présence d'insuline (+I) n'ont pas d'effet apparent sur la phosphorylation des résidus tyrosines (figure 23B, pistes 9,11,13 et 15).

3.3.2 Entérocytes différenciés

L'inhibition à large spectre des tyrosines kinases (+G) fait baisser les niveaux de phosphorylation sur résidus tyrosine (figure 23B, piste 6).

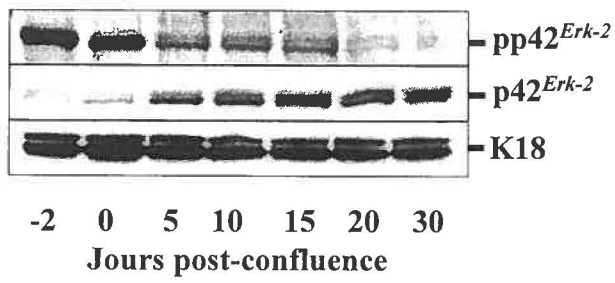
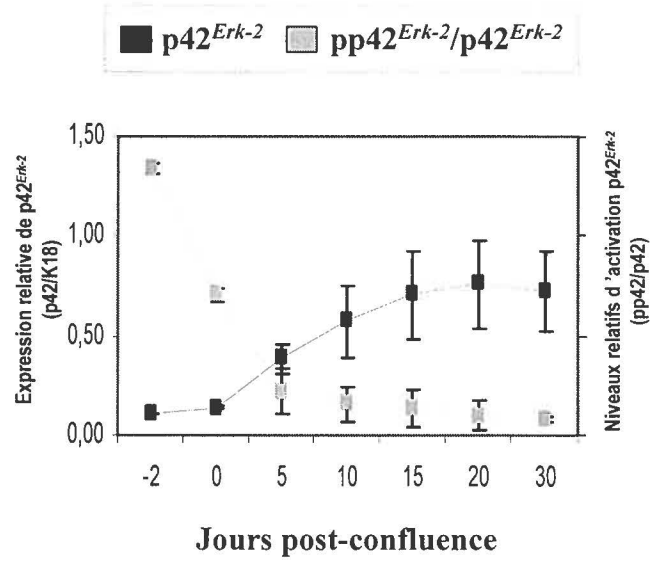
L'inhibition de p125^{FAK} fait également baisser les niveaux de phosphorylation sur résidus tyrosine (figure 23B, piste 8). Enfin, la présence de sérum (+S), l'inhibition des membres de la famille Src (+HA), l'inhibition de la voie (MEK-1/2)/(p42^{Erk-2}/p44^{Erk-1}) (+PD), l'inhibition de la PI 3-kinase (+LY) et la présence d'insuline (+I), n'ont pas d'effets significatifs sur la phosphorylation sur résidus tyrosine des espèces à 30 jours PC (figure 23B, pistes 2,10,12,14 et 16).

4. Voie des kinases MAP (pp42^{Erk-2}/p44^{Erk-1})

4.1 Expression de p42^{Erk-2} au cours de la différenciation entérocytaire

Dans un premier temps, nous avons examiné les profils d'expression et d'activation de p42^{Erk-2} au cours de la différenciation entérocytaire. La kinase p42^{Erk-2} étant la forme majoritairement détectée lors des analyses Western blot, nous avons uniquement considéré celle-ci lors des analyses densitométriques. L'expression de p42^{Erk-2} augmente graduellement jusqu'à 15 jours PC pour ensuite se stabiliser durant le reste du processus de différenciation (figures 14A et 14B). Or, les niveaux relatifs d'activation de p42^{Erk-2} sont

Figure 14. Profils distincts de niveaux relatifs d'activation de $p42^{Erk-2}$ au cours de la différenciation entérocytaire. (A) Immunobuvardage représentant l'activation de $p42^{Erk-2}$ à divers stades de différenciation (-2, 0, 5, 10, 15, 20 et 30 jours PC) en présence de 10 % de sérum (+S). Les protéines totales ont été lysées dans le tampon de Laemmli, puis séparées par SDS-PAGE (4-15%). Suite à un électrotransfert sur membrane de nitrocellulose, dans un premier temps, un immunobuvardage a été effectué pour la détection de la forme doublement phosphorylée (activée) de $p42^{Erk-2}$ (figure A; panneau du haut; $pp42^{Erk-2}$), dans un second temps, un second immunobuvardage a été effectué pour la forme totale de $p42^{Erk-2}$ (figure A; panneau du milieu; $p42^{Erk-2}$). Finalement, un anticorps dirigé contre la cytokératine 18 (K18) a été utilisé pour vérifier l'équité en quantité de protéines pour chaque échantillon. (B) Niveaux relatifs d'activation de $p42^{Erk-2}$ au cours de la différenciation entérocytaire. Les protéines totales détectées en (A) ont été scannées par densitométrie au laser. L'expression de $p42^{Erk-2}$ totale a été évaluée en déterminant le ratio de l'aire totale sous le pic (AU×mm) pour $p42^{Erk-2}$ totale sur l'aire totale sous le pic (AU×mm) pour K18 et ce, pour chaque stade de différenciation. Les niveaux relatifs d'activation de $p42^{Erk-2}$ ont été évalués en déterminant le ratio de l'aire totale sous le pic (AU×mm) pour la forme doublement phosphorylée de $p42^{Erk-2}$ sur celle de la forme totale de $p42^{Erk-2}$. Les points reliés par la courbe représentent la moyenne \pm SEM pour chaque stade de différenciation pour au moins trois expériences séparées ($n \geq 3$).

A**B**

maximums à -2 jours PC et ceux-ci diminuent drastiquement jusqu'à 5 jours PC pour ensuite se maintenir à des niveaux stables jusqu'à 30 jours PC (figures 14A et 14B). Ainsi, nous observons l'établissement de niveaux relatifs d'activation de $p42^{Erk-2}$ distincts au cours de la différenciation entérocytaire.

4.2 Implication de la voie (MEK-1/2)/(p42^{Erk-2}/p44^{Erk-1}) dans la survie entérocytaire

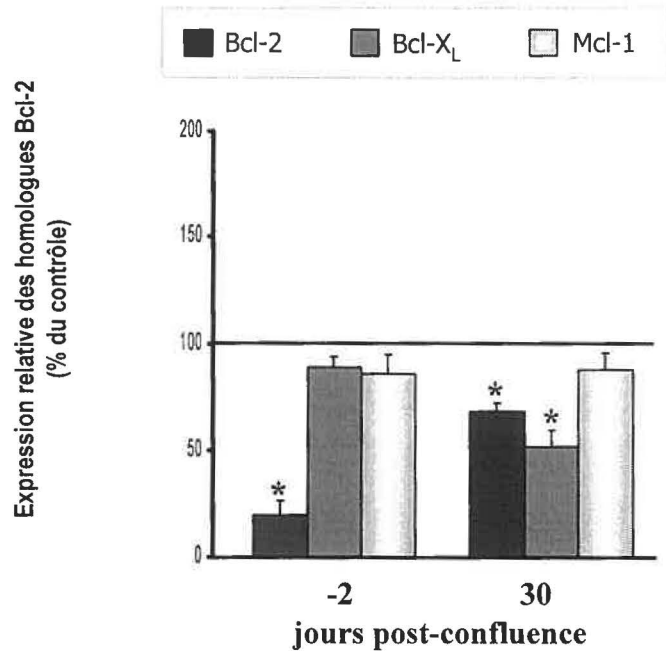
L'inhibition des kinases MAP a des effets différents sur la survie entérocytaire selon l'état de différenciation. Par visualisation de la fragmentation de l'ADN internucléosomique, nous constatons que l'inhibition de la voie (MEK-1/2)/(p42^{Erk-2}/p44^{Erk-1}) n'induit pas l'apoptose à -2 jours PC (figure 9A, piste 6), tandis qu'à 30 jours PC, nous observons de l'apoptose (figure 9B, piste 6). De plus, la caspase-7 effectrice est inactive à -2 jours, mais à 30 jours elle est activée (figure 10, pistes 11 et 12). Nous constatons donc un effet distincts de la voie (MEK-1/2)/(p42^{Erk-2}/p44^{Erk-1}) sur la survie entérocytaire, selon l'état de différenciation.

4.3 Effet de l'inhibition de la voie (MEK-1/2)/(p42^{Erk-2}/ p44^{Erk-1}) sur l'expression des homologues Bcl-2 selon l'état de différenciation entérocytaire

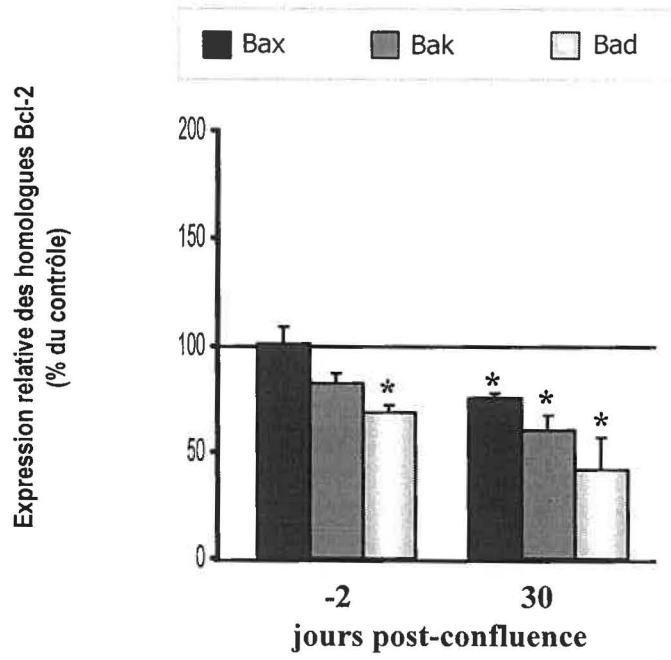
À -2 jours PC, l'inhibition de la voie (MEK-1/2)/(p42^{Erk-2}/ p44^{Erk-1}) cause une importante baisse d'expression de l'anti-apoptotique Bcl-2 (figure 15A, -2 PC) et une baisse

Figure 15. Régulation différentielle de l'expression des homologues Bcl-2 par la voie (MEK-1/2)/(p42^{Erk-2}/p44^{Erk-1}). Expression relative des homologues Bcl-2 : (A) anti-apoptotiques : Bcl-2 (~26 kD), Bcl-X_L (~28-30 kD) et Mcl-1 (~39-42 kD) et (B) pro-apoptotiques : Bax (~21 kD), Bak (~25-28 kD) et Bad (~28-32 kD) chez les cellules Caco-2/15 indifférenciées (-2 jours PC) et chez des cellules pleinement différenciées (30 jours PC) traitées pendant 48 heures en présence de 20 µM de PD98059 (+PD). Les protéines totales ont été lysées dans le tampon de Laemmli, puis séparées par SDS-PAGE (15%). Suite à un électrotransfert sur membrane de nitrocellulose, un immunobuvardage a été effectué avec des anticorps spécifiques (voir figure 1A) et les protéines ont été scannées par densitométrie au laser. Les niveaux relatifs d'expression des protéines analysées en présence de PD98059 (+PD) ont été évalués en comparant avec ceux-ci avec les niveaux d'expression en absence de sérum (SS) par la détermination de l'aire totale sous le pic (AU×mm) pour ainsi établir le ratio [(+PD/SS)×100%] (% du contrôle). Les colonnes représentant la moyenne ± SEM pour au moins 3 expériences séparées (n≥3) où 100 % du contrôle représente les niveaux d'expression dans les cultures contrôles (SS). À -2 et à 30 jours PC, les différences statistiquement significatives (0.001 ≤ p ≤ 0.01) pour les (A) anti-apoptotiques et pour les (B) pro-apoptotiques sont indiquées par un astérisque.

A



B



du pro-apoptotique Bad (figure 15B, -2 PC). À 30 jours PC, nous observons une diminution des anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-X_L (figure 15A, 30 PC), ainsi qu'une réduction des trois pro-apoptotiques Bax, Bak et Bad (figure 15B, 30 PC). Donc, en plus des effets différentiels sur la survie, nous observons également des effets différentiels sur l'expression des homologues Bcl-2 lorsque la voie (MEK-1/2)/(p42^{Erk-2}/ p44^{Erk-1}) est inhibée.

4.4 Effets des traitements sur les niveaux relatifs d'activation de p42^{Erk-2}

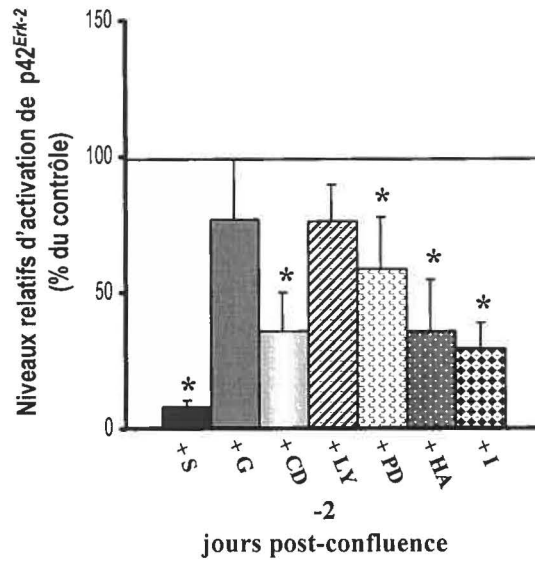
4.4.1 Entérocytes indifférenciés (-2 jours PC)

L'inhibition de p42^{Erk-2}/ p44^{Erk-1} via l'effet du PD98059 sur MEK-1/2 provoque une baisse des niveaux relatifs d'activations de p42^{Erk-2} de l'ordre de 40 % (figure 16A, + PD). Donc, à sous-confluence, nous ne sommes pas capable d'inhiber complètement p42^{Erk-2} avec une concentration de PD98059 à 20 µM. Même à une concentration de 60 µM, nous n'inhibons pas davantage les niveaux relatifs d'activation de p42^{Erk-2} (données non-illustrées). Malgré cette baisse d'activation de p42^{Erk-2}, l'absence d'apoptose à -2 jours PC semble écarter toute implication de cette voie dans la survie.

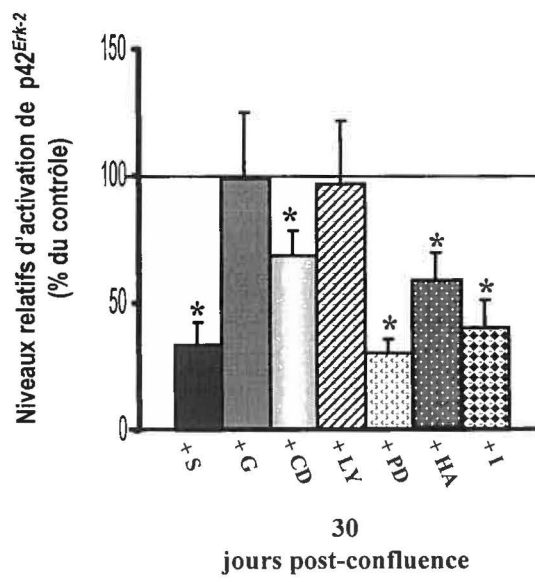
Pour ce qui est des autres traitements, nos résultats indiquent que la présence de sérum provoque une inhibition importante (~90% d'inhibition) des niveaux relatifs d'activation de p42^{Erk-2} (figure 16A, +S) comparativement à la situation en absence de sérum (figure 16A, 100%).

Figure 16. Régulation de p42^{Erk-2} chez les entérocytes indifférenciés et différenciés. Niveaux relatifs d'activation de p42^{Erk-2} à (A) -2 jours PC et à (B) 30 jours PC suite à un traitement de 48 heures : en présence de 10 % de sérum (+S), en présence de 150 µM de génistéine (+G), en présence de 1 µM de cytochalasine D (+CD), en présence de 30 µM de LY294002 (+LY), en présence de 20 µM de PD98059 (+PD), en présence de 1µM d'herbimycine A (+HA), ou en présence de 10 µg/ml d'insuline (+I). Les protéines totales ont été lysées dans le tampon de Laemmli, puis séparées par SDS-PAGE (4-15%). Suite à un électrotransfert sur membrane de nitrocellulose, dans un premier temps, un immunobuvardage a été effectué pour la détection de la forme doublement phosphorylée (activée) de p42^{Erk-2} dans un second temps, un second immunoburvardage a été effectué pour la forme totale de p42^{Erk-2}. Les protéines ont été scannées par densitométrie au laser. Les niveaux relatifs d'activation de p42^{Erk-2} ont été évalués en déterminant le ratio de l'aire totale sous le pic (AU×mm) pour la forme doublement phosphorylée de p42^{Erk-2} sur celle de la forme totale de p42^{Erk-2} et ce pour chaque traitement à -2 et à 30 jours PC. Les colonnes représentant la moyenne ± SEM pour au moins 3 expériences séparées (n≥3) où 100 % du contrôle représente les niveaux d'expression dans les cultures contrôles (SS). À -2 et à 30 jours PC, les différences statistiquement significatives (0.001 ≤ p ≤ 0.01) pour les (A) anti-apoptotiques et pour les (B) pro-apoptotiques sont indiquées par un astérisque.

A



B



L'insuline induit également une inhibition de l'activation de p42^{Erk-2} (~70% d'inhibition) (figure 16A, +I). L'inhibition de p125^{FAK} avec la cytochalasine D (+CD) et l'inhibition des membres de la famille Src avec l'herbimycine A (+HA) causent respectivement des chutes d'environ 65 % de l'activation de p42^{Erk-2} (figure 16A, +CD et +HA). L'inhibition des tyrosines kinases avec la génistéine fait également chuter l'activation de p42^{Erk-2} (figure 16A, +G). L'inhibition de la PI 3-kinase avec le LY294002 (+LY) fait baisser légèrement (de façon non significative) les niveaux relatifs d'activation de p42^{Erk-2} (figure 16A, +LY).

4.4.2 Entérocytes différenciés (30 jours PC)

L'effet inhibiteur du PD98059 sur l'activation de p42^{Erk-2} est plus efficace à 30 jours PC. En effet, nous observons une inhibition des niveaux relatifs d'activation de p42^{Erk-2} de l'ordre de 70 % (figure 16B, +PD). Cette baisse d'activation de p42^{Erk-2} pourrait expliquer la présence d'apoptose et la balance des homologues Bcl-2 observée penchant en faveur des pro-apoptotiques suggérant ainsi une implication de p42^{Erk-2} dans la survie à 30 jours PC.

Dans le cas des autres traitements, nous constatons que l'inhibition de la PI 3-kinase n'a pas d'effet significatif sur les niveaux relatifs d'activation de p42^{Erk-2} (figure 16B, +LY). Cependant, les niveaux d'activation de p42^{Erk-2} baissent en présence de sérum (~ 35%) (figure 16B, +S). Enfin, des baisses respectives d'activation de p42^{Erk-2} d'environ 30% suite à l'inhibition de p125^{FAK} (figure 16B, +CD) et d'environ 40% suite à l'inhibition des membres de la famille Src (figure 16B, +HA) sont observées. L'inhibition des tyrosines

kinases avec la génistéine fait également baissentr légèrement l'activation de p42^{Erk-2} (figure 16B, +G). Enfin, la présence d'insuline stimule peu l'activation de p42^{Erk-2} (~ 40%) (figure 16B, +I).

