

Université de Sherbrooke

Implication d'isoformes distinctes de la phosphatidylinositol 3-kinase dans la survie entérocytaire humaine selon l'état de différenciation

Par

Dominique Noël

Anatomie et Biologie Cellulaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé

En vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

En biologie cellulaire

Sherbrooke, Québec

janvier 2011

Membres du jury d'évaluation

Pr. Patrick McDonald, Département de médecine

Pr. Fernand-Pierre Gendron, Département d'anatomie et de biologie cellulaire

Pr. Pierre H. Vachon, Département d'anatomie et de biologie cellulaire



**Library and Archives
Canada**

**Published Heritage
Branch**

**395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada**

**Bibliothèque et
Archives Canada**

**Direction du
Patrimoine de l'édition**

**395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada**

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-494-83704-7

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-83704-7

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

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

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

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

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Canada

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES.....	ii
LISTE DES FIGURES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES.....	viii
RÉSUMÉ.....	x

I – INTRODUCTION

1. APOPTOSE.....	1
2. ADHÉSION CELLULAIRE, SURVIE ET ANOÏKOSE.....	4
3. PI3-K : GÉNÉRALITÉS.....	5
3.1 Classes et complexes isoformes.....	8
3.2 Régulation, activation et effecteurs.....	9
3.2.1 Signalisation de survie induite par les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK).....	9
3.2.2 Signalisation de survie induite par les intégrines.....	10
3.2.3 Effecteurs et régulation.....	12
3.3 PI3-K et cancer.....	13
3.4 Rôles distincts des isoformes PI3-K.....	14
4. L'ÉPITHÉLIUM INTESTINAL.....	16
4.1 Modèles <i>in vitro</i> de différenciation entérocytaire humaine.....	16
4.2 Mécanismes de survie : distinctions selon l'état de différenciation.....	18
5. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS.....	22

II – MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. CULTURE CELLULAIRE.....	23
----------------------------	----

2. ANALYSES PAR IMMUNOPRÉCIPITATION ET IMMUNOBUVARDAGE (WESTERN BLOT).....	24
2.1 Préparation des échantillons pour immunobuvardage.....	24
2.2 Préparation des échantillons pour immunoprécipitation.....	25
2.3 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE).....	25
2.4 Immunoprécipitation.....	26
2.5 Immunodétection des protéines (Western blot).....	27
2.6 Anticorps primaires utilisés.....	27
2.7 Anticorps secondaires utilisés.....	28
2.8 Déshybridation des membranes.....	28
3. TRAITEMENT DES CELLULES ET INCUBATION AVEC DIFFÉRENTS INHIBITEURS PHARMACOLOGIQUES.....	30
3.1 Inhibiteurs pharmacologiques utilisés.....	31
4. MISE EN ÉVIDENCE DE L' APOPTOSE PAR ESSAIS TUNEL <i>IN SITU</i>	32
5. ANALYSES PAR RÉACTION EN CHAÎNE PAR POLYMÉRASE APRÈS TRANSCRIPTION INVERSE (RT-PCR).....	33
5.1 Extraction et isolation de l'ARN.....	33
5.2 Réaction de transcription inverse.....	34
5.3 Réaction en chaîne par polymérase.....	34
6. ANALYSES DENSITOMÉTRIQUES ET STATISTIQUES.....	35

III – RÉSULTATS

1. PROFILS D'EXPRESSION DES DIFFÉRENTES ISOFORMES PI3-K (P85 ET P110) SELON L'ÉTAT DE DIFFÉRENCIATION.....	38
1.1 Profils d'expression transcriptionnelle.....	38
1.2 Profils d'expression protéique.....	40
2. COMPLEXES ISOFORMES PRÉDOMINANTS SELON L'ÉTAT DE DIFFÉRENCIATION.....	40