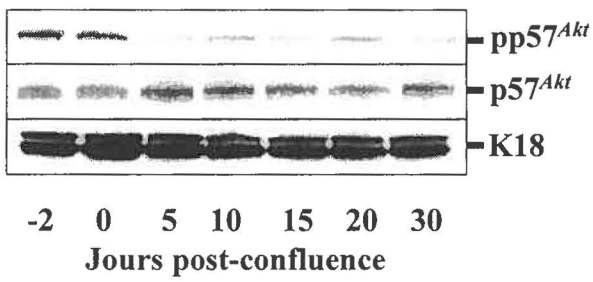
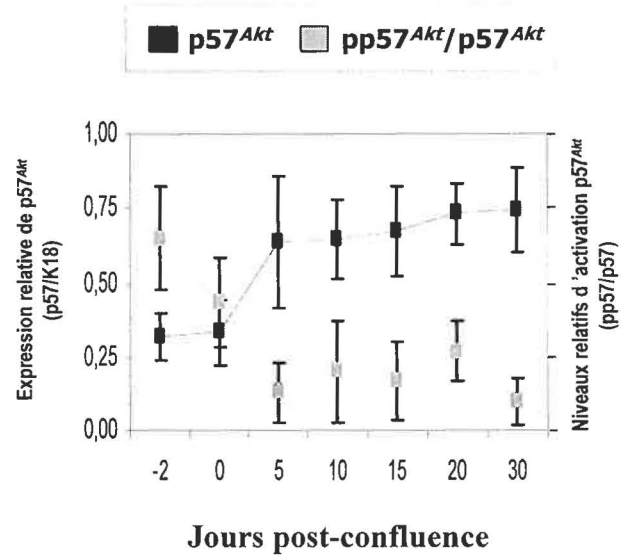
Ainsi, malgré certaines tendances qui sont semblables à -2 et à 30 jours PC, nos résultats indiquent que la voie (MEK-1/2)/(p42^{Erk-2}/ p44^{Erk-1}) est régularisée différemment selon l'état de différenciation entérocytaire puisqu'elle exhibe une implication distincte dans la survie entérocytaire.

5. Voie de la PI 3-kinase

5.1 Expression de p57^{Akt} au cours de la différenciation entérocytaire

Pour étudier le rôle de la voie de la PI 3-kinase dans la survie entérocytaire, nous avons utilisé le LY294002 (30 μ M), un inhibiteur spécifique de la PI 3-kinase. Il est bien connu que la kinase p57^{Akt}, un effecteur de la PI 3-kinase, joue un rôle important dans la survie chez plusieurs types cellulaires (Wymann et Pirola, 1998; Datta et al., 1999; Chan et al., 1999; Vanhaesebroeck et Alessi, 2000). C'est pourquoi dans un premier temps nous avons examiné l'expression et l'activation de p57^{Akt} au cours de la différenciation entérocytaire. L'expression de p57^{Akt} augmente entre 0 et 5 jours PC pour ensuite se maintenir à des niveaux stables pour le reste du processus de différenciation (figure 17A et B) tandis que les niveaux relatifs d'activation de p57^{Akt} diminuent au cours de la

Figure 17. Profils distincts de niveaux relatifs d'activation de $p57^{Akt}$ au cours de la différenciation entérocytaire. (A) Immunobuvardage représentant l'activation de $p57^{Akt}$ à divers stades de différenciation (-2, 0, 5, 10, 15, 20 et 30 jours PC) en présence de 10 % de sérum (+S). Les protéines totales ont été lysées dans le tampon de Laemmli, puis séparées par SDS-PAGE (4-15%). Suite à un électrotransfert sur membrane de nitrocellulose, dans un premier temps, un immunobuvardage a été effectué pour la détection de la forme phosphorylée (activée) de $p57^{Akt}$ (figure A; panneau du haut; $pp57^{Akt}$), dans un second temps, un second immunobuvardage a été effectué pour la forme totale de $p57^{Akt}$ (figure A; panneau du milieu; $p57^{Akt}$). Finalement, un anticorps dirigé contre la cytokératine 18 (K18) a été utilisé pour vérifier l'équité en quantité de protéines pour chaque échantillon. (B) Niveaux relatifs d'activation de $p57^{Akt}$ au cours de la différenciation entérocytaire. Les protéines totales détectées en (A) ont été scannées par densitométrie au laser. L'expression de $p57^{Akt}$ totale a été évaluée en déterminant le ratio de l'aire totale sous le pic (AU×mm) pour $p57^{Akt}$ totale sur l'aire totale sous le pic (AU×mm) pour K18 et ce, pour chaque stade de différenciation. Les niveaux relatifs d'activation de $p57^{Akt}$ ont été évalués en déterminant le ratio de l'aire totale sous le pic (AU×mm) pour la forme doublement phosphorylée de $p57^{Akt}$ sur celle de la forme totale de $p57^{Akt}$. Les points reliés par la courbe représentent la moyenne \pm SEM pour chaque stade de différenciation pour au moins trois expériences séparées ($n \geq 3$).

A**B**

différenciation (figure 17A et B). Tout comme pour p42^{Erk-2}, nous observons une expression et une activation différentielle de p57^{Akt} au cours de la différenciation, suggérant des rôles distincts dans la survie entérocytaire.

5.2 Implication de la voie de la PI 3-kinase et de la kinase mTOR dans la survie entérocytaire

5.2.1 Entérocytes indifférenciés

Les phosphoinositides sont des seconds messagers produits par la PI 3-kinase (Wymann et Pirola, 1998; Datta et al., 1999; Chan et al., 1999; Vanhaesebroeck et Alessi, 2000). Comme mentionné précédemment, ceux-ci peuvent mener à l'activation de p57^{Akt} ainsi qu'à celle de mTOR. Au stade indifférencié (-2 jours PC), l'inhibition de la PI 3-kinase avec le LY294002 30 μ M induit l'apoptose (figure 9A, piste 7) tandis que l'inhibition de la kinase mTOR avec la rapamycine 20 ng/ml n'induit pas l'apoptose (figure 9A, piste 9). L'induction de l'apoptose suite à l'inhibition de la PI 3-kinase corrèle avec la présence de la caspase-7 sous sa forme clivée (figure 10, piste13). Donc, la PI 3-kinase a un rôle important dans la survie; cependant les signaux de survie ne semblent pas être médiés par la kinase mTOR.

5.2.2 Entérocytes différenciés

Tout comme chez les cellules indifférenciées, l'inhibition de la PI 3-kinase induit l'apoptose (figure 9B, piste 7) tandis que l'inhibition de la kinase mTOR n'induit pas l'apoptose (figure 9B, piste 9). L'induction d'apoptose suite à l'inhibition de la PI 3-kinase concorde avec la présence de la caspase-7 sous sa forme active (clivée) (figure 10, piste 14). Ainsi, la PI 3-kinase est importante pour la survie des cellules différenciées tandis que mTOR ne semble pas impliquée.

5.3 Effets des traitements sur les niveaux relatifs d'activation de $p57^{Akt}$

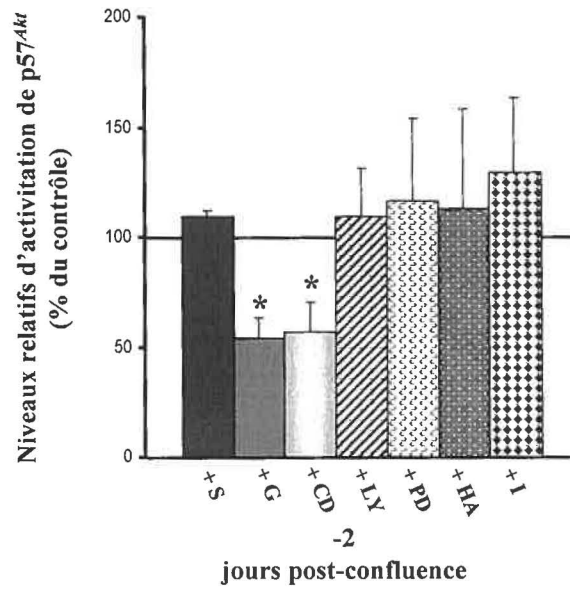
Puisque mTOR, un effecteur de la PI3-K, ne semble pas impliqué dans la survie entérocytaire, nous avons analysé de plus près l'implication de $p57^{Akt}$.

5.3.1. Entérocytes indifférenciés

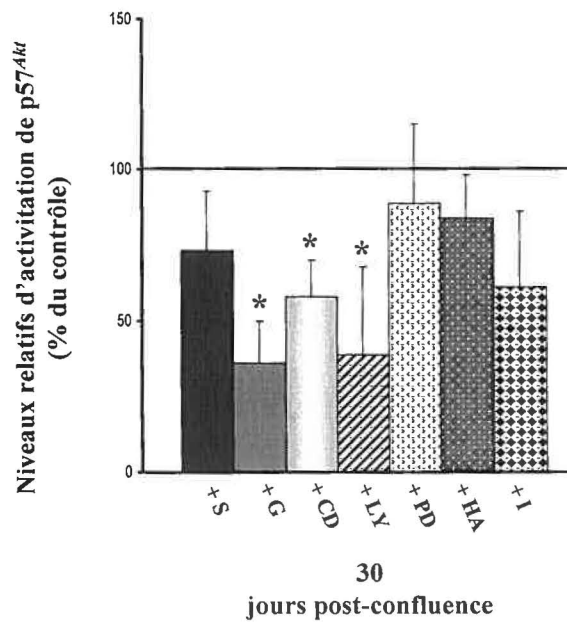
Contrairement à ce qu'on devrait attendre (Wymann et Pirola, 1998; Datta et al., 1999; Chan et al., 1999; Vanhaesebroeck et Alessi, 2000), l'inhibition de la voie de la PI 3-kinase ne semble pas avoir d'effet sur l'activation de $p57^{Akt}$ (figure 18A, +LY), malgré l'induction d'apoptose à -2 jours PC (figure 9A, piste 7). Ces observations suggèrent l'existence de voies alternatives de survie autre que $p57^{Akt}$ qui dépendent de la PI3-kinase;

Figure 18. Régulation de p57^{Akt} chez les entérocytes indifférenciés et différenciés. Niveaux relatifs d'activation de p57^{Akt} à (A) -2 jours PC et à (B) 30 jours PC suite à un traitement de 48 heures : en présence de 10 % de sérum (+S), en présence de 150 µM de génistéine (+G), en présence de 1 µM de cytochalasine D (+CD), en présence de 30 µM de LY294002 (+LY), en présence de 20 µM de PD98059 (+PD), en présence de 1µM d'herbimycine A (+HA), ou en présence de 10 µg/ml d'insuline (+I). Les protéines totales ont été lysées dans le tampon de Laemmli, puis séparées par SDS-PAGE (4-15%). Suite à un électrotransfert sur membrane de nitrocellulose, dans un premier temps, un immunobuvardage a été effectué pour la détection de la forme phosphorylée (activée) de p57^{Akt} dans un second temps, un second immunoburvardage a été effectué pour la forme totale de p57^{Akt}. Les protéines ont été scannées par densitométrie au laser. Les niveaux relatifs d'activation de p57^{Akt} ont été évalués en déterminant le ratio de l'aire totale sous le pic (AU×mm) pour la forme phosphorylée de p57^{Akt} sur celle pour la forme totale de p57^{Akt} et ce pour chaque traitement à -2 et à 30 jours PC. Les colonnes représentant la moyenne ± SEM pour au moins 3 expériences séparées (n≥3) où 100 % du contrôle représente les niveaux d'expression dans les cultures contrôles (SS). À -2 et à 30 jours PC, les différences statistiquement significatives (0.001 ≤ p ≤ 0.01) pour les (A) anti-apoptotiques et pour les (B) pro-apoptotiques sont indiquées par un astérisque.

A



B



de plus, ceci indique que l'activation de $p57^{Akt}$ serait indépendante de PI3-K chez les entérocytes indifférenciés.

Malgré tout, l'activation de $p57^{Akt}$ s'est avérée modulable. En effet, nous constatons que l'inhibition des tyrosines kinases ainsi que l'inhibition de $p125^{FAK}$ diminuent l'activation de $p57^{Akt}$ d'environ 40-45% (figure 18A, +G et +CD). Pour les autres traitements, que ce soit en présence de sérum ou d'insuline ou bien que ce soit l'inhibition de (MEK-1/2)/($p42^{Erk-2}/p44^{Erk-1}$), des membres de la famille Src, aucun effet significatif est observé sur les niveaux relatifs d'activation de $p57^{Akt}$ (figure 18A, +S, +I, +HA, +PD).

5.3.2 Entérocytes différenciés

Contrairement aux entérocytes indifférenciés, l'inhibition de la PI3-kinase cause une chute d'activation de $p57^{Akt}$ de l'ordre de 65% (ce qui semble correspondre à une activation $p57^{Akt}$ dépendante de la PI 3-kinase). Cette chute d'activation (figure 18B, +LY) est associée à l'induction de l'apoptose lorsque PI3-K est inhibée (figure 9B, piste 7).

Pour les autres traitements, nous constatons que l'inhibition des tyrosines kinases et l'inhibition de $p125^{FAK}$ font baisserr respectivement l'activation de $p57^{Akt}$ de 65% et de 40% (figure 18B, +G et +CD), similairement à ce qui est observé chez les cellules indifférenciées. En présence de sérum ou d'insuline, nous n'observons pas d'effet significatif sur les niveaux relatifs d'activation de $p57^{Akt}$ (figure 18B, +S et +I). De même, l'inhibition de (MEK-

1/2)/(p42^{Erk-2}/p44^{Erk-1}) et l'inhibition des membres de la famille Src n'ont pas d'effet significatifs (figure 18B, +PD et +HA).

Ainsi, ces résultats dans leur ensemble indiquent que l'activation de p57^{Akt} est différentielle chez les entérocytes selon l'état de différenciation. De plus, ceci suggère donc une implication distincte de p57^{Akt} dans la survie cellulaire selon l'état de différenciation entérocytaire.

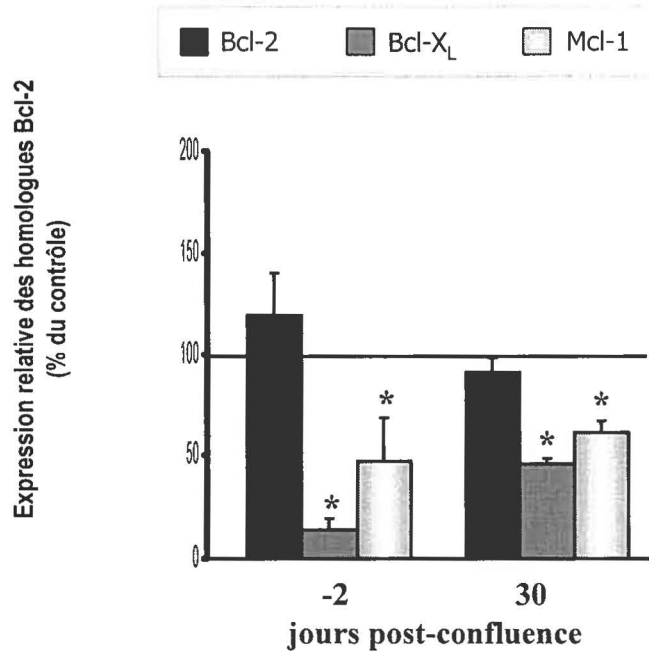
5.4 Modulations d'expression des homologues Bcl-2

5.4.1 Effets de l'inhibition de la PI 3-kinase sur l'expression des homologues Bcl-2 selon l'état de différenciation entérocytaire

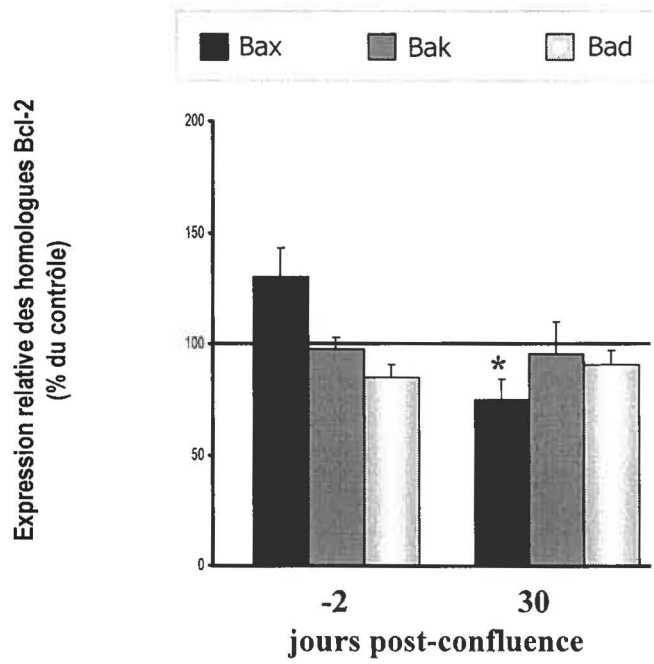
À -2 jours PC, l'inhibition de la PI 3-kinase cause une forte chute d'expression des anti-apoptotiques Bcl-X_L et Mcl-1 (figure 19A, -2 PC), sans toutefois affecter significativement les pro-apoptotiques (figure 19B, -2 PC). À 30 jours PC, nous observons également une baisse d'expression des anti-apoptotiques Bcl-X_L et Mcl-1 (figure 19A, -30 PC) en plus d'une légère baisse du pro-apoptotique Bax (figure 19B, 30 PC). Donc, dans les deux cas (-2 PC vs 30 PC), nous observons une balance d'expression qui favorise nettement les pro-apoptotiques. Ceci concorde avec l'apoptose observée à -2 et 30 jours PC suite à l'inhibition de la PI 3-kinase.

Figure 19. Régulation différentielle de l'expression des homologues Bcl-2 par la voie de la PI 3-K. Expression relative des homologues Bcl-2 : (A) anti-apoptotiques : Bcl-2 (~26 kD), Bcl-X_L (~28-30 kD) et Mcl-1 (~39-42 kD) et (B) pro-apoptotiques : Bax (~21 kD), Bak (~25-28 kD) et Bad (~28-32 kD) chez les cellules Caco-2/15 indifférenciées (-2 jours PC) et chez des cellules pleinement différenciées (30 jours PC) traitées pendant 48 heures en présence de 30 µM de LY294002 (+LY). Les protéines totales ont été lysées dans le tampon de Laemmli, puis séparées par SDS-PAGE (15%). Suite à un électrotransfert sur membrane de nitrocellulose, un immunobuvardage a été effectué avec des anticorps spécifiques (voir figure 1A) et les protéines ont été scannées par densitométrie au laser. Les niveaux relatifs d'expression des protéines analysées en présence de LY294002 (+LY) ont été évalués en comparant avec ceux-ci avec les niveaux d'expression en absence de sérum (SS) par la détermination de l'aire totale sous le pic (AU×mm) pour ainsi établir le ratio [(+LY/SS)×100%] (% du contrôle). Les colonnes représentant la moyenne ± SEM pour au moins 3 expériences séparées (n≥3) où 100 % du contrôle représente les niveaux d'expression dans les cultures contrôles (SS). À -2 et à 30 jours PC, les différences statistiquement significatives ($0.001 \leq p \leq 0.01$) pour les (A) anti-apoptotiques et pour les (B) pro-apoptotiques sont indiquées par un astérisque.

A



B



5.4.2 Effets de l'inhibition de la kinase mTOR sur l'expression des homologues Bcl-2 selon l'état de différenciation entérocytaire

L'inhibition de la kinase mTOR n'amène aucun changement des niveaux relatifs d'expression des homologues Bcl-2 anti- ou pro-apoptotiques, et ce, peu importe l'état de différenciation (figure 20A et B). Ceci corrobore l'observation montrant que l'inhibition de mTOR n'induit pas l'apoptose à -2 et à 30 jours PC.

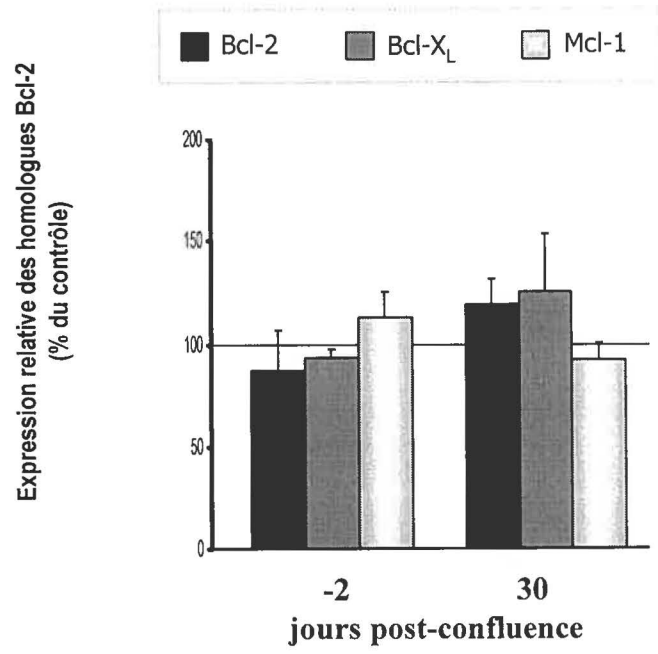
6. Kinase d'adhésion focalisée (p125^{FAK}) et survie entérocytaire

6.1 L'expression de p125^{FAK} augmente au cours de la différenciation entérocytaire tandis que son degré d'activation chute

Nous avons analysé le profil d'expression de p125^{FAK} au cours de la différenciation entérocytaire. Les niveaux d'expression de p125^{FAK} augmentent sensiblement entre 0 et 5 jours PC pour ensuite se maintenir à des niveaux stables (figure 21A, bande 2). Au niveau de son activation, nous constatons que p125^{FAK} est activée de -2 à 0 jours PC, puis son activation baisse successivement entre 0 et 5 jours et entre 20 et 30 jours PC (figure 21A, bande 1). En comparant la phosphorylation de la tyrosine 397 de p125^{FAK} (figure 21A, bande 1) avec la phosphorylation des résidus tyrosine au environ de 121 kD (figure 21B), nous constatons qu'il y a corrélation entre les deux patrons de phosphorylation. Ainsi, p125^{FAK} exhibe des profils distincts d'activation selon l'état de différenciation entérocytaire.

Figure 20. Régulation différentielle de l'expression des homologues Bcl-2 par mTOR. Expression relative des homologues Bcl-2 : (A) anti-apoptotiques : Bcl-2 (~26 kD), Bcl-X_L (~28-30 kD) et Mcl-1 (~39-42 kD) et (B) pro-apoptotiques : Bax (~21 kD), Bak (~25-28 kD) et Bad (~28-32 kD) chez les cellules Caco-2/15 indifférenciées (-2 jours PC) et chez des cellules pleinement différenciées. (30 jours PC) traitées pendant 48 heures en présence de 20 ng/ml de rapamycine (+R) Les protéines totales ont été lysées dans le tampon de Laemmli, puis séparées par SDS-PAGE (15%). Suite à un électrotransfert sur membrane de nitrocellulose, un immunobuvardage a été effectué avec des anticorps spécifiques (voir figure 1A) et les protéines ont été scannées par densitométrie au laser. Les niveaux relatifs d'expression des protéines analysées en présence de rapamycine (+R) ont été évalués en comparant avec ceux-ci avec les niveaux d'expression en absence de sérum (SS) par la détermination de l'aire totale sous le pic (AU×mm) pour ainsi établir le ratio [(+R/SS)×100%] (% du contrôle). Les colonnes représentant la moyenne ± SEM pour au moins 3 expériences séparées (n≥3) où 100 % du contrôle représente les niveaux d'expression dans les cultures contrôles (SS). À -2 et à 30 jours PC, les différences statistiquement significatives ($0.001 \leq p \leq 0.01$) pour les (A) anti-apoptotiques et pour les (B) pro-apoptotiques sont indiquées par un astérisque.

A



B

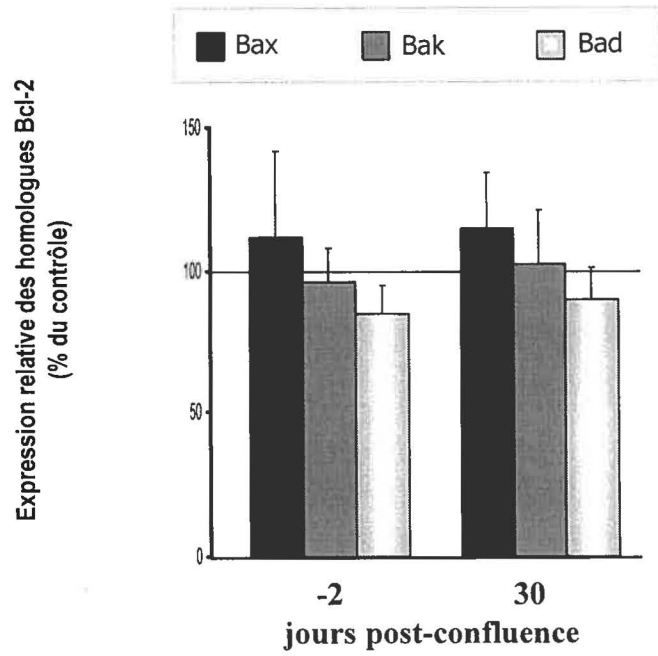
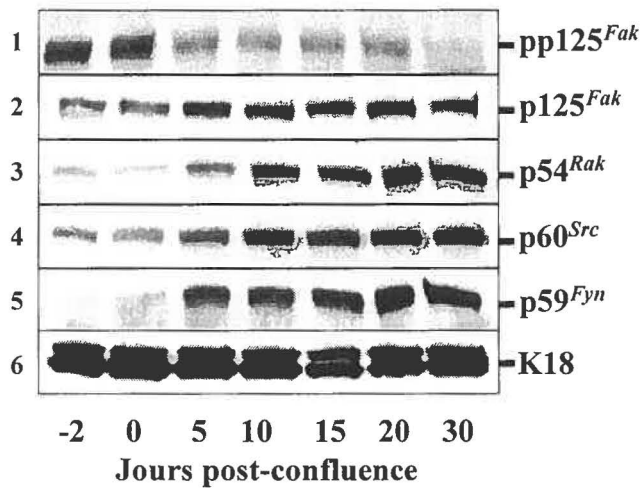
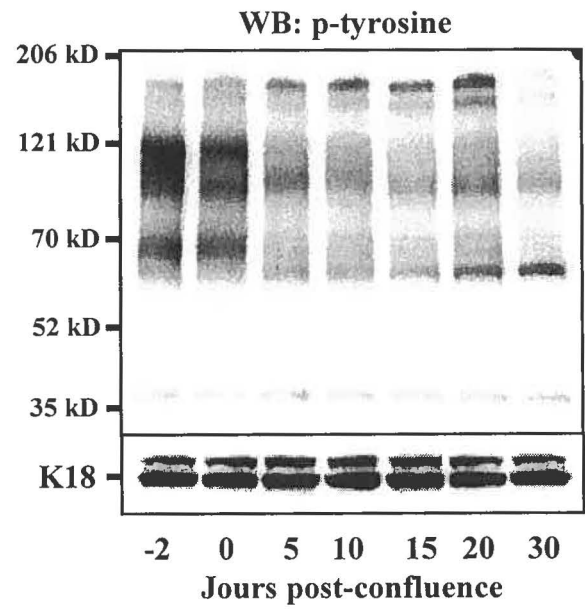


Figure 21. Régulation de p125^{FAK}, des tyrosines kinases Src : p60^{Src}, p59^{Fyn}, p54^{Rak} et des tyrosines kinases selon l'état de différenciation entérocytaire. (A) et (B) Les cellules Caco-2/15 ont été cultivées à divers stades de différenciation (-2, 0, 5, 10 , 15, 20 et 30 jours PC) en présence de 10% de sérum, puis lysées dans le tampon de Laemmli pour la séparation des protéines par SDS-PAGE (15%). Suite à un électrotransfert sur membrane de nitrocellulose, un immunobuvardage a été effectué avec des anticorps spécifiques (A) pour détecter l'expression différentes protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire : piste 1, forme phosphorylée de p125^{FAK} (~125 kD); piste 2, p125^{FAK} (~125 kD); piste 3, p54^{Rak} (~54 kD); piste 4, p60^{Src} (~60 kD) et 2); piste 5, p59^{Fyn} (~59 kD) et (B) pour détecter la phosphorylation sur résidus tyrosine. Un anticorps dirigé contre la cytokératine 18 (K18) a été utilisé pour vérifier l'équité en quantité de protéines pour chaque échantillon.

A**B**

6.2 Implication de la p125^{FAK} dans la survie entérocytaire

Pour étudier l'effet de p125^{FAK} sur la survie entérocytaire, nous avons utilisé la cytochalasine D à 1 μ M; à cette concentration elle inhibe spécifiquement la p125^{FAK} (Lipfert et al., 1992, Oktay et al., 1999; Wary et al., 1999).

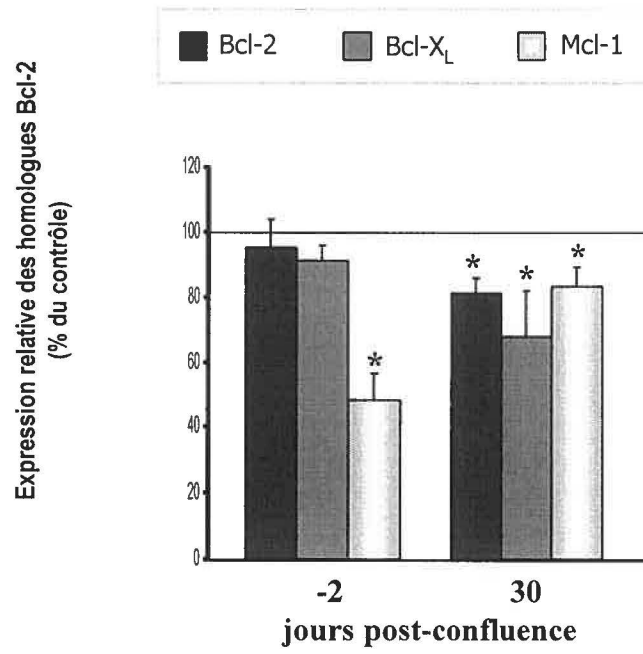
L'inhibition de p125^{FAK} à -2 jours PC induit l'apoptose (figure 9A, piste 11) et active la caspase-7 (figure 10A, piste 7). L'inhibition de p125^{FAK} induit également l'apoptose (figure 9B, piste 11) et active également la caspase-7 (figure 10, piste 8) à 30 jours PC.

6.3 Effets de l'inhibition de p125^{FAK} sur l'expression des homologues Bcl-2 selon l'état de différenciation entérocytaire

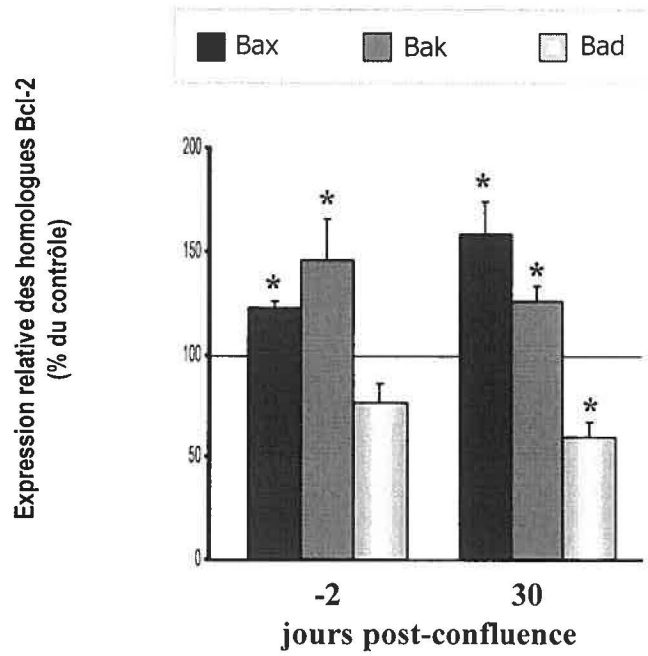
À -2 jours PC, l'inhibition de p125^{FAK} cause une baisse d'expression de l'homologue Bcl-2 anti-apoptotique Mcl-1, sans pour autant affecter les autres anti-apoptotiques (figure 22A, -2 PC). Pour ce qui est des pro-apoptotiques, nous observons une hausse d'expression de Bax et de Bak et aucun changement pour Bad (figure 22B, -2 PC). À 30 jours PC, nous observons une baisse d'expression des anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-X_L et Mcl-1 (figure 22A, 30 PC). De plus, nous observons une augmentation d'expression de Bax et Bak et une baisse du pro-apoptotique Bad (figure 22B, 30 PC). Ces balances d'expression qui penchent nettement en faveur des pro-apoptotiques corréleront avec l'apoptose détectée à -2 et à 30

Figure 22. Régulation différentielle de l'expression des homologues Bcl-2 par p125^{FAK}. Expression relative des homologues Bcl-2 : (A) anti-apoptotiques : Bcl-2 (~26 kD), Bcl-X_L (~28-30 kD) et Mcl-1 (~39-42 kD) et (B) pro-apoptotiques : Bax (~21 kD), Bak (~25-28 kD) et Bad (~28-32 kD) chez les cellules Caco-2/15 indifférenciées (-2 jours PC) et chez des cellules pleinement différenciées (30 jours PC) traitées pendant 48 heures en présence de 150 µM de cytochalasine D (+CD). Les protéines totales ont été lysées dans le tampon de Laemmli, puis séparées par SDS-PAGE (15%). Suite à un électrotransfert sur membrane de nitrocellulose, un immunobuvardage a été effectué avec des anticorps spécifiques (voir figure 1A) et les protéines ont été scannées par densitométrie au laser. Les niveaux relatifs d'expression des protéines analysées en présence de cytochalasine D (+CD) ont été évalués en comparant avec ceux-ci avec les niveaux d'expression en absence de sérum (SS) par la détermination de l'aire totale sous le pic (AU×mm) pour ainsi établir le ratio [(+CD/SS)×100%] (% du contrôle). Les colonnes représentant la moyenne ± SEM pour au moins 3 expériences séparées (n≥3) où 100 % du contrôle représente les niveaux d'expression dans les cultures contrôles (SS). À -2 et à 30 jours PC, les différences statistiquement significatives (0.001 ≤ p ≤ 0.01) pour les (A) anti-apoptotiques et pour les (B) pro-apoptotiques sont indiquées par un astérisque.

A



B



jours PC. L'inhibition de $p125^{FAK}$ provoque donc des effets distincts sur les homologues Bcl-2 selon l'état de différenciation entérocytaire.

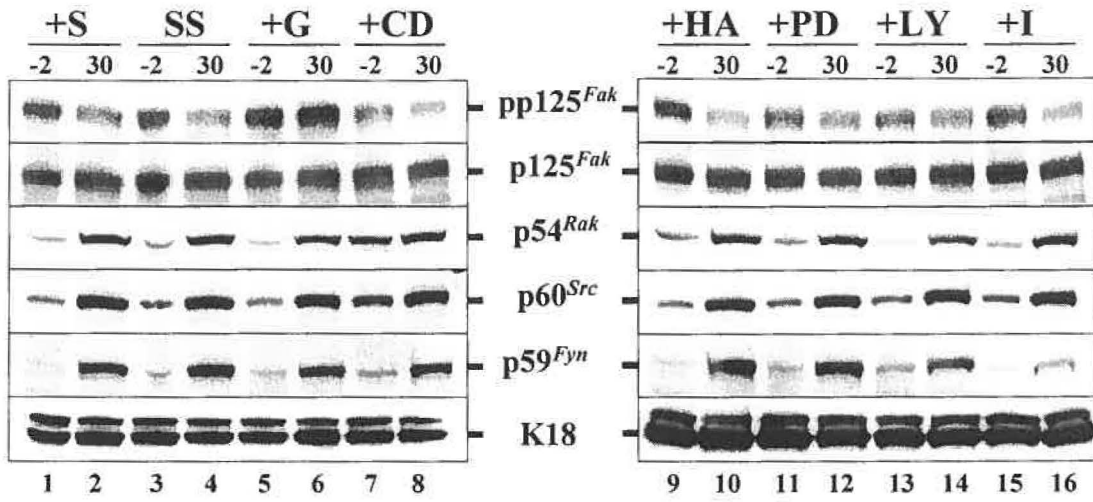
6.4 Effets des traitements sur le degré relatif d'activation de $p125^{FAK}$

Lorsque nous inhibons $p125^{FAK}$ avec la cytochalsine D (+CD), nous observons une baisse des niveaux relatifs d'activation de ce dernier à -2 (figure 23A, piste 7) et à 30 (figure 23A, piste 8) jours PC d'environ 75 %, confirmant ainsi l'efficacité de cet inhibiteur.