3. COMPLEXES ISOFORMES PRÉDOMINANTS DANS LA SIGNALISATION INTÉGRINES/FAK, SELON L'ÉTAT DE DIFFÉRENCIATION.....	48
4. RÔLES DES ISOFORMES P110 DANS LA SURVIE ENTÉROCYTAIRE HUMAINE.....	54
4.1 Rôles des isoformes p110 dans la survie.....	54
4.2 Rôles des isoformes p110 dans l'activation de p57 ^{Akt-1}	63

IV – DISCUSSION

1. PROFILS DISTINCTS D'EXPRESSION DES ISOFORMES PI3-K SELON L'ÉTAT DE DIFFÉRENCIATION.....	67
2. COMPLEXES ISOFORMES PRÉDOMINANTS SELON L'ÉTAT DE DIFFÉRENCIATION.....	68
3. COMPLEXES ISOFORMES PRÉDOMINANTS DANS LA SIGNALISATION INTÉGRINES/FAK SELON L'ÉTAT DE DIFFÉRENCIATION.....	69
4. RÔLES DES ISOFORMES P110 α ET P110 β DANS LA SURVIE SELON L'ÉTAT DE DIFFÉRENCIATION.....	71
5. RÔLES DES ISOFORMES P110 α ET P110 β DANS L'ACTIVATION DE P57 ^{Akt-1} SELON L'ÉTAT DE DIFFÉRENCIATION.....	72

V- CONCLUSIONS

REMERCIEMENTS.....	75
BIBLIOGRAPHIE.....	76

LISTE DES FIGURES

I – INTRODUCTION

Figure 1	Voie commune de régulation de l'apoptose.....	3
Figure 2	Voie commune d'induction de l'anoïkose.....	7
Figure 3	Signalisation par les RTK et intégrines.....	11
Figure 4	L'axe crypte-villosité.....	19
Figure 5	Signalisation de survie induite par les intégrines : distinctions selon l'état de différenciation.....	21

III – RÉSULTATS

Figure 6	Profils d'expression transcriptionnelle des isoformes PI3-K (p85 et p110) chez les cellules épithéliales intestinales indifférenciées et différenciées..	39
Figure 7	Profils d'expression protéique de l'isoforme PI3-K p85 α , P85 β , P110 α et P110 β chez les cellules épithéliales intestinales indifférenciées, différenciées ainsi qu'au cours de la différenciation entérocytaire.....	42
Figure 8	Niveaux relatifs d'association de p85 α avec p110 α et p110 β chez les cellules épithéliales intestinales indifférenciées et différenciées.....	44
Figure 9	Niveaux relatifs d'association de p85 β avec p110 α et p110 β chez les cellules épithéliales intestinales indifférenciées et différenciées.....	45
Figure 10	Niveaux relatifs d'association de p110 α avec p85 α et p85 β chez les cellules épithéliales intestinales indifférenciées et différenciées.....	46
Figure 11	Niveaux relatifs d'association de p110 β avec p85 α et p85 β chez les cellules épithéliales intestinales indifférenciées et différenciées.....	47
Figure 12	Niveaux relatifs d'association de p85 α avec p125 ^{Fak} selon la signalisation Fak/Src chez les cellules épithéliales intestinales indifférenciées et différenciées.....	50