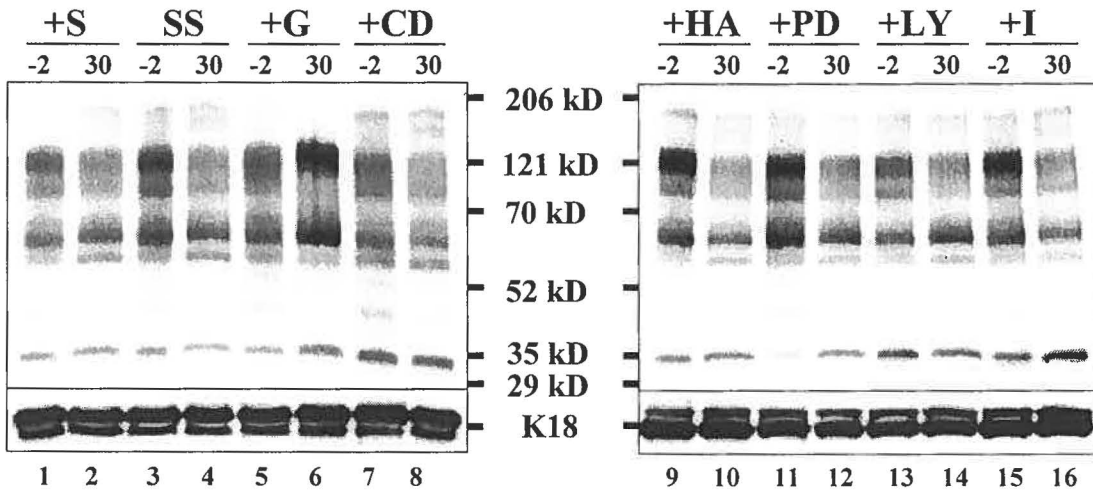
Selon les traitements, nous observons des effets variés sur les niveaux relatifs d'activation de $p125^{FAK}$ selon l'état de différenciation. Le traitement sans sérum (SS) étant notre contrôle, lorsque nous le comparons avec le traitement en présence de sérum (+S), nous observons aucun changement significatif à -2 (figure 23A, piste 3 vs piste 1) et à 30 jours PC (figure 23A, piste 4 vs piste 2). L'inhibition des tyrosines kinases (+G) inhibe l'activation de $p125^{FAK}$ à -2 (figure 23A, piste 5) et à 30 jours PC (figure 23A, piste 6). L'inhibition de la famille Src avec l'herbimycine A n'a aucun effet sur l'activation de $p125^{FAK}$ à -2 jours PC (figure 23A, piste 9), tandis qu'à 30 jours PC nous observons une légère baisse d'activation de $p125^{FAK}$ (figure 23A, piste 10). L'inhibition de (MEK-1/2)/(p42^{Erk-2}/p44^{Erk-1}) avec PD98059 et l'inhibition de la PI 3-kinase avec le LY294002 n'ont aucuns effets sur les niveaux d'activation de $p125^{FAK}$ à -2 jours PC (figure 23A, pistes 11 et 13) ainsi qu' à 30 jours PC (figure 23A, pistes 12 et 14). Enfin, la présence d'insuline

Figure 23. Régulation de p125^{FAK}, des tyrosines kinases Src : p60^{Src}, p59^{Fyn}, p54^{Rak} et des tyrosines kinases chez les cellules indifférenciées et différenciées. Les cellules Caco-2/15 ont été cultivées à -2 et 30 jours PC en absence de sérum (SS), en présence de 10 % de sérum (+S), en présence de 150 µM de génistéine (+G), en présence de 1 µM de cytochalasine D (+CD), en présence de 1µM d'herbimycine A (+HA), en présence de 20 µM de PD98059 (+PD), en présence de 30 µM de LY294002 (+LY) ou en présence de 10 µg/ml d'insuline (+I), puis lysées dans le tampon de Laemmli pour séparation des protéines par SDS-PAGE (4-15%). Suite à un électrotransfert sur membrane de nitrocellulose, des immunobuvardages successifs ont été effectués avec des anticorps spécifiques (A) pour détecter l'expression de différentes protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire : piste 1, forme phosphorylée de p125^{FAK} (~125 kD); piste 2, p125^{FAK} (~125 kD); piste 3, p54^{Rak} (~54 kD); piste 4, p60^{Src} (~60 kD) et 2); piste 5, p59^{Fyn} (~59 kD) et (B) pour détecter la phosphorylation sur résidus tyrosine. Un anticorps dirigé contre la cytokératine 18 (K18) a été utilisé pour vérifier l'équité en quantité de protéines pour chaque échantillon.

A



B



(+I) n'a pas d'effet significatif sur l'activation de $p125^{FAK}$ à -2 (figure 23A, piste 15) et à 30 jours PC (figure 23A, piste 16).

Pour ce qui est de l'effet des traitements sur l'expression de $p125^{FAK}$, nous n'observons pas d'effets majeurs sur les niveaux d'expression (figure 23A, $p125^{FAK}$ (piste 1 à 16)).

7. Membres de la famille Src ($p60^{Src}$, $p59^{Fyn}$ et $p54^{Rak}$).

7.1 Expression de $p60^{Src}$, $p59^{Fyn}$ et $p54^{Rak}$ au cours de la différenciation entérocytaire

L'expression de $p54^{Rak}$ et de $p60^{Src}$ augmente au cours de la différenciation (figure 21A, bande 3 et 4). L'expression de $p59^{Fyn}$ augmente fortement entre 0 et 5 jours PC pour ensuite se maintenir à des niveaux relativement stables (figure 21A, bande 5). En analysant la phosphorylation sur résidus tyrosine, nous observons, aux environs de 50-60 kDa, des modulations dans les patrons de phosphorylation en fonction de l'état de différenciation (figure 21B). À ~65 kD, les espèces observées sont fortement phosphorylées à -2 et à 0 jours PC et puis la phosphorylation baisse pour le reste du processus de différenciation. Aux ~60 kD, les espèces montrent plutôt un patron de phosphorylation qui augmente au cours de la différenciation. Ces observations suggèrent des rôles potentiellement différents pour les espèces retrouvées aux environs de ce poids moléculaire (membres de la famille Src entre autre) selon l'état de différenciation.

7.2 Implication des tyrosines kinases membres de la famille Src dans la survie entérocytaire

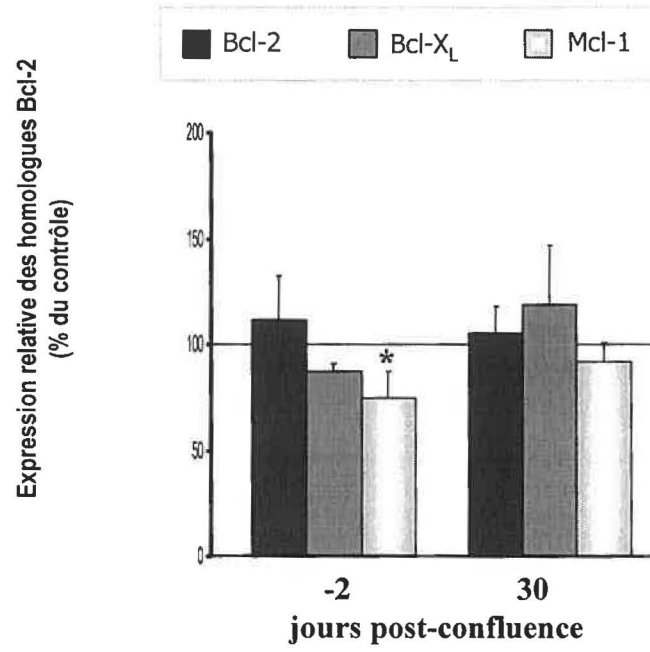
L'inhibition des tyrosines kinases de la famille Src avec l'herbimycine A à 1 μ M n'induit pas l'apoptose à -2 jours PC (figure 9A, piste 10) et à 30 jours PC (figure 9B, piste 10). De plus, la caspase-7 est inactive à -2 jours PC (figure 10, pistes 9); cependant, nous pouvons détecter une faible expression de la caspase-7 active à 30 jours PC (figure 10, piste 10). À première vue, les membres de la familles Src ne semblent pas impliqués dans la survie, du moins à -2 jours PC. Cependant, il est impossible de statuer sur leur implication dans la survie puisque : 1) nous n'avons pas analysé les niveaux relatifs d'activation de p60^{Src}, p59^{Fyn} et p54^{Rak}; 2) nous ne pouvons assumer que l'herbimycine A inhibe tous les membres de la famille Src (Park et al., 1991, Parsons et Parsons, 1997); et 3) la présence de la caspase-7 sous sa forme active à 30 jours, si minime soit-elle, suggère la présence d'apoptose.

7.3 Effets de l'inhibition des membres de la famille Src sur l'expression des homologues Bcl-2 selon l'état de différenciation entérocytaire

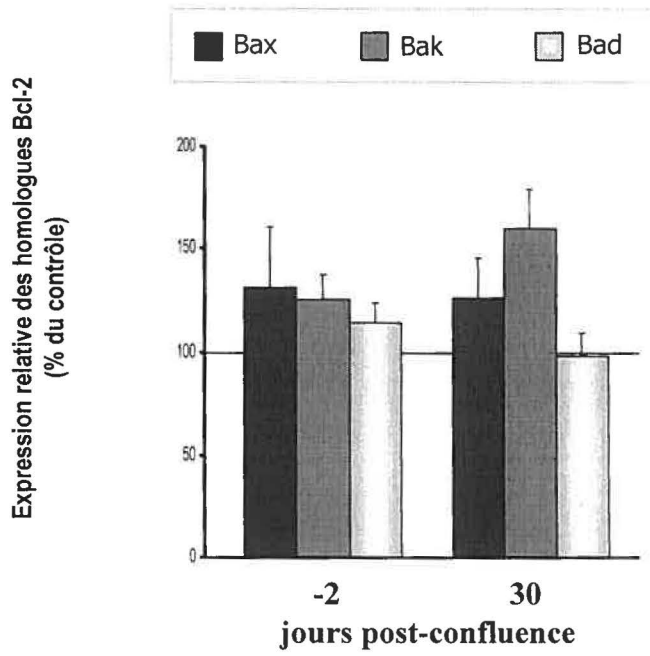
À -2 jours PC, l'inhibition des membres de la famille Src provoque une baisse d'expression de l'anti-apoptotique Mcl-1 tandis que l'expression de Bcl-2 et de Bcl-X_L n'est pas affectée (figure 24A, -2 PC). Pour les pro-apoptotiques, nous n'observons pas de changement d'expression pour Bax, Bak et Bad (figure 24B, -2 PC). À 30 jours PC, nous n'observons pas de changement pour l'expression des anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-X_L et

Figure 24. Régulation différentielle de l'expression des homologues Bcl-2 par les tyrosines kinases Src. Expression relative des homologues Bcl-2 : (A) anti-apoptotiques : Bcl-2 (~26 kD), Bcl-X_L (~28-30 kD) et Mcl-1 (~39-42 kD) et (B) pro-apoptotiques : Bax (~21 kD), Bak (~25-28 kD) et Bad (~28-32 kD) chez les cellules Caco-2/15 indifférenciées (-2 jours PC) et chez des cellules pleinement différenciées (30 jours PC) traitées pendant 48 heures en présence de 1 µM d'herbimycine A (+HA). Les protéines totales ont été lysées dans le tampon de Laemmli, puis séparées par SDS-PAGE (15%). Suite à un électrotransfert sur membrane de nitrocellulose, un immunobuvardage a été effectué avec des anticorps spécifiques (voir figure 1A) et les protéines ont été scannées par densitométrie au laser. Les niveaux relatifs d'expression des protéines analysées en présence d'herbimycine A (+HA) ont été évalués en comparant avec ceux-ci avec les niveaux d'expression en absence de sérum (SS) par la détermination de l'aire totale sous le pic (AU×mm) pour ainsi établir le ratio [(+HA/SS)×100%] (% du contrôle). Les colonnes représentant la moyenne ± SEM pour au moins 3 expériences séparées (n≥3) où 100 % du contrôle représente les niveaux d'expression dans les cultures contrôles (SS). À -2 et à 30 jours PC, les différences statistiquement significatives (0.001 ≤ p ≤ 0.01) pour les (A) anti-apoptotiques et pour les (B) pro-apoptotiques sont indiquées par un astérisque.

A



B



Mcl-1 (figure 24A, -30 PC), ainsi que pour les pro-apoptotiques Bax, Bak et Bad (figure 24B, 30 PC). Étant donné que nous observons aucune fragmentation de l'ADN internucléosomique et aucuns changements significatifs d'expression des homologues Bcl-2 à 30 jours PC, les traces de caspase-2 active observées par Western blot pourrait éventuellement résulter d'un indice de base d'apoptose.

7.4 Effets des traitements sur l' expression de $p60^{Src}$, $p59^{Fyn}$ et $p54^{Rak}$ selon l'état de différenciation entérocytaire

À -2 et à 30 jours PC, la présence de sérum (+S) ou d'insuline (+I), ou l'inhibition des tyrosines kinases (+G), des membres de la famille Src (+HA), de (MEK-1/2)/(p42^{Erk-2}/p44^{Erk-1}) (+PD), et de la PI 3-kinase (+LY) n'affectent pas l'expression de $p60^{Src}$ (figure 23A, pistes 1,2,5,6,9-16). Cependant, l'inhibition de $p125^{FAK}$ (+CD) stimule les niveaux d'expression de $p60^{Src}$ à -2 jours PC (figure 23A, piste 7), mais n'a aucun effet sur son expression à 30 jours PC (figure 23A, piste 8).

À -2 et à 30 jours PC, l'inhibition des tyrosines kinases (+G), de $p125^{FAK}$ (+CD), de (MEK-1/2)/(p42^{Erk-2}/p44^{Erk-1}) (+PD) et de la PI 3-kinase (+LY) n'affectent pas les niveaux d'expression de $p59^{Fyn}$ (figure 23A, piste 5-8,11-14). Cependant, l'inhibition des membres de la famille Src, la présence d'insuline (+I) ou la présence de sérum (+S) font diminuer légèrement l'expression de $p59^{Fyn}$ à -2 jours PC (figure 23A, pistes 1, 9 et 15). La présence de sérum et l'inhibition des membres de la famille Src n'affectent cependant pas l'expression

de p59^{Fyn} (Figure 23A, pistes 2 et 10) à 30 jours PC. tandis que la présence d'insuline fait chuter drastiquement son expression (figure 23A, piste 16).

À -2 et à 30 jours PC, la présence de sérum (+S) ou d'insuline (+I) ou l'inhibition des tyrosines kinases (+G), l'inhibition des membres de la famille Src (+HA), de (MEK-1/2)/(p42^{Erk-2}/p44^{Erk-1}) (+PD) n'affectent pas l'expression de p54^{Rak} (figure 23A, pistes 1-2,5-6,9-12,15-16). De plus, l'inhibition de p125^{FAK} (+CD) stimule l'expression de p54^{Rak} à -2 jours PC (figure 22A, piste 7), sans toutefois affecter l'expression de ce dernier à 30 jours PC (figure 23A, piste 8). L'inhibition de la PI 3-kinase (+LY) diminue l'expression de p54^{Rak} à -2 jours PC (figure 22A, piste 13), sans toutefois affecter son expression à 30 jours PC (figure 23A, piste 14).

Ainsi, l'expression de même que la régulation de l'expression des membres de la famille Src exhibent des distinctions selon l'état de différenciation entérocytaire.

IV-DISCUSSION

Dans la présente étude, nous avons examiné la question à savoir s'il existe des mécanismes de survie distincts selon l'état de différenciation entérocytaire. Pour ce faire, nous avons analysé l'impact des facteurs de croissance et des inhibiteurs de molécules et/ou de voie de signalisation sur la survie entérocytaire et sur l'expression des homologues Bcl-2 chez les cellules Caco-2/15 indifférenciées et différenciées. Tout d'abord, nous constatons l'existence de profils différentiels d'expression des homologues Bcl-2 au cours de la différenciation entérocytaire. De plus, nous constatons une implication différentielle selon l'état de différenciation pour les voies passant par p125^{FAK}, pour la voie (MEK-1/2)/(p42^{Erk-2}/p44^{Erk-1}) et pour la voie de la PI3-kinase. La voie (MEK-1/2)/(p42^{Erk-2}/p44^{Erk-1}) est impliquée dans la survie chez les entérocytes différenciés, mais ne semble pas jouer de rôle dans la survie des entérocytes indifférenciés. Par contre, la voie de la PI 3-K, est impliquée dans la survie des entérocytes tant indifférenciés que différenciés. Cependant, l'activation de p57^{Akt}, un effecteur en aval de la PI 3-K, semble être indépendante de PI 3-K chez les entérocytes indifférenciés. De plus, p57^{Akt} ne semble pas impliquée dans la survie des entérocytes indifférenciés. D'autre part, pour certains traitements ayant le même effet sur la survie chez les cellules indifférenciées et différenciées, nous observons malgré tout des modulations différentielles d'expression des homologues Bcl-2.

1. Les homologues Bcl-2 sont exprimés différemment au cours de la différenciation entérocytaire

Puisque les homologues Bcl-2 exercent un rôle crucial dans la phase décisionnelle de l'apoptose, il a été suggéré que les gradients d'expression différentiels de ceux-ci, observés le long de l'axe crypte-villosité (Vachon et al., 2000; Hockenbery et al., 1991; LeBrun et al., 1993; Lu et al., 1993; Krajewski et al., 1994b, 1994c, 1995; Merritt et al., 1995; Krajewski et al., 1996; Wilson et Potten, 1996; Hirose et al., 1997; Aschoff et al., 1999) pourraient refléter un moyen de régulariser la survie entérocytaire de façon différentielle (Potten, 1992, 1997; Jones et Gores, 1997). De plus, la balance (expression et activité) des homologues Bcl-2 pro- versus anti-apoptotiques détermine en grande partie la façon dont les cellules répondent à des signaux de survie et/ou de mortalité (Gajewski et Thompson, 1996; Reed et al., 1996; Adams et Cory, 1998; Evan et Littlewood, 1998; Saini et Walker, 1998). Nos résultats montrent qu'il y a établissement de profils distincts d'expression pour les homologues Bcl-2 anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-X_L et Mcl-1, et pour les pro-apoptotiques Bax, Bak et Bad, tout au long du processus de différenciation entérocytaire. Généralement, nous constatons que ces modulations sont d'autant plus importantes lorsque nous comparons les niveaux d'expression des cellules indifférenciées par rapport à ceux des cellules pleinement différenciées. Les gradients d'expression observés *in vitro* viennent appuyer les résultats d'une étude sur l'expression des homologues Bcl-2 *in vivo* le long de l'axe crypte-villosité de l'intestin grêle humain (18-20 semaine), qui montrait clairement la présence de gradients d'expression différentiels pour ces homologues le long de l'axe (Vachon et al., 2000). Par exemple, cet article montre la présence d'un gradient d'expression croissant de

Mcl-1 le long de l'axe crypte-villosité *in situ*. Par analogie, nous observons également une augmentation de l'expression de Mcl-1 au cours de la différenciation des Caco-2/15.

De plus, les niveaux d'expression des homologues Bcl-2 peuvent être modulés différemment selon l'état de différenciation en présence de facteurs de croissance (insuline) ou suite à l'inhibition à large spectre des tyrosines kinases (+G). L'insuline cause des modulations d'expression qui favorise une balance vers les anti-apoptotiques tandis que phénomène inverse est observé lorsque les tyrosines kinases sont inhibées. Cependant, bien que l'insuline promouvoit la survie et que l'inhibition des tyrosines kinases induise l'apoptose et ce, tant chez les entérocytes indifférenciés que différenciés, nous observons malgré tout des modulations d'expression différentielles des homologues Bcl-2 pour un même traitement. Par exemple, l'insuline cause une hausse d'expression de Bcl-2 à -2 jours PC sans toutefois affecter son expression à 30 jours PC. Par conséquent, nos résultats dans leur ensemble démontrent que l'expression de profils distincts d'homologues Bcl-2 s'acquiert au cours du processus entérocytaire, et que ces profils distincts sous-tendent des mécanismes différentiels de régulation d'expression homologues.

2. Implication différentielle de la voie de signalisation (MEK-1/2)/(p42^{Erk-2}/p44^{Erk-1}) dans la survie entérocytaire selon de l'état de différenciation cellulaire

La voie (MEK-1/2)/(p42^{Erk-2}/p44^{Erk-1}) est reconnue comme étant impliquée dans la survie de plusieurs types cellulaires (Xia et al., 1995; Gardner et Johnson, 1996; Kinoshita et

al., 1997; Le Gall et al., 2000). De plus en plus d'études montrent que le rôle de cette voie dans la survie est en outre associé à la régulation des homologues Bcl-2. Par exemple, l'expression des anti-apoptotiques Mcl-1, Bcl-2 et Bcl-X_L peut être augmenté par la voie (MEK-1/2)/(p42^{Erk-2}/p44^{Erk-1}) (Townsend et al., 1998; Cross et al., 2000; Leu et al., 2000; Desire et al., 2000; Liu et al., 1999; Boucher et al., 2000; Huang et al., 2000). De plus, chez les cellules Caco-2/15, nous avons également montré que l'inhibition de la voie (MEK-1/2)/(p42^{Erk-2}/p44^{Erk-1}) faisait baisser l'expression de Bcl-2 chez les entérocytes indifférenciées tandis que l'inhibition de cette même voie chez les entérocytes différenciés faisait chuter Bcl-2 et Bcl-X_L (figure 15A). En analysant le rôle de la voie (MEK-1/2)/(p42^{Erk-2}/p44^{Erk-1}) au niveau de la survie cellulaire chez les entérocytes indifférenciés et chez les entérocytes différenciés, nos résultats montrent un rôle différentiel selon l'état de différenciation. En effet, la voie (MEK-1/2)/(p42^{Erk-2}/p44^{Erk-1}) est impliquée dans la survie des entérocytes différenciés, mais ne semble pas jouer de rôle dans la survie des entérocytes indifférenciés. Plusieurs observations supportent ce rôle différentiel dans la survie. Premièrement, nous observons une modulation importante des niveaux relatifs d'activation de p42^{Erk-2} au cours de la différenciation; phénomène qui a déjà été décrit auparavant (Lévy et al., 1998; Aliaga et al., 1999). En effet, les niveaux d'activation de p42^{Erk-2} sont beaucoup plus élevés chez les entérocytes indifférenciés, suggérant ainsi des rôles différentiels pour la voie (MEK-1/2)/(p42^{Erk-2}/p44^{Erk-1}). Deuxièmement, grâce à la visualisation de la fragmentation de l'ADN internucléosomique et grâce à la détection de la caspase-7 (forme active ou inactive), nous avons déterminé que l'inhibition de la voie (MEK-1/2)/(p42^{Erk-2}/p44^{Erk-1}) n'a pas d'effet sur la survie chez les entérocytes indifférenciés tandis, que chez les entérocytes différenciés, l'inhibition de cette voie induit l'apoptose. Troisièmement, nous constatons que

l'inhibition de la voie (MEK-1/2)/(p42^{Erk-2}/p44^{Erk-1}) par PD98059 est moins efficace chez les entérocytes indifférenciés (~ 40 % d'inhibition) que chez les entérocytes différenciés (~ 70 %), où l'apoptose est observée. Étant donné que p42^{Erk-2} est fortement activée dans des conditions standards de culture (+sérum) chez les entérocytes indifférenciés, nous avons émis l'hypothèse que peut-être nous n'arrivons pas à inhiber efficacement cette voie avec 20 µM de PD98059 chez ces mêmes cellules. Cependant, comme mentionné auparavant (section résultats) même à 60 µM de PD98059 nous n'observons pas davantage d'inhibition de p42^{Erk-2}. La durée des traitements (48 heures) sans sérum pourrait mener à une suractivation de cette voie, rendant ainsi son inhibition plus difficile. Il aurait été intéressant de regarder l'effet de nos inhibiteurs en présence de sérum ou alternativement de sevrer nos cellules avant d'ajouter le sérum et/ou les inhibiteurs pour vérifier si cette voie est plus facilement inhibée en procédant de ces façons. Par contre, la chute d'activation de p42^{Erk-2} (~ 65%) observée (figure 16A, +HA) suite à l'inhibition des membres de la famille Src chez les entérocytes indifférenciés et ce, sans qu'il y ait induction d'apoptose, suggère fortement que la voie (MEK-1/2)/(p42^{Erk-2}/p44^{Erk-1}) n'est pas impliquée dans la survie chez les cellules indifférenciées. Finalement, suite à l'inhibition de la voie (MEK-1/2)/(p42^{Erk-2}/p44^{Erk-1}), nous observons des modulations différentielles des homologues Bcl-2 en fonction de l'état de différenciation. À première vue, il est semblable difficile d'interpréter de tels résultats étant donné que l'inhibition de cette voie mène à des chutes des homologues pro- et anti-apoptotiques. L'expression des homologues Bcl-2 peut nous fournir des indices intéressants sur l'état de survie, cependant, il faut toujours garder en tête qu'il existe également d'autres mécanismes qui régularisent l'activité des homologues (ex : la phosphorylation) qui ont un rôle important à jouer au niveau des fonctions biologiques des homologues Bcl-2 et que de

plus, il existe d'autres homologues Bcl-2 (non analysés dans ce travail) qui pourraient avoir également des rôles importants dans la survie entérocytaire.

De plus, l'observation qui montrent une inhibition de l'activation de la voie (MEK-1/2)/(p42^{Erk-2}/p44^{Erk-1}) en présence de sérum (+S) (figure 16) autant chez les cellules indifférenciées que différenciées est surprenante à première vue. Cependant ce phénomène est aussi observé chez les HIEC-6 (C. Harnois, manuscrit en préparation). Cependant, le sérum étant composé d'une multitude de facteurs biologiques connus et inconnus, implique la possibilité de facteurs inhibant l'activation de la voie (MEK-1/2)/(p42^{Erk-2}/p44^{Erk-1}). Cette hypothèse permettrait ainsi d'expliquer pourquoi nous observons une activation maximale de la voie (MEK-1/2)/(p42^{Erk-2}/p44^{Erk-1}) en absence de sérum.

3. Implication de la voie de signalisation PI 3-K dans la survie entérocytaire selon l'état de différenciation cellulaire

La voie PI 3-K/p57^{Akt} est une autre voie reconnue pour être impliquée dans la survie dans plusieurs types cellulaire (Wymann et Pirola, 1998; Datta et al., 1999; Chan et al., 1999; Vanhaesebroeck et Alessi, 2000). De plus en plus d'études montrent également un rôle pour cette voie dans la survie qui est associée à la régulation des homologues Bcl-2. Par exemple, l'expression des anti-apoptotiques Mcl-1, Bcl-2 et Bcl-X_L peut être augmentée par la voie PI 3-K/p57^{Akt} (Pugazhenthil et al., 2000; Wang et al., 1999; Constantino et al., 2000; Huang et al., 2000). De plus, chez les cellules Caco-2/15, nous avons également montré que

l'inhibition de la voie PI3-K/p57^{Akt} faisait chuter l'expression de Bcl-X_L et de Mcl-1 tant chez les entérocytes indifférenciés que chez les entérocytes différenciés (figure 18A). Nos résultats démontrent que la voie de la PI3-kinase est impliquée dans la survie des entérocytes tant indifférenciés que différenciés. De plus, p57^{Akt} ne semble pas impliquée dans la survie des entérocytes indifférenciés. Plusieurs observations supportent cette implication différentielle de la voie PI3-K/p57^{Akt} dans la survie entérocytaire. Premièrement, nous avons démontré que la PI3-kinase est impliquée dans la survie entérocytaire puisque l'inhibition de celle-ci active la caspase-7 et induit l'apoptose à -2 et 30 jours PC (figures 9 et 10). Cependant, les signaux de survie ne sont pas médiés par mTOR, un autre effecteur en aval de la PI3-kinase. Deuxièmement, nous observons une modulation importante des niveaux relatifs d'activation de p57^{Akt} au cours de la différenciation. En effet, les niveaux d'activation de p57^{Akt} sont beaucoup plus élevés chez les entérocytes indifférenciés, suggérant ainsi une possibilité d'implication différentielle dans la survie. Troisièmement, nous avons également regardé l'effet de l'inhibition de la PI3-K sur les niveaux d'activation de p57^{Akt}. L'inhibition de la PI 3-kinase n'affecte pas l'activation de p57^{Akt} chez les entérocytes indifférenciés tandis que chez les entérocytes différenciés p57^{Akt} est inhibé à ~ 65 %. Donc, l'activation de p57^{Akt}, un effecteur en aval de la PI3-K, semble être indépendante de PI 3-K chez les entérocytes indifférenciés. La situation observée chez les entérocytes indifférenciés est donc en contradiction avec la voie classique d'activation de p57^{Akt} par la PI 3-kinase. Cependant, il a déjà été rapporté que p57^{Akt} pouvait être activé de façon PI 3-K-indépendante; par exemple, p57^{Akt} peut en outre être activé par la voie cAMP/PKA (Downward; 1998; Datta et al., 1999; Toker, 2000; Vanhaesebroeck et Alessi, 2000; Cross et al., 2000). De plus, ces observations suggèrent que les seconds messagers

(phosphoinositides) générés par la PI 3-kinase peuvent activer d'autres kinases essentielles pour la survie des entérocytes indifférenciés. Par exemple, PDK-1 (« phosphatidyl-inositol lipid-dépendant kinase ») et ILK (« integrin-linked kinase ») sont des kinases en amont de $p57^{Akt}$ qui sont impliquées dans la transmission de nombreux signaux intracellulaires (Datta et al., 1999; Toker, 2000; Vanhaesebroeck et Alessi, 2000); et pourraient donc être des candidats alternatifs impliqués dans la promotion de la survie « PI3-K-dépendante ». À cet effet, une étude récente a montré que l'insuline active PFK-2 (« phosphofructo-2-kinase ») via des kinases dépendantes de PDK-1 et non de $p57^{Akt}$ (Bertrand et al., 1999). Enfin, l'inhibition de la PI3-kinase cause une chute des anti-apoptotiques Bcl-X_L et Mcl-1 à -2 et à 30 jours PC favorisant ainsi une balance qui penche en faveur des pro-apoptotiques. Ces résultats concordent avec d'autres études qui ont déjà rapporté : 1) une baisse d'expression de Mcl-1 (Wang et al., 1999; Huang et al., 2000) et 2) une baisse d'expression de Bcl-X_L (Constantino et al., 2000) suite à l'inhibition de la PI3-kinase. Cependant, pour ajouter à cette complexité apparente au niveau de la régulation des homologues Bcl-2, d'autres études ont démontré que la régulation de ceux-ci pouvait être le résultat de la coopération de plusieurs voies (Huang et al., 2000; Constantino et al., 2000). Par exemple, chez les cellules hématopoïétiques, les voies PI3-K/ $p57^{Akt}$ et la voie (MEK-1/2)/($p42^{Erk-2}/p44^{Erk-1}$) sont toutes les deux impliquées dans la régulation de l'expression de Mcl-1 (Huang et al., 2000). Mises ensemble, ces observations supportent le concept que la survie cellulaire est régulée par des mécanismes cellulaires spécifiques (selon l'état de différenciation et/ou selon le type cellulaire) et par l'intégration de signaux de survie pouvant venir de plusieurs voies de signalisation pouvant communiquer et s'influencer mutuellement (Gajewski et Thompson,

1996; Reed et al., 1996a,b; Anderson, 1997; Adams et Cory, 1998; Datta et al., 1999; Cross et al., 2000; Vanhaesebroeck et Alessi, 2000).

4. Implication des voies reliées à l'adhésion cellulaire (p125^{FAK} et famille Src) dans la survie entérocytaire selon l'état de différenciation

Finalement, le dernier aspect de nos études consistait à déterminer l'implication dans la survie entérocytaire de différentes molécules de signalisation reliées à l'adhésion cellulaire. La kinase d'adhésion focalisée p125^{FAK} joue un rôle central dans la médiation de signaux de survie via l'adhésion cellulaire (Schlaepfer et al., 1999; Frisch et al., 1996; Ilic et al., 1998; Giancotti et Ruoslahti, 1999). À cet effet, nous observons que les niveaux d'activation de p125^{FAK} sont très élevés à -2 et 0 jours PC, et chutent par la suite pour atteindre leurs niveaux le plus bas à 30 jours PC suggérant ainsi une implication différentielle de p125^{FAK}. Cette baisse d'activation de p125^{FAK} au cours de la différenciation a déjà été rapporté auparavant chez les Caco-2 (Lévy et al., 1998). L'induction d'apoptose et une balance des homologues Bcl-2 penchant en faveur des pro-apoptotiques à -2 et à 30 jours PC suite à l'inhibition de p125^{FAK} corrèle avec une chute importante des niveaux d'activation de p125^{FAK}. Fait intéressant, l'inhibition de p125^{FAK} fait augmenter l'expression des homologues pro-apoptotiques Bax et Bak. Les exemples d'études montrant des voies de signalisation spécifiquement impliquées dans la régulation de l'expression d'homologues Bcl-2 pro-apoptotiques sont plutôt rares. Cependant, une étude a déjà rapporté chez les cellules cryptales IEC-18 transformées par Ras (cellules épithéliales intestinales de rat), une

baisse d'expression de Bak suite à l'inhibition de la PI 3-kinase (Rosen et al., 1998). Ce même groupe a également démontré que suite à la perturbation de l'adhésion cellulaire chez ces mêmes cellules, il y avait chute d'expression de Bcl-X_L et entrée en anoïkose (Rosen et al., 2000). Dans notre cas, l'inhibition de p125^{FAK} chez les entérocytes différenciés provoque une baisse d'expression des trois anti-apoptotiques dont Bcl-X_L. L'implication de p125^{FAK} dans la survie est importante puisque cette kinase est capable d'activer plusieurs voies de signalisation dont la voie des kinases MAP (Schlaepfer et al., 1994) et la voie de la PI 3-kinase (Chen et al., 1996). C'est cette relation au niveau de la survie qui semblent être retrouvée chez les entérocytes indifférenciés et différenciés, puisque l'inhibition de p125^{FAK} cause une chute des niveaux relatifs d'activation de p42^{Erk-2} et de p57^{Akt}.

L'absence de fragmentation d'ADN internucléosomique suite à l'inhibition des tyrosines kinases membres de la famille Src à -2 et à 30 jours PC suggère, à première vue, que celles-ci ne sont pas impliquées dans la survie entérocytaire. Cependant, il n'est présentement pas possible d'en conclure ainsi puisque nous n'avons pas analysé les niveaux relatifs d'activation de p60^{Src}, p59^{Fyn} et p54^{Rak} et de plus, nous ne pouvons assumer que l'herbimicyne A inhibe tous les membres de la famille Src. De plus, à 30 jours PC, nous observons des traces d'activation de la caspase-7. Ceci indique donc qu'un rôle pour les tyrosines kinases Src dans la survie entérocytaire ne peut être exclu. Le seul effet observé au niveau de l'expression des homologues Bcl-2 suite à l'inhibition des tyrosines kinases Src est une chute de l'anti-apoptotique Mcl-1 à -2 jours PC. Dans la littérature, une seule étude a déjà rapporté un effet d'un membre de la famille Src sur l'expression d'un homologue Bcl-2. Cette étude montrait que l'inhibition de p60^{Src} mène à une baisse d'expression de Bcl-X_L

et à l'induction de l'apoptose chez les fibroblastes (Karni et al., 1999). Au niveau des effets des traitements sur l'expression des membres de la famille Src, nous observons quelques modulations d'expression intéressantes. Par exemple, l'observation qui montre que l'inhibition de p125^{FAK} à -2 jours PC fait augmenter les niveaux d'expressions de p54^{Rak} et de p60^{Src} suggère la présence mécanismes de survie adhésion "dépendants" compensatoires. De plus, p59^{Fyn} semble être sensible à l'effet de l'insuline puisque nous observons une chute de cette kinase à -2 et à 30 jours PC suite à ce traitement, suggérant ainsi la présence d'un boucle de rétroaction négative. Cette hypothèse semble appuyée par une étude qui montrait que p59^{Fyn} peut phosphoryler IRS-1 (« insulin-receptor-substrate ») suite à une stimulation à l'insuline (Sun et al., 1996).

En résumé, la survie entérocytaire humaine est gouvernée par des mécanismes de régulation distincts selon l'état de différenciation qui corrèle avec des différences observées au niveau de l'établissement de profils distincts d'expression et de la régulation des homologues Bcl-2, ceci étant couplé à une implication différentielle des molécules et/ ou des voies de signalisation pour chaque stade de différenciation. Ces observations appuient donc fortement le concept d'une régulation différentielle de la survie entérocytaire humaine le long de l'axe crypte-villosité *in vivo*.

V-CONCLUSIONS

En conclusion, notre étude montre que la survie entérocytaire humaine est régulée par des mécanismes différentiels selon l'état de différenciation. Plusieurs observations appuient ce constat. Premièrement, la démonstration de l'existence de profils différentiels d'expression des homologues Bcl-2 anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-X_L et Mcl-1 et pro-apoptotiques Bax, Bak et Bad au cours de la différenciation entérocytaire suggèrent la présence de mécanismes de régulation de survie distincts. De plus, nous avons montré que la voie (MEK-1/2)/(p42^{Erk-2}/p44^{Erk-1}) est impliquée dans la survie chez les entérocytes différenciés, mais ne semble pas jouer de rôle dans la survie des entérocytes indifférenciés. Quant à la voie de la PI 3-K, celle-ci est impliquée dans la survie des entérocytes tant indifférenciés que différenciés. Cependant, l'activation de p57^{Akt}, un effecteur en aval de PI 3-K, semble être indépendante de PI 3-K chez les entérocytes indifférenciés. De plus, p57^{Akt} ne semble pas impliquée dans la survie des entérocytes indifférenciés. De plus, nous avons montré que p125^{FAK}, une composante importante de la signalisation par l'adhésion cellulaire, est impliqué dans la survie chez les entérocytes indifférenciés et différenciés. Cependant, malgré le fait que l'insuline promeut la survie et que l'inhibition de p125^{FAK} et/ou de PI 3-kinase induit l'apoptose et ce, peu importe l'état de différenciation, ces traitements ont des effets différentiels sur l'expression des homologues Bcl-2 à -2 et 30 jours PC, suggérant encore une fois des mécanismes de régulation de survie distincts selon l'état de différenciation. Ces résultats intéressants amènent évidemment plusieurs questions qui restent à être élucidées. Par exemple, quelles sont les voies de signalisation de survie alternatives à p57^{Akt} qui dépendent également de la PI 3-kinase ? Est-ce que différentes

isoformes de p57^{Akt} pourrait avoir des rôles différentiels dans la survie entérocytaire ? De telles isoformes (Akt-1 à -3) existent et semblent excercer des fonctions différentes (Datta et al., 1999; Chan et al., 1999; Vanhaesebroeck et Alessi, 2000). Des études de transfection avec les différentes isoformes de p57^{Akt} et/ou avec des dominants négatifs de ces isoformes pourraient sûrement nous procurer des informations précieuses sur l'implication précise de ces kinases dans la survie entérocytaire. Il serait également intéressant de clarifier le rôle des membres de la famille Src dans la survie par des essais kinases et par des études de transfection de formes constitutivement actives ou de dominants négatifs des différents membres. De plus, malgré le fait que nous ayons analysé la régulation de 6 homologues Bcl-2 au cours de la différenciation entérocytaire, il serait également intéressant d'établir le profil d'expression des autres membres de la famille. Éventuellement, la compréhension des mécanismes de survie entérocytaire pourront permettre l'identification de cibles moléculaires spécifiques en vue de court-circuiter les signaux de mortalité, ce qui pourrait contribuer à l'élaboration de traitements pour plusieurs désordres gastro-intestinaux chroniques caractérisés par une apoptose illicite, comme la maladie de Crohn ou la colite ulcéreuse.

REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier le Dr Pierre H. Vachon, mon mentor, pour m'avoir fait confiance et m'avoir permis de travailler sur un projet très stimulant et très intéressant. Je remercie également le Dr J.C. Reed pour nous avoir fourni des outils essentiels à notre étude. Un merci tout particulier à Anne Vézina pour son aide technique et pour son encouragement. Je salue également mes compères de travail Patrick Laprise, David Gagné, Charlène Harnois et Éric Cardin avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir au cours de ces deux années. J'exprime toute ma gratitude envers ma famille pour leur soutien depuis le tout début des mes études universitaires. Finalement, j'exprime également toute ma gratitude pour ma copine Joëlle, pour sa patience et son soutien depuis le tout début de ma maîtrise.

BIBLIOGRAPHIE

- Aagaard-Tillery, K.M. et Jelinek, D.F. (1994), Inhibition of human B lymphocyte cell cycle progression and differentiation by rapamycin., *Cell Immunol.* 156 : 493-507.
- Abraham, R.T., Mammalian target of rapamycin : immunosuppressive drugs uncover a novel pathway of cytokine receptor signaling., *Curr. Opin. Immunol.* 10 : 330-336.
- Adam, J.M. et Cory, S. (1998), The Bcl-2 protein family : arbiters of cell survival., *Science* 281 :1322-1326.
- Aliaga, J.C., Deschênes, C., Beaulieu, J.-F., Calvo, E.L. et Rivard, N. (1999), Requirement of the MAP kinase cascade for cell cycle progression and differentiation of human intestinal cells., *Am. J. Physiol.* 277(3 Pt 1):G631-41.
- Allesi, D.R., Cuenda, A., Cohen, P., Dudley, D.T., Saltiel, A.R. (1995), PD098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo., *J. Biol. Chem.* 270 : 27489-27495.
- Anderson, P.(1997), Kinase cascades regulating the entry into apoptosis., *Microbiol. Mol. Rev.* 61 : 33-46.
- Aschoff, A.P., Ott, U., Fünfstück et Stein, G. (1999), Colocalization of Bax and Bcl-2 in small intestine and kidney biopsies with different degrees of DNA fragmentation. *Cell Tissue Res.* 296 : 351-357.
- Bachelder, R.E., Ribick, M.J., Marchetti, A., Falcioni, R., Soddu, S., Davis, K.R. et Mercurio A.M. (1999), p53 inhibits $\alpha\beta 4$ integrin survival signaling by promoting the caspase-3-dependent cleavage of AKT/PKB., *J. Cell Biol.* 147 : 1063-1072.
- Beaulieu, J.-F., Nichols, B. et Quaroni, A. (1989), Posttranslational regulation of sucrase-isomaltase expression in intestinal crypt and villus cells., *J. Biol. Chem.* 264 : 20000-20011.
- Beaulieu, J.-F. et Quaroni, A. (1991), Clonal analysis of sucrase-isomaltase expression in the human colon adenocarcinoma Caco-2 cells., *Biochem J.* 280 : 599-608.
- Beretta, L., Gingras, A.C., Svitkin, Y.V., Hall, M.N. et Sonenberg, N. (1996), Rapamycin blocks the phosphorylation of 4E-BP1 and inhibits cap-dependent initiation of translation., *EMBO J.* 15 : 658-664.
- Berra, E., Diaz-Meco, M.T. et Moscat, J. (1998), The activation of p38 and apoptosis by the inhibition of erk is antagonized by the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway., *J. Biol. Chem.* 273 : 10792-10797.

Bertrand, L., Alessi, D.R., Deprez, J., Deak, M., Viaene, E., Rider, M.H. et Hue, L. (1999), Heart 6-phosphofructo-2-kinase activation by insulin results from Ser-466 and Ser-483 phosphorylation and requires 3-phosphoinositide-dependent kinase-1, but not protein kinase B. *J. Biol. Chem.* 274 : 30927-30933.

Biggs, W.H., Meisenhelder, J., Hunter, T., Cavenee, W.K. et Arden, K.C. (1999), Protein kinase B-Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 : 7421-7426.

Blair, L.A.C., Bence-Hanulec, K.K., Metha, S., Franke, T., Kaplan, D. et Marshall, J. (1999), Akt-dependent potentiation of L channels by insulin-like growth factor-1 is required by neuronal survival. *J. Neurosci.* 19 : 1940-1951.

Blais, A., Bissonette, P. et Bertheloot, A. (1987), Common characteristics for Na⁺ dependent sugar transport in Caco-2 cells and human fetal colon. *J. Membr. Biol.* 99 : 113-125.

Blume-Jensen, P., Janknecht, R. et Hunter, T. (1998), The kit receptor promotes cell survival via activation of PI 3-kinase and subsequent Akt-mediated phosphorylation of Bad on Ser136. *Curr. Biol.* 8 : 779-782.

Boise, L.H., Gonzalez-Garcia, M., Postema, C.E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L.A., Mao, X., Nunez, G. et Thompson, C.B. (1993), Bcl-x, a Bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74 : 597-608.

Bolen, J.B. et Brugge, J.S. (1997), Leucocyte protein tyrosine kinases : potential targets for drug discovery. *Ann. Rev. Immunol.* 15 : 371-404.

Boudreau, N., Sympton, C.J., Werb, Z. et Bissel, M.J. (1995), Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. *Science* 267 : 891-893.

Boucher, M.J., Morisset, J., Vachon, P.H., Reed, J.C., Laine, J. et Rivard, N. (2000), MEK/ERK signaling pathway regulates the expression of Bcl-2, Bcl-X(L), and Mcl-1 and promotes survival of human pancreatic cancer cells. *J. Cell. Biochem.* 79 : 355-369.

Breitschopf, K., Haendeler, J., Malchow, P., Zeiher, A.M. et Dimmeler, S. (2000), Posttranslational modification of Bcl-2 facilitates its proteasome-dependent degradation : molecular characterization of the involved signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* 20 : 1886-1896.

Brown, E.J., Albers, M.W., Shin, T.B., Ichikawa, K., Keith, C.T., Lane, W.S. et Schreiber, S.L. (1994), A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature* 369 : 756-758.

Brown, M.T. et Cooper, J.A. (1996), Regulation, substrates and function of Src. *Biochem. Biophys. Acta.* 1287 : 121-149.

Brunet, A., Bonni, A., Zigmund, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J. et Greenberg, M.E. (1999), Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor., *Cell* 96 : 857-868.

Brunn, G.J., Hudson, C.C., Sekulic, A., Williams, J.M., Hosoi, H., Houghton, P.J., Lawrence, J.C. et Abraham, R.T. (1997), Phosphorylation of the translational repressor PHAS-I by mammalian target of rapamycin., *Science* 277 : 99-101.

Cardone, M.H., Roy, N., Stennicke, H.R., Salvasen, G.S., Franke, T.F., Stanbridge, E., Frisch, S., et Reed, J.C. (1998), Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation., *Science* 282 : 1318-1321.

Chan, T.O., Rittenhouse, S.E. et Tsichlis, P.N. (1999), AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases : kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation., *Ann. Rev. Biochem.*, 68 : 965-1014.

Chantret, I., Rodolosse, A., Barbat, A., Dussaulx, E., Brot-Laroche, E., Zweibaum, A. et Rousset, M. (1994), Differential expression of the cell line Caco-2 : Evidences for glucose-dependent negative regulation., *J. Cell Sci.* 107 : 213-225.

Chen, H.C., Appeddu, P.A., Isoda, H. et Guan, J.L. (1996), Phosphorylation of tyrosine 397 in focal adhesion kinase is required for binding phosphatidylinositol 3-kinase., *J. Biol. Chem.* 271 : 26329-26334.

Chen, R.-H., Su, Y.-H., Chuang, R.L.C. et Chang, T.-Y. (1998), Suppression of transforming growth factor beta-induced apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway., *Oncogene* 17 : 1959-1968.

Cheng, E.H.Y., Kirsch, D.G., Clem, R.J., Ravi, R., Kastan, M.B., Bedi, A., Ueno, K. et Hardwick, J.M. (1997), Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases., *Science* 278 : 1966-1968.

Chittenden, T., Flemington, C., Houghton, A.B., Ebb, R.G., Gallo, G.J., Elangovan, B., Chinnadurai, G. et Lutz, R.J. (1995), A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions., *EMBO J.* 14 : 5589-5596.

Chiu, M.I., Katz, H., et Berlin, V. (1994), RAPT1, a mammalian homolog of yeast Tor, interacts with the FKBP12/rapamycin complex, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 : 12574-12578.

Clark, E.A. et Brugges, J.S. (1995), Integrins and signal transduction pathways : The road taken., *Science* 268 : 233-239.

Clem, R.J., Cheng, E.H.Y., Karp, C.L., Kirsch, D.G., Ueno, K., Takahasi, A., Kastan, M.B., Griffin, D.E., Earnshaw, W.C., Veljuona, M.A. et Hardwick, J.M. (1998), Modulation of cell death by Bcl-XL through caspase interaction., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 : 554-559.

- Constantino, S., Santo, R., Dumon, S., Mayeux, P.I, Gisselbrecht, S. et Gouilleux, F. (2000), Cooperation between STAT5 and phosphatidylinositol 3-kinase in the IL-3-dependent survival of a bone marrow derived cell line., *Oncogene*, 19 : 1164-1172.
- Coppolino, M.G. et Dedhar, S. (2000), Bi-directional signal transduction by integrin receptors., *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 32 : 171-188.
- Cross, T.G., Scheel-Toellner, D., Henriquez, N.V., Deacon, E., Salmon, M. et Lord, L.M. (2000), Serine-threonine protein kinases and apoptosis., *Exp. Cell Res.* 256 : 34-41.
- Crowder, R.J. et Freeman, R.S. (1998), Phosphatidylinositol 3-kinase and akt protein kinase are necessary and sufficient for the survival of nerve growth factor-dependent sympathetic neurons., *J. Neurosci.* 18 : 2933-2943.
- Danilkovitch, A., Donley, S., Skeel, A., Leonard, E.J. (2000), Two independent signaling pathways mediate the antiapoptotic action of macrophage-stimulating protein on epithelial cells., *Mol. Cell. Biol.* 20 : 2218-2227.
- Datta, S.R., Brunet, A., et Greenberg, M.E. (1999), Cellular survival : a play in three Akts., *Genes Dev.* 13 : 2905-2927.
- Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y. et Greenberg, M.E. (1997), Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery., *Cell* 91 : 231-241.
- Datta, S.R., Katsov, A., Hu, L., Petros, A., Fesik, S.W., Yaffe, M.B. et Greenberg, M.E. (2000), 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation., *Mol. Cell* 6 : 41-51.
- Del Peso, L., Gonzalez-Garcia, M., Page, C., Herrera, R. et Nuñez, G. (1997), Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt., *Science* 278 : 687-689.
- Dennis, P.B., Fumagalli, S. et Thomas, G. (1999), Target of rapamycin (TOR): balancing the opposing forces of protein synthesis and degradation., *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9 : 49-54.
- Desire, L., Courtois, Y. et Jeanny, J.C. (2000), Endogenous and exogenous fibroblast growth factor 2 support survival of chick retinal neurons by control of neuronal neuronal bcl-x(L) and bcl-2 expression through a fibroblast berowth factor receptor 1- and ERK-dependent pathway., *J. Neurochem.* 75 :151-63.
- Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S. et Reed J.C. (1997), X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases., *Nature* 388 : 300-304.
- Dockrell, D.H., Badley, A.D., Villacian, J.S., Heppelmann, C.J., Algeciras, A., Ziesmer, S., Yagita, H., Lynch, D.H., Roche, P.C. et Leibson, P.J. (1998), The expression of Fas Ligand

by macrophages and its upregulation by human immunodeficiency virus infection., *J. Clin. Invest.* 101 : 2394-2405.

Downward, J. (1998), Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10 : 262-267.

Dudek, H., Datta, S.R., Franke, T.F., Birnbaum, M.J., Yao, R., Cooper, G.M., Segal, R.S., Kaplan, D.R. et Greenberg, M.E. (1997), Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt., *Science* 275 : 661-665.

Dudley, D.T., Pang, L., Decker, S.J., Bridges, A.J. et Saitiel, A.R. (1995), A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92 : 7686-7689.

Eliceiri, B.P. Paul, R., Schwartzberg, P.L., Hood, J.D., Zeng, J. et Cheresch, D.(1999), Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. *Mol. Cell* 4 : 915-924.

Ellis, R.E., Yuan, J.Y. et Horvitz, H.R. (1991), Mechanisms and functions of cell death., *Annu. Rev. Cell Biol.* 7 : 663-698.

Evan, G. et Littlewood, T. (1998), A matter of life and cell death. *Science* 281 : 1317-1322.

Eves, E.M., Xiong, W., Bellacosa, A., Kennedy, S.G., Tschlis, P.N., Rosner, M.R. et Hay, N. (1998), Akt, a target of phosphatidylinositol 3-kinase, inhibits apoptosis in a differentiating neuronal cell line., *Mol. Cell. Biol.* 18 : 2143-2152.

Faleiro, L., Kobayashi, R., Fearnhead H. et Lazebnick, Y. (1997), Multiple species of CPP32 and Mch2 are the major active caspases present in apoptotic cells., *EMBO J.* 16 : 2271-2281.

Fang, X., Yu, S., Eder, A., Bast Jr, R.C., Boyd, D. et Mills, G.B. (1999), Regulation of BAD phosphorylation at serine 112 by the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway, *Onogene* 18 : 6635-6640.

Faris, M., Kokot, N., Latinis, K., Kasibhatla, S., Green, D.R., Koretzky, G.A. et Nel, A. (1998), The c-jun N-terminal kinase cascade plays a role in stress-induced apoptosis in Jurkat cells by up-regulating Fas ligand expression., *J. Immunol.* 160 : 134-144.

Fogh, J., Fogh, J.M. et Orfeo, T. (1977), One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice., *J. Natl. Cancer Inst* 59 : 221-226.

Frisch, S.M. et Francis, H. (1994), Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis., *J. Cell Biol.* 124 : 619-626.

Frisch, S.M. et Ruoslahti, E. (1997), Integrins and anoikis, *Curr. Opin. Cell Biol.* 9 : 701-706.

Frisch, S.M., Vuory, K., Ruoslati, E., Chan-Gui, P.Y. (1996), Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase., *J. Cell Biol.* 134 : 793-799.

Fugita, N., Nagahashi, A., Nagashima, K., Rokudai, S. et Tsuru, T. (1998), Acceleration of apoptotic cell death after the cleavage of Bcl-X_L protein by caspase-3-like proteases., *Oncogene* 17 : 1295-1304.

Gajewski, T.F. et Thompson, C.B. (1996), Apoptosis meets signal transduction : Elimination of a BAD influence., *Cell* 87 : 589-592.

Gardner, A.M. et Johnson, G.L. (1996), Fibroblast growth factor-2 suppression of tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis requires Ras and the activation of mitogen-activated protein kinase., *J. Biol. Chem.* 271 : 14560-14566.

Gauthier, R., Harnois, C., Drolet, J.-F., Reed, J.C., Vézina, A. et Vachon, P.H. (2001), Human intestinal epithelial cell survival : differentiation state-specific control mechanisms., *Am. J. Cell Physiol.*, 280 : C000-C000 (sous presse).

Gerber, H.-P., McMurtrey, A., Kowalski, J., Yan, M., Keyt, B.A., Dixit, V. et Ferrara, N. (1998), Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/akt signal transduction pathway., *J. Biol. Chem.* 273 : 30336-30343.

Gervai, F.G., Thornberry, N.A., Ruffolo, S.C., Nicholson, D.W. et Roys, S. (1998), Caspases cleave focal adhesion kinase during apoptosis to generate a FRNK-like polypeptide., *J. Biol. Chem.* 273 : 17102-17108.

Giancotti, F.G. et Ruoslahti, E. (1999), Integrin signaling, *Science* 285 : 1028-1032.

Gingras, A.C., Kennedy, S.G., O'Leary, M.A., Sonenberg, N. et Hay, N. (1998), 4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and activated by the Akt (PKB) signaling pathway., *Genes Dev.* 12 : 502-513.

Gordon, J.I. et Hermiston, M.L. (1994), Differentiation and self-renewal in the mouse gastrointestinal epithelium., *Curr. Opin. Cell Biol.* 6 : 795-803.

Grandgirard, D., Studer, E., Monney, L., Belser, T., Fellay, I., Borner, C. et Michel, M.R. (1998), Alphaviruses induce apoptosis in Bcl-2-overexpressing cells: evidence for a caspase-mediated, proteolytic inactivation of Bcl-2., *EMBO J.* 17 : 1268-1278.

Hale, A., Smith, C., Sutherland, L., Stoneman, V., Langthorne, V., Culhane, A. et Williams, G. (1996), Apoptosis : molecular regulation of cell death., *Eur. J. Biochem.* 236 : 1-26.

Hall, P.A., Coates, P.J., Ansari, B. et Hopwood, D. (1994), Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract : The importance of apoptosis., *J. Cell Sci.* 107 : 3569-3577.