Figure 13	Niveaux relatifs d'association de p85 β avec p125 ^{Fak} selon la signalisation Fak/Src chez les cellules épithéliales intestinales indifférenciées et différenciées.....	51
Figure 14	Niveaux relatifs d'association de p125 ^{Fak} avec p110 α selon la signalisation Fak/Src chez les cellules épithéliales intestinales indifférenciées et différenciées.....	52
Figure 15	Niveaux relatifs d'association de p110 β avec p125 ^{Fak} selon la signalisation Fak/Src chez les cellules épithéliales intestinales indifférenciées et différenciées.....	53
Figure 16	Établissement de la concentration effective pour inhiber p110 α et p110 β à l'aide de Pik-75 et TGX221	56
Figure 17	L'inhibition de la sous-unité p110 α induit l'apoptose chez les cellules HIEC-6.....	57
Figure 18	L'inhibition de la PI3-K ou de p110 α mais pas p110 β induit l'apoptose chez les cellules HIEC-6.....	58
Figure 19	L'inhibition de la sous-unité p110 α induit l'apoptose chez les cellules Caco-2/15 indifférenciées.....	59
Figure 20	L'inhibition de la PI3-K ou de p110 α mais pas p110 β induit l'apoptose chez les cellules Caco-2/15 indifférenciées.....	60
Figure 21	L'inhibition de la sous-unité p110 α et p110 β induit l'apoptose chez les cellules Caco-2/15 différenciées.....	61
Figure 22	L'inhibition de la PI3-K, de p110 α et de p110 β induit l'apoptose chez les cellules Caco-2/15 différenciées.....	62
Figure 23	Les inhibiteurs de la PI3-K modulent les niveaux d'activation de p57 ^{Akt-1} chez les cellules HIEC-6.....	64
Figure 24	Les inhibiteurs de la PI3-K modulent les niveaux d'activation de p57 ^{Akt-1} chez les cellules Caco-2/15.....	65

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Classes de PI3-K.....	8
Tableau 2	Anticorps utilisés dans la présente étude.....	29
Tableau 3	Inhibiteurs pharmacologiques utilisés dans la présente étude.....	31
Tableau 4	Oligonucléotides utilisés pour analyses RT-PCR dans la présente étude.....	37

ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES

ADN	Acide désoxyribonucléique
AIF	Facteur inducteur d'apoptose
APAF-1	Facteur protéase activateur d'apoptose 1
ARN	Acide ribonucléique
ASK-1	Kinase régulant les signaux d'apoptose
BSA	Albumine sérique bovine
CAD	DNase activée par les caspases
DAPI	4',6'-diamidino-2-phénylindole
DEPC	Polycarbonate d'éthyle
DMEM	Milieu Eagle modifié par Dulbecco
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Éthylène diamine tétra acide acétique
ECL	Chimiluminescence
EGF	Facteur de croissance épidermique
Erk	Kinases régulées par des facteurs extracellulaires
Fak	Kinase d'adhésion focalisée
FBS	Sérum fœtal bovin
GAP	Protéine activatrice de GTPase
GEF	Facteur d'échange de nucléotide guanine
Ilk	Kinase liée aux intégrines
IRS	Substrat du récepteur de l'insuline
Hsp	Protéine de choc thermique
Jnk	Kinase c-Jun
IAP	Protéine inhibitrice de l'apoptose
MAPK	Kinase activée par des mitogènes

Mek	MAPK/Erk kinase
MEKK1	MAP Kinase /Erk kinase kinase-1
PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide
PBS	Tampon phosphate salin
PC	Post-confluence
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PDK	Kinase dépendante des phosphatidylinositols-3-phosphate
PH	Domaine homologue de la pleckstrine
PI3-K	Phosphatidylinositol 3'-OH kinase
PIP	Phosphatidylinositol phosphate
PMSF	Fluorure de Phénylméthanesulfonyle
p-NPP	Para-Nitrophényl phosphate
RPM	Révolution par minute
RT	Transcription inverse
RTK	Récepteur à activité tyrosine kinase
SAPK	Kinase activée par le stress
SDS	Sodium dodecyl sulphate
SEM	Erreur standard sur la moyenne
SH	Domaines homologues à Src
T°p	Température de la pièce
TBE	Tampon Tris, acide borique et EDTA
TdT	Terminal desoxynucléotidyl transférase
TUNEL	Marquage des cassures d'ADN par le dUTP médié par la TdT
U	Unité
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

Implication distincte des isoformes de la phosphatidylinositol 3-kinase dans la survie entérocytaire humaine selon l'état de différenciation.

Par

Dominique Noël

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.) en biologie cellulaire, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Des altérations de la voie PI3-K/Akt sont retrouvées dans une grande proportion de cancers. De plus en plus, on s'intéresse aux isoformes de la PI3-K et à leurs rôles respectifs, mais leurs implications au sein des mécanismes entourant la régulation de la survie/anoïkose entérocytaire humaine restent à être pleinement approfondies. Considérant que 1) la PI3-K est un complexe étant susceptible d'être formé de différents isoformes, 2) ces différents complexes isoformes peuvent effectuer des rôles distincts dans les divers processus cellulaires, 3) la voie PI3-K/Akt-1 exerce des rôles distincts dans la survie entérocytaire selon l'état de différenciation et que 4) dans la signalisation intégrines β 1/Fak, la voie PI3-K/Akt-1 est engagée de façon Src-dépendante chez les entérocytes indifférenciés mais se trouve à être Src-indépendante chez les cellules différenciées ; l'hypothèse de travail du projet de recherche était que *des complexes isoformes de la PI3-K sont impliqués de façon distincte dans la survie entérocytaire humaine, selon l'état de différenciation*. Les objectifs de recherche spécifiques à ce projet étaient les suivants : 1) déterminer les profils d'expression des différents isoformes (p85 et p110) selon l'état de différenciation; 2) déterminer les complexes isoformes (p85/p110) prédominants selon l'état de différenciation; 3) déterminer les complexes isoformes prédominants dans la signalisation PI3-K/Fak selon l'état de différenciation; et 4) déterminer les rôles des isoformes dans la survie entérocytaire.

Nous avons déterminé les profils d'expression des isoformes PI3-K de la classe 1A selon l'état de différenciation chez les cellules épithéliales intestinales. Aussi, il existe un profil d'expression distinct et les complexes isoformes sont également distincts selon l'état de différenciation. Nous avons ensuite déterminé qu'il existait des complexes isoformes de la PI3-K distincts dans la signalisation PI3-K/Fak selon l'état de différenciation, et que l'engagement de la voie PI3-K/Akt-1 implique des complexes isoformes distincts selon l'état de différenciation. Nous avons aussi démontré que les isoformes p110 sont impliqués de façon distincte dans la survie entérocytaire humaine ainsi que dans l'activation d'Akt-1, selon l'état de différenciation.

En résumé, notre étude a permis de démontrer que les isoformes PI3-K jouaient des rôles distincts dans la survie entérocytaire humaine et que ces rôles étaient également distincts selon l'état de différenciation.

Mots clés : anoïkose, isoformes PI3-K, survie entérocytaire humaine.

I – INTRODUCTION

1. Apoptose

L'apoptose est un mécanisme hautement régulé et génétiquement programmé, qui est crucial dans divers processus cellulaires tels que le développement et l'homéostasie tissulaire. Aussi, une perte ou une perturbation de l'apoptose peut être la source d'innombrables pathologies telles que les cancers, la maladie d'Alzheimer et le Parkinson (Cory et al., 2003; Olanow, 2007; Sanchez-Ramos et al., 2008; Levy et al., 2009). L'apoptose peut être induite par la cellule elle-même, on parle alors de voie intrinsèque, dans des situations où elle aurait subi des dommages irréparables à son ADN (stress oxydatif, irradiation etc.), perte de signaux de survie (facteurs de croissance, interaction cellule-matrice), infection virale ou stress thermique. L'apoptose peut également être causée par des signaux extracellulaires, tels que des cytokines pro-inflammatoires ou des toxines, on parle alors de voie extrinsèque (Cory et al., 2003; Edinger et Thompson, 2004).