- Hauri, H.-P., Sterchi, E.E., Bienz, D., Fransen, J.A.M. et Marxer, A. (1985), Expression and intracellular transport of microvillus membrane hydrolases in human intestinal epithelial cells., *J. Cell Biol.* 101 : 838-851.
- Hausler, P., Papoff, G., Eramo, A., Reif, K., Cantrell, D.A. et Hausler, G. (1998), Protection of CD95-mediated apoptosis by activation of phosphatidylinositide 3-kinase and protein kinase B., *Eur. J. Immunol.* 28 : 57-69.
- Hirose, Y., Yoshimi, N., Suzuki, M., Kawabata, K., Tanaka, T. et Mori, H. (1997), Expression of Bcl-2, Bax and Bcl-X_L proteins in azoxymethane-induced rat colonic adenocarcinomas., *Mol. Carcinog* 19 : 25-30.
- Hirst, R., Horvitz, A., Buck, C. et Rohrschneider, L. (1986), Phosphorylation of the fibronectin receptor complex in cells transformed by oncogenes that encode tyrosine kinase., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 : 6470-6474.
- Hockenbery, D.M., Zutter, M., Hickey, W., Nahm, M. et Korsmeyer, S.J. (1991), Bcl-2 protein is topographically restricted in tissues characterised by apoptotic cell death., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 : 6961-6965.
- Holmstrom, T.H., Chow, S.C., Elo, I., Coffey, E.T., Orrenius, S., Sistonen, L. et Eriksson, J.E. (1998), Suppression of Fas/APO-1-mediated apoptosis by mitogen-activated kinase signaling., *J. Immunol.* 160 : 2626-2636.
- Howell, S., Brewis, I.A., Hooper, N.M., Kenny, A.J. et Turner, A.J. (1993), Mosaic expression of membrane peptidases by confluent cultures of Caco-2 cells., *FEBS Lett.* 317 : 109-112.
- Hu, Y., Benedict, M.A., Wu, D., Inohara, N. et Nuñez, G. (1998), Bcl-X_L inhibits APAF-1-dependent caspase-9 activation., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 : 4389-4391.
- Huang, D.C., Adams, J.M. et Cory, S. (1998), The conserved N-terminal BH4 domain of Bcl-2 homologues is essential for inhibition of apoptosis and interaction with CED-4., *EMBO J.* 17 : 1029-1039.
- Huang, H.M., Huang, C.J. et Yen, J.J. (2000), Mcl-1 is a common target of stem cell factor and interleukin-5 for apoptosis prevention activity via MEK/MAPK and PI-3K/Akt pathways., *Blood* 96:1764-71.
- Hungerford, J.E., Compton, M.T., Matter, M.L., Hoffstrom, B.G. et Otey, C.A. (1996), Inhibition of pp125FAK in cultured fibroblasts results in apoptosis., *J. Cell. Biol.* 135 : 1383-1390.

- Hynes, N.E. et Stern, D.F. (1994), The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer., *Biochim. Biophys. Acta.* 1198 : 165-184.
- Ilic, D., Almeida, E.A., Schlaepfer, D.D., Dazin, P., Aizawa, S. et Damsky, C.H. (1998), Extracellular matrix survival signals transduced by focal adhesion kinase suppress p53-mediated apoptosis., *J Cell. Biol.* 143 : 547-560.
- Inohara, N., Ekhterae, D., Garcia, I., Carrio, R., Merino, J., Merry, A. et Chen S, Núñez (1998), Mtd, a novel Bcl-2 family member, activates apoptosis in the absence of heterodimerization with Bcl-2 and Bcl-X_L., *J. Biol. Chem.* 273 : 8705-8710.
- Ip, Y.T. et Davis, R.J. (1998), Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)-from inflammation to development., *Curr. Opin. Cell Biol.*, 10 : 205-219.
- Jacobson, M.D., Weil, M., et Raff, M.C. (1997), Programmed cell death in animal development., *Cell* 88 : 347-354.
- Jones, B.A. et Gores, G.J. (1997), Physiology and pathophysiology of apoptosis in epithelial cells of the liver, pancreas, and intestine., *Am. J. Physiol.* 273 : G1174-G1188.
- Jumarie, C. et Malo, C. (1991), Caco-2 cells cultured in serum-free medium as a model for the study of enterocytic differentiation in vitro., *J. Cell. Physiol.* 149 : 24-33.
- Jurgensmeier, J.M., Xie. Z., Deveraux, Q., Ellerby, L., Bredesen, D. et Reed, J.C. (1998), Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 : 4997-5002.
- Kandel, E.S. et Hay, N. (1999), The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB., *Exp Cell Res* 253:210-229.
- Karni, R., Jove, R. et Levitzki, A. (1999), Inhibition of pp60c-Src reduces Bcl-XL expression and reverses the transformed phenotype of cells overexpressing EGF and HER-2 receptors., *Oncogene* 18 : 4654-4662.
- Kauffmann-Zeh, A., Rodriguez-Vicana, P., Ulrich, E., Gilbert, C., Coffey, P., Downward, J. et Evan, G. (1997), Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signaling through PI(3)K and PKB., *Nature* 385 : 544-548.
- Kennedy, S.G., Wagner, A.J., Conzen, S.D., Jordan, J., Bellacosa, A., Tsichlis, P.N. et Hay, N. (1997), The PI3-Kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal., *Gene & Dev.* 11 : 701-713.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H. et Currie, A.R. (1972), Apoptosis : a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics., *Br. J. Cancer* 26 : 239-257.

- Khwaja, A., Rodriguez-Vicana, P., Wennstrom, S., Warne, P.H. et Downward, J. (1997), Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway., *EMBO J.* 16 : 2783-2793.
- Kinoshita, T., Shirouzu, M., Kamiya, A., Hashimoto, K., Yokoyama, S. et Miyajima, A. (1997), Raf/MAPK and rapamycin-sensitive pathways mediate the anti-apoptotic functions of p21Ras in Il-3-dependent hematopoietic., *Oncogene* 15 : 619-627.
- Kops, G.J., de Ruiter, N.D., De Vrie-Smits, A.M., Powell, D.R., Bos, J.L. et Burgering, B.M (1999), Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B., *Nature* 398 : 630-634.
- Krajewska, M., Moss, S.F., Krajewski, S., Song, K., Holt, P.R. et Reed, J.C. (1996), Elevated expression of Bcl-X and reduced Bax in primary colorectal adenocarcinomas., *Cancer Res.* 56 : 2422-2427.
- Krajewski, S., Bodrug, S., Gascoyne, R., Berean, K., Krajewska, M. et Reed, J.C. (1994a), Immunohistochemical analysis of Mcl-1 and Bcl-2 proteins in normal and neoplastic lymph nodes., *Am. J. Pathol.* 145 : 515-525.
- Krajewski, S., Bodrug, S., Krajewska, M., Shabaik, A., Gascoyne, R., Berean, K. et Reed, J.C. (1995), Immunohistochemical analysis of Mcl-1 protein in human tissues : differential regulation of Mcl-1 and Bcl-2 protein production suggests a unique role for Mcl-1 in control of programmed cell death *in vivo.*, *Am. J. Pathol.* 146 : 1309-1319.
- Krajewski, S., Krajewska, M. et Reed, J.C. (1996) Immunohistochemical analysis of *in vivo* patterns of Bak expression, a proapoptotic member of the Bcl-2 protein family., *Cancer Res.* 56 : 2849-2855.
- Krajewski, S., Krajewska, M., Shabaik, A., Miyashita, T., Wang, H.G. et Reed, J.C. (1994b), Immunohistochemical determination of *in vivo* distribution of Bax, a dominant inhibitor of Bcl-2., *Am. J. Pathol.* 145 : 1323-1336.
- Krajewski, S., Krajewska, M., Shabaik, A., Wang, H.G., Irie, S., Fong, L. et Reed, J.C. (1994c), Immunohistochemical analysis of *in vivo* patterns of Bcl-X expression., *Cancer Res.* 54 : 5501-5507.
- Krajewski, S., Tanaka, S., Takayama, S., Schibler, M.J., Fenton, W. et Reed, J.C. (1993), Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein : residence in nuclear envelope, endoplasmique reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res.* 53 : 4701-4714.
- Kroemer, G., Petit, P., Zamzami, N., Vayssiere, J.L. et Mignotte, B. (1995), The biochemistry of programmed cell death., *FASEB J.* 9 : 1277-87.

- Kulik, G. et Weber, M.J. (1998), Akt-dependent and independent survival signaling pathways utilized by insulin-like growth factor I., *Mol. Cell. Biol.* 18 : 6711-6718.
- Kulik, G., Klippel, A. et Weber, M.J. (1997), Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt., *Mol. Cell. Biol.* 17 : 1595-1606.
- Kyle, E., Neckers, L., Takimoto, C., Curt, G. et Bergan, R. (1997), Genistein-induced apoptosis of prostate cancer cells is preceded by a specific decrease in focal adhesion kinase activity., *Am. Soc. Phar. Exp. Therapeutics* 51 : 193-200.
- Le Gall, M., Chambard, J.-C., Breitmayer, J.-P., Grall, D., Pouysségur, J. et Van Obberghen-Schilling, E. (2000), The p42/p44 MAP kinase pathway prevent apoptosis induced by anchorage and serum removal., *Mol. Biol. Cell* 11 : 1103-1112.
- Le-Niculescu, H., Bonfoco, E., Kasuya, Y., Claret, F.X., Green, D.R. et Karin, M. (1999). Withdrawal of survival factors results in activation of the JNK pathway in neuronal cells leading to Fas Ligand induction and cell death., *Mol. Cell. Biol.* 19 : 751-763.
- Leblond, C.P. (1981), The life history of cells in renewing systems., *Am. J. Anat.* 160 : 114-159.
- Lebrun, D.P., Wamke, R.A. et Cleary, M.L. (1993), Expression of bcl-2 in fetal tissues suggests a role in morphogenesis., *Am. J. Pathol.* 142 : 743-753.
- Lee, J., Wang, Z.Y., Luoh, S.M., Wood, W.I. et Scaden, D.T. (1994), Cloning of FRK, a novel human intracellular SRC-like tyrosine kinase encoding gene., *Gene.* 138 : 247-251.
- Le Gall, M., Chambard, J.-C., Breitmayer, J.-P., Grall, D., Possyégur, J. et Van Obberghen-Schilling, E. (2000), The p42/p44 MAP kinase pathway prevents apoptosis induced by anchorage and serum removal, *Mol. Biol. Cell* 11 : 1103-1112.
- Leu, C.M, Chang, C. et Hu, C. (2000), Epidermal growth factor (EGF) supresses staurosporine-induced apoptosis by inducing *mcl-1* via the mitogen-activated protein kinase pathway., *Oncogene* 19 : 1665-1675.
- Levkau, G., Herren, B., Koyama, H., Ross, R. et Raines, E.W. (1998), Caspase-mediated cleavage of focal adhesion kinase pp125FAK and disassembly of focal adhesions in human endothelial cell apoptosis., *J. Exp. Med.* 187 : 579-586.
- Lévy, P., Robin, H., Kornprobst, M., Capeau, J. et Cherqui, G. (1998), Enterocytic differentiation of the human Caco-2 cell line correlate with alteration in integrin signaling., *J. Cell. Physiol.* 177:618-627.

- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S. and Wang, X. (1997), Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/capase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade., *Cell* 79 : 479-489.
- Li-Weber, M., Laur, O., Hekele, A., Coy, J., Walczak, H. et Krammer P.H. (1998). A regulatory element in the CD95 (APO-1/Fas) ligand promoter is essential for responsiveness to TCR-mediated activation., *Eur. J. Immunol.* 28 : 2373-2383.
- Lipfert, L., Haimovitch, B., Schaller, M.D., Cobb, B.S., Parson, J.T. et Brugge J.S. (1992), Integrin-dependent phosphorylation and activation of the protein tyrosine kinase pp125FAK in platelets., *J. Cell Biol.* 119 : 905-912.
- Lithgow, T., van Driel, R., Bertram, J.F. et Strasser, A. (1994), The protein product of the oncogene bcl-2 is a component of the nuclear envelope, the endoplasmic reticulum, and the outer mitochondrial membrane. *Cell. Growth Differ.* 5 : 411-417.
- Lipsich, L.A., Lewis, A.J. et Brugge, J.S. (1983), Isolation of monoclonal antibodies that recognize the transforming proteins of avian sarcoma viruses., *J. Virol.* 48 : 352-60.
- Lizcano, J.M., Morrice, N. et Cohen, P. (2000), Regulation of BAD by cAMP-dependent protein kinase is mediated via phosphorylation of a novel site, Ser155., *Biochem. J.* 349 : 547-557.
- Liu, Y.Z., Boxer, L.M. et Latchman, D.S. (1999), Activation of the Bcl-2 promoter by nerve growth factor is mediated by the p42/p44 MAPK cascade., *Nucleic Acids Res.* 27 :2086-2090.
- Luttrell, D.K., Luttrell, L.M. et Parson, S.J. (1988), Augmented mitogenic responsiveness to epidermal growth factor in murine fibroblasts that overexpress p60^{c-Src}., *Mol. Cell Biol.* 8 : 497-501.
- Matsumoto, H., Erickson, R.H., Gum, J.R., Yoshioka, M., Gum, E. et Kim, S. (1990), Biosynthesis of alkaline phosphatase during differentiation of the human colon cancer cell line Caco-2., *Gastroenterology* 98 : 119-1207.
- May, W.S., Tyler, P.G., Ito, T., Armstrong, D.K., Quatsha, K.A. et Davidson, N.E. (1994), Interleukin-3 and bryostatin-1 mediate hyperphosphorylation of BCL-2 alpha in association with suppression of apoptosis., 269 : 26865-26870.
- Metcalf, A.D., Gilmore, A., Klinowska, T., Oliver, J., Valentijn, A., Brown, R., Ross, A., MacGregor, G., Hickman, J.A. et Sreuli, C.H. (1999), Developmental regulation of Bcl-2 family protein expression in the involuting mammary gland., *J. Cell Sci.* 112 : 1771-1783.
- Ménard, D. et Beaulieu, J.-F., (1994), Human intestinal brush border membrane hydrolase. In: *Membrane Physiopathology*. G. Bakaly, ed. Kluwer Academic Press, Norwell, MA, pp. 319-341.

Meredith, J.E., Babak, Fazeli, B. et Schwartz, M.A. (1993), The extracellular matrix as a cell survival factor., *Mol. Biol. Cell* 4 : 953-961.

Merritt, A.J., Potten, C.S, Watson, A.J.M., Yoh, D.Y., Nakayama, K. et Hickman, J.A. (1995), Differential expression of Bcl-2 in intestinal epithelia. Correlation with attenuation of apoptosis in colonics crypts and the incidence of colonic neoplasia., *J. Cell Sci.* 108 : 2261-2271.

Mesner, P.W., Winters, T.R. et Green, S.H. (1992), Nerve growth factor withdrawal-induced cell death in neuronal PC12 cells resembles that in sympathetic neurons., *J Cell Biol* 119 : 1669-80.

Miyamoto, S., Teramoto, H., Coso, O.A., Gutkind, J.S., Burbelo, P.D., Akiyama, S.K. et Yamada, K.M. (1995), Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules., *J. Cell Biol.* 131 : 791-805.

Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H.G., Lin, H.K., Liebermann, D.A., Hoffman, B. et Reed, J.C. (1994), Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo., *Oncogene* 9 : 1799-1805.

Moss, S.F., Holt, P.R. (1996), Apoptosis in the intestine., *Gastroenterology* 111 : 567-568.

Moss, S.F., Agarwal, B., Arber, N., Guan R.J., Krajewska, M., Krejewski, S., Reed, J.C et Holt. P.R. (1996), Increased intestinal Bak expression results in apoptosis.. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 223 : 199-203.

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

Muslin, A.J., Tanner, J.W., Allen, P.M. et Shaw, A.S. (1996), Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine., *Cell* 84 : 889-897.

Narita, M., Shimizu, S., Ito, T., Chittenden, T., Lutz, R.J., Matsuda, H. et Tsujimoto, Y. (1998), Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 : 14681-14686.

Oberg-Welsh, C. et Welsh, M. (1995), Cloning of BSK, a murine FRK homologue with a specific pattern of tissue distribution. *Gene.* 152 : 239-242.

Oktay, M., Wary, K.K., Dans, M., Birge, R.B et Giancotti, F.P. (1999), Integrin-mediated activation of focal adhesion kinase is required for signaling to Jun NH2-terminal kinase and progression through the G1 phase of the cell cycle., *J. Cell. Biol.* 145 :1461-1469.

- Oltvai, Z.N., Milliman, C.L et Korsmeyer, S.J. (1993), Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death., *Cell* 74 : 609-619.
- Osada, M., Tolkacheva, T., Li, W., Chan, T.O., Tsihchlis, P.N., Saez, R., Kimmelman, A.C. et Chan, A.M.-L. (1999), Differential roles of Akt, Rac, and Ral in R-Ras-mediated cellular transformation, adhesion, and survival., *Mol. Cell. Biol.* 19 : 6333-6344.
- Pageot, L.P., Perreault, N., Basora, N., Francoeur, C., Magny, P. et Beaulieu, J.F. (2000), Human cell models to study small intestinal functions: recapitulation of the crypt-villus axis., *Microsc. Res. Tech.* 49:394-406.
- Pan, G., O'Rourke, K. et Dixit, V.M. (1998), Caspase-9, Bcl-XL, and Apaf-1 form a ternary complex., *J. Biol. Chem.* 273 : 5841-5845.
- Park, D.J., Min, H.K. et Rhee, S.G. (1991), IgE-induced tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 1 in rat basophilic leukemia cells., *J. Biol Chem* 266 : 24237-24240.
- Parsons J.T. et Parsons, S.J. (1997), Src family protein tyrosine kinases : cooperating with growth factor and adhesion signaling pathways., *Curr. Opin. Cell Biol.* 9 : 176-195.
- Perreault, N. et Beaulieu, J.-F. (1996), Use of the dissociating enzyme thermolysin to generate viable human normal intestinal epithelial cells cultures., *Exp. Cell Res.* 224 : 354-364.
- Perreault, N. et Beaulieu, J.-F. (1998), Primary culture of fully differentiated and pure human intestinal epithelial cells., *Exp. Cell Res* 245 : 34-42.
- Peterson, M.D. et Mooseker, M.S. (1992), Characterization of the enterocyte-like brush border cytoskeleton of the C2_{BBc} clones of the human intestinal cell line Caco-2., *J. Cell Sci.* 102 : 581-600.
- Pinto, M., Robine-Léon, S., Appay, M.D., Kedinger, M., Triadou, N. and Zweibaum, A. (1983), Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture., *Biol. Cell* 47 : 323-330.
- Poommipants, P.B., Chen, B. et Oltvait, Z.N. (1999), Interleukin-3 induces the phosphorylation of a distinct fraction of Bcl-2, *J. Biol. Chem.* 274 : 1033-1039.
- Potten, C.S. (1992), The significance of spontaneous and induced apoptosis in the gastrointestinal tract of mice., *Cancer & Metast. Rev* 11 : 179-195.
- Potten, C.S. (1997), Epithelial cell growth and differentiation II. Intestinal apoptosis., *Am. J. Physiol.* 273 : G253-G257.

Pugazhenthí, S., Nesterova, A., Sable, C., Heidenreich, K.A., Boxer, L.M., Heasley, L.E. et Reusch, J.E. (2000), Akt/protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-response element-binding protein., *J. Biol. Chem.* 275:10761-10766.

Pritchard, D.M., Potten, C.S., Korsmeyer, S.J., Robert, S. et Hickman, J.A. (1999), Damage-induced apoptosis intestinal epithelia from Bcl-2-null and bax-null mice : Investigations of the mechanistic determinants of epithelial apoptosis in vivo., *Oncogene* 18 : 7287-7293.

Quaroni, A. et Beaulieu, J.-F. (1977), Cell dynamics and differentiation of conditionally immortalized human intestinal epithelial cells., *Gastroenterology*, 113: 1198-1213.

Reed, J.C. (1994), Bcl-2 and the regulation of programmed cell death., *J. Cell Biol.* 124 : 1-5.