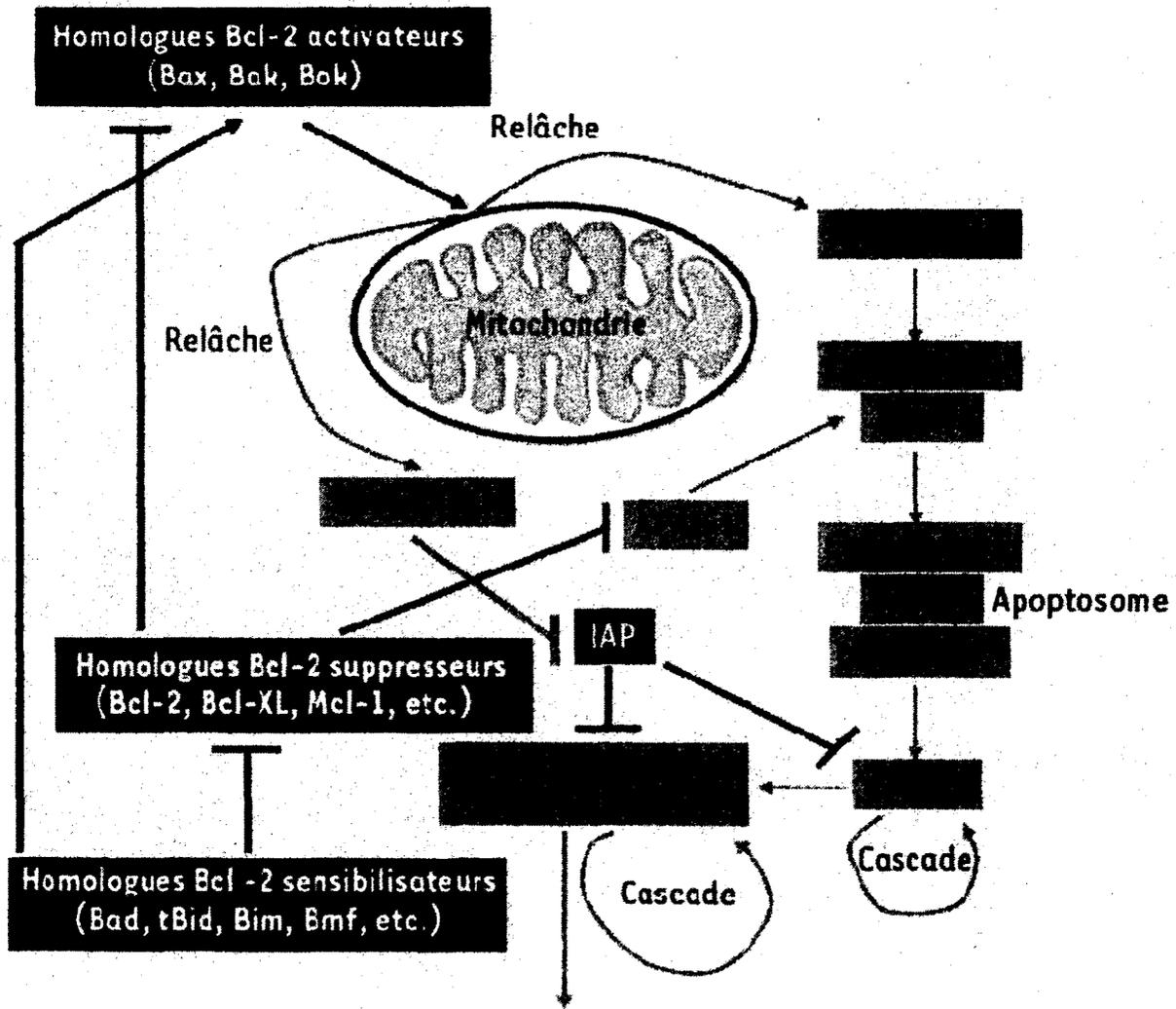
Le maintien de la survie cellulaire est un processus continu et actif qui nécessite constamment des signaux de survie afin de faire pencher la balance du côté de la survie