Reed, J.C., Miyaashita, T., Takayama, S., Wang, H.-G, Sato, T., Krajewski, S., Aimé-Sempé, C., Bodrug, S., Kitada, S. et Hanada, M. (1996), Bcl-2 family proteins : Regulator of cell death involved in the pathogenesis of cancer and resistance to therapy., *J. Cell. Biochem.* 60 : 23-32.

Resnicoff, M., Abraham, D., Yutanawiboonchai, W., Rotman, H.L., Kajstura, J., Rubin, R., Zoltick, P. et Baserga R. (1995), The insulin-like growth factor I receptor protects tumor cells from apoptosis in vivo., *Cancer Res.* 55 : 2463-2469.

Rhoades, K.L., Golub, S.H. et Economou, J.S. (1992), The regulation of the human tumor necrosis factor alpha promoter region in macrophage, T cell, and B cell lines., *J. Biol. Chem.* 267 : 22102-22107.

Rodriguez-Fernandez, J.L. et Rozengurt, E. (1996), Bombesin, bradykinin, vasopressin and phorbol ester rapidly and transiently activate Src family tyrosine kinases in Swiss 3T3 cells., *J. Biol. Chem.* 271 : 10232-10239.

Rokudai, S., Fujita, N., Hashimoto, Y. et Tsuruo, T. (2000), Cleavage and inactivation of antiapoptotic Akt/PKB by caspases during apoptosis., *J. Cell. Physiol.* 182 : 290-296.

Rohn, J.L., Hueber, A.-O., McCarthy, N.J., Lyon, D., Navarro, P., Burgering, B.M.T. et Evan, G.I. (1998), The opposing roles of the Akt and c-Myc signalling pathways in survival from CD95-mediated apoptosis., *Oncogene* 17 : 2811-2828.

Rommel, C., Clarke, B.A., Zimmermann, S., Nuñez, L., Rossman, R., Reid, K., Moelling, K., Yancopoulos, G.D. et Glass, D.J. (1999), Differentiation stage-specific inhibition of the Raf-MEK-ERK pathway by Akt., *Science* 286 : 1738-1741.

Rosen, K., Rak, J., Jin, J., Kerbel, R.S., Newman, M.J. et Filmus, J. (1998), Downregulation of the pro-apoptotic protein Bak is required for the ras-induced transformation of intestinal epithelial cells., *Curr. Biol.* 8 : 1331-1334.

- Rosen, K., Rak, J., Leung, T., Dean, N.M., Kerbel, R.S. et Filmus, J. (2000), Activated Ras prevent downregulation of Bcl-X_L triggered by detachment from the extracellular matrix : A mechanism of Ras-induced resistance to anoikis in intestinal epithelial cells., *J. Cell Biol.* 149 : 447-455.
- Rousset, M., Trugnan, G., Brun, J.-L. et Zweibaum, A. (1986), Inhibition of the post-translational processing of microvillar hydrolases is associated with a specific decreased expression of sucrase-isomaltase and in an increased turn-over of glucose in Caco-2 cells treated with monensin., *FEBS Lett.* 208 : 34-38.
- Roy, N., Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S. et Reed, J.C. (1997), The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases., *EMBO J.* 18 : 5242-5251.
- Ruoslahti, E. et Reed, J.C. (1994), Anchorage dependence, integrins, and apoptosis., *Cell* 77 : 477-478.
- Sabatini, D.M., Erdjument-Bromage, H., Liu, M., Tempst, P., Snyder, S.H. (1994), RAFT1 : A mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs, *78* : 35-43.
- Sabers, C.J., Martin, M.M., Brunn, G.J., Williams, J.M., Dumont, F.J., Wiederrecht, G. et Abraham, R.T. (1995), Isolation of a protein target of the FKBP-rapamycin complex in mammalian cells, *J. Biol. Chem.* 270 : 815-822.
- Saini, K.S. et Walker, N.I. (1998), Biochemical and molecular mechanisms regulating apoptosis., *Mol. Cell Biochem.* 178 : 9-25.
- Sattler, M., Liang, H., Nettlesheim, D., Meadows, R.P., Harlan, J.E., Eberstadt, M., Yoon, H.S., Shuker, S.B., Chang, B.S., Minn, A.J., Thompson C.B. et Fesik, S.W. (1997), Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis., *Science* 275 : 983-986.
- Scheid, M.P. et Duronio, V. (1998), Dissociation of cytokine-induced phosphorylation of Bad and activation of PKB/Akt : Involvement of MEK upstream of Bad phosphorylation., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 : 7439-7444.
- Scheid, M.P., Schubert, K.M. et Duronio, V. (1999), Regulation of Bad phosphorylation and association with Bcl-X_L by the MAPK/Erk kinase., *J. Biol. Chem.* 274 : 31108-31113.
- Schlaepfer, D.D., Broome, M.A. et Hunter, T. (1997), Fibronectin-stimulated signaling from a focal adhesion kinase-c-Src complex: involvement of the Grb2, p130cas, and Nck adaptor proteins., *Mol. Cell. Biol.* 17 : 1702-1713.
- Schlaepfer, D.D., Hauck, C.R. et Sieg, D.J. (1999), Signaling through focal adhesion kinase., *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 71 : 435-478.

- Schlaepfer, D.D., Jones, K.C. et Hunter, T. (1998), Multiple Grb2-mediated integrin-stimulated signaling pathways to ERK2/mitogen-activated protein kinase: summation of both c-Src- and focal adhesion kinase-initiated tyrosine phosphorylation events., *Mol. Cell Biol.* 18 : 2571-2585.
- Schlessinger, J. (2000), New roles for Src kinases in control of cell survival and angiogenesis., *Cell* 100 : 293-296.
- Scott, P.H., Brunn, G.J., Kohn, A.D., Roth, R.R. et Lawrence, J.C. Jr (1998), Insulin-stimulated phosphorylation and activation of the mammalian target of rapamycin mediated by a protein kinase B signaling pathway., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 : 7772-7777.
- Segal, R.A. et Greenberg, M.E. (1996), Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors., *Annu. Rev. Neurosci.* 19 : 463-489.
- Sekulic, A., Hudson, C.C., Homme, J.L., Yin, P., Otterness, D.M., Karnitz, L.M et Abraham, R.T. (2000), A direct linkage between the phosphoinositide 3-kinase-AKT signaling pathway and the mammalian target of rapamycin in mitogen-stimulated and transformed cells., *Cancer Res.* 60 : 3504-3513.
- Song, Q., Kuang, Y., Dixit, V. et Vincenz, C. (1999), Boo, a novel negative regulator of cell death, interacts with Apaf-1., *EMBO J.* 18 : 167-178.
- Songyang, Z., Baltimore, D., Cantley, L.C., Kaplan, D.R. et Franke, T.F. (1997), Interleukin 3-dependent survival by the Akt protein kinase., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 : 11345-11350.
- Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T. et Alnemri, E.S. (1998), Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization., *Mol. Cell* 1 : 949-957.
- Stennicke, H.R., Jurgensmeier, J.M., Shin, H., Deveraux, Q., Wolf, B.B., Yang, X., Zhou, Q., Ellerby, H.M., Ellerby, L.M., Bredesen, D., Green, D.R. et Reed, J.C. (1998), Procaspase-3 is a major physiologic target of caspase-8., *J. Biol. Chem.* 272 : 27084-27090.
- Sun, X.J., Pons, S., Asano, T., Myers, M.G. Jr, Glasheen, E. et White, M.F. (1996), The Fyn tyrosine kinase binds Irs-1 and forms a distinct signaling complex during insulin stimulation., *J. Biol. Chem.* 271 : 10583-10587.
- Sung, S.J., Walters, J.A., Hudson, J. et Gimble, J.M. (1991), Tumor necrosis factor-alpha mRNA accumulation in human myelomonocytic cell lines. Role of transcriptional regulation by DNA sequence motifs and mRNA stabilization., *J. Immunol.* 147 : 2047-2054.
- Takayama, S., Sato, T., Krajewski, S., Kochel, K., Irie, S., Millan, J.A., et Reed, J.C. (1995), Cloning and functional analysis of BAG-1 : a novel Bcl-2-binding protein with anti-cell death activity., *Cell* 80 : 279-284.

- Tan, Y., Demeter, M.R., Ruan H. et Comb M.J. (2000), BAD ser-155 phosphorylation regulates BAD/Bcl-XL interaction and cell survival., *J. Biol. Chem.* 275 : 25865-25869.
- Tan, Y., Ruan, H., Demeter, M.R. et Comb, M.J. (1999), p90(RSK) blocks bad-mediated cell death via a protein kinase C-dependent pathway., *J. Biol. Chem.* 274 : 34859-34867.
- Thornberry, N.A. et Lazebnik, Y. (1997), Caspases: enemies within., *Science* 281: 1312-1316.
- Toker, A. (2000), Protein kinase as mediator of phosphoinositide 3-kinase signaling., *Mol. Pharmacol.* 57 : 652-658.
- Townsend, K.J., Trusty, J.L., Traupman, M.A., Eastman, A. et Craig, R.W. (1998), Expression of the antiapoptotic MCL1 gene product is regulated by a mitogen activated protein kinase-mediated pathway triggered through microtubule disruption and protein C., *Oncogene* 17 : 1223-1234.
- Townsend, K.J., Zhou, P., Qian, L., Bieszczad, C.K., Lowrey, C.H., Yen, A. et Craig, R.W. (1999), Regulation of *MCL1* through a serum response factor/elk-1-mediated mechanism links expression of a viability-promoting member of the *BCL2* family to the induction of hematopoietic cell differentiation., *J. Biol. Chem.* 274 : 1801-1813.
- Vachon, P.H., Durand, J. et Beaulieu, J.-F. (1993), Basement membrane formation and redistribution of β_1 integrins in a human intestinal co-culture system. *Anat. Rec.* 236 : 567-576.
- Vachon, P.H. et Beaulieu, J.-F. (1992), Transient mosaic patterns of morphological and functional differentiation in the Caco-2 cell line., *Gastroenterology* 103 : 414-423.
- Vachon, P.H. et Beaulieu, J.-F. (1995), Extracellular heterotrimeric laminin promotes differentiation in human enterocytes., *Am. J. Physiol.* 268 : G857-G867.
- Vachon, P.H., Cardin, É., Harnois, C., Reed, J.C. et Vézina, A. (2000), Early establishment of epithelial apoptosis in the developing human small intestine., *Int. J. Dev. Biol.* 44 : 891-898.
- Vachon, P.H., Perreault, N., Magny, P. et Beaulieu, J.-F. (1996), Uncoordinated, transient mosaic patterns of intestinal hydrolase expression in differentiating human enterocytes., *J. Cell Physiol.* 166 :198-207.
- Vander Heiden, M.G., Chandel, N.S., Williamson, E.K., Schumacker, P.T. et Thompson, C.B (1997), Bcl-X_L regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria., *Cell* 91 : 627-637.
- Vanhaesebroeck, B. et Alessi, D.R. (2000), The PI 3-K-PDK1 connection : more than just a road to PKB, *Biochem. J.* 346 : 561-576.

- Vlahos, C.J., Matter W.F., Hui, K.Y. et Brown, R.F. (1994), A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002)., *J. Biol Chem* 269 : 5241-5248.
- Vaux, D.L. et Korsmeyer, S.J. (1999), Cell death in developpement, *Cell*, 96 : 245-254.
- Vaux, D.L. et Strasser, A. (1996), The molecular biology of apoptosis., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 : 2239-2244.
- Wallen, N., Kita, H., Weiler, D. et Gleich, G.J. (1991), Glucocorticoids inhibits cytokine-mediated eosinophil survival., *J. Immunol.* 147 : 3490-3495.
- Wang, C.Y., Guttridge, D.C., Mayo, M.W. et Baldwin, A.S. Jr (1998), NF-kappaB induces expression of the Bcl-2 homologue A1/Bfl-1 to preferentially suppress chemotherapy-induced apoptosis., *Mol. Cell. Biol.* 19:5923-5929.
- Wang, C.Y., Mayo, M.W., Korneluk, R.G., Goeddel, D.V. et Baldwin, A.S. Jr (1999), NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation., *Science* 1998 281:1680-1683.
- Wang, H.-G., Rapp, U.R. et Reed, J.C. (1999), Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria., *Cell* 87 : 629-638.
- Wang, H.G. et Reed, J.C. (1998), Mechanisms of Bcl-2 protein function., *Histol. Histopathol.* 13 : 521-530.
- Wang, H.G., Takayama, S., Rapp, U.R. et Reed, J.C. (1996), Bcl-2 interacting protein, Bag-1, binds to and activates the kinase Raf-1., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 : 7063-7068.
- Wang, J.-M., Chao, J.-R., Chen, W., Kuo, M.-L., Yen, J.J.-Y. et Yang-Yen, H.-F. (1999), The antiopoptotic gene *mcl-1* is up regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway through a transcription factor complex containing CREB., *Mol. Cell. Biol.* 19 : 6195-6206.
- Wary, K.K., Dans, M., Mariotti, A. et Giancotti, F.G. (1999), Biochemical analysis of integrin-mediated Shc signaling, *Methods Mol. Biol.* 129 : 35-49.
- Wary, K.K., Mariotti, A., Zurzolo, C. et Giancotti, F.G. (1998), A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth., *Cell* 94 : 625-634.
- Weiner, J.A. et Chun, J. (1999), Schwann cell survival mediated by the signaling phospholipid lysophosphatidic acid., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96 : 5233-5238.

- Wen, L.P., Fahn, J.A., Troie, S., Guan, J.L., Orth, K. et Rosen, G.D. (1997), Cleavage of focal adhesion kinase by caspases during apoptosis., *J. Biol. Chem.*, 272 : 26056-26061.
- White, E. (1996), Life, death, and the pursuit of apoptosis., *Genes Dev.* 10 : 1-15.
- Whitehead, J.P., Clark, S.F., Ursø, B. et James, D.E. (2000), Signaling through the insulin receptor., *Curr. Opin. Cell Biol.* 12 : 222-228.
- Widmann, C., Gibson, S. et Johnson, G.L. (1998), Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis. A turn-off mechanism for anti-apoptotic signals., *J. Biol. Chem.* 273 : 7141-7147.
- Wilson, J.W. et Potten, C.S. (1996), Immunohistochemical localization of Bax and Bad in normal and Bcl-2 null gastrointestinal tract., *Apoptosis* 1 : 183-190.
- Wong, B.R., Bresser, D., Kim, N., Arron, J.R., Vologodskaja, M., Hanafusa, H. et Choi, Y. (1999), TRANCE, a TNF family member, activates Akt/PKB through a signaling complex involving TRAF6 and c-Src., *Mol. Cell* 4 : 1041-1049.
- Wu, X., Fan, Z., Masui, H., Rosen, N. et Mendelsohn J. (1995), Apoptosis induced by an anti-epidermal growth factor in a human colorectal carcinoma cell line and its delay by insulin., *J. Clin. Invest.* 95 : 1897-1905.
- Wymann, M.P. et Pirola, L. (1998), Structure and function of phosphoinositide 3-kinases, *Biochim. Biophys. Acta* 1436 : 127-150.
- Xia, Z., Dickens, M., Raugeaud, J., Davis, R.J. et Greenberg, M.E. (1995), Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis., *Science* 270 : 1326-1331.
- Xiong, W.-C. et Parsons, J.T. (1997), Induction of apoptosis after expression of PYK2, a tyrosine kinase structurally related to focal adhesion kinase., *J. Cell Biol.* 139 : 529-539.
- Xu, L.H., Owens, L.V., Sturge, G.C., Yang, X., Liu, E.T., Craven, R.J. et Cance, W.G. (1996), Attenuation of the expression of the focal adhesion kinase induces apoptosis in tumor cells., *Cell. Growth Differ.* 7 : 413-418.
- Xue, D. et Horvitz, H.R. (1997), *Caenorhabditis elegans* CED-9 protein is a bifunctional cell-death inhibitor., *Nature* 390 : 305-308.
- Yaffe, M.B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P.R., Aitken, A., Leffers, H., Gamblin, S.J., Smerdon, S.J. et Cantley, L.C. (1997), The structural basis for 14-3-3 : Phosphopeptide binding specificity., *Cell* 91 : 961-971.
- Yamamoto, K., Ichijo, H. et Korsmeyer, S.J. (1999), Bcl-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G₂/M., *Mol. Cell. Biol.* 19 : 8469-8478.

Yang, T., Kozopas, K.M. et Craig, R.W. (1995), The intracellular distribution and pattern of expression of Mcl-1 overlap with, but are not identical to, those of Bcl-2., *J. Cell Biol.* 128 : 1173-1184.

Yano, S., Tokumitsu, H. et Soderling, T.R. (1998), Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase B pathway., *Nature* 396 : 584-587.

Yao, S. et Cooper, G.M. (1995), Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor., *Science* 267 : 2003-2006.

Yeh., J.H., Hsu, S.C., Han, S.H. et Lai, M.Z. (1998), Mitogen-activated protein kinase kinase antagonized fas-associated death domain protein-mediated apoptosis by induced FLICE-inhibitory protein expression., *J. Exp. Med.* 188 : 1795-1802.

Yoshioka, M., Erickson, R.H., Matsumoto, H., Gum, E. et Kim, Y.S. (1991), Expression of dipeptidyl aminopeptidase IV during enterocytic differentiation of human colon cancer (Caco-2) cells., *Int. J. Cancer* 47 : 916-921.

Zamzami, N., Susin, S.A., Marchetti, P., Hrisch, T., Gomez-Monterrey, I., Castedo, M. et Kroemer, G. (1996), Mitochondrial control of nuclear apoptosis., *J. Exp. Med.* 183 : 1533-1544.

Zha, H., Fisk, H.A., Yaffe, M.P., Mahajan, N., Herman, B. et Reed, J.C. (1996), Structure-function comparisons of the proapoptotic protein Bax in yeast and mammalian cells., *Mol. Cell Biol.* 16 : 6494-6508.

Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, L. et Korsmeyer, S.J. (1996), Serine phosphorylation of death agonist Bad in response to survival factor result in binding to 14-3-3 not Bcl-X_L, *Cell* 87 : 619-628.

Zhang, Z., Vuori, K., Reed, J.C. et Ruoslahti, E. (1995), The $\alpha 5\beta 1$ integrin supports survival of cells on fibronectin and up regulates Bcl-2 expression., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 : 6161-6165.

Zhou, X.M., Liu, Y., Payne, G., Lutz, R.J. et Chittenden, T. (2000), Growth factors inactivate the cell death promoter BAD by phosphorylation of its BH3 domain on ser 155., *J. Biol. Chem.* 275 : 25046-25051.

Zimmermann, S. et Moelling, K. (1999), Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (Protein Kinase B), *Science* 286 : 1741-1744.

Zou H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A. et Wang, X. (1997), Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3., *Cell* 90 : 405-413.

Zou H., Li, Y., Liu, X. et Wang, X. (1999), An APAF-1 cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspases-9, *J. Biol. Chem.* 274 : 11549-11556.

Zweibaum, A. et Chantret, I. (1989), Human colon carcinoma cell lines as in vitro models for the study of intestinal cell differentiation. In : *Adaptation and development of gastrointestinal function.*, M.W. Smith et F.V. Sepulveda, eds. Manchester University Press, Manchester, England, pp. 103-112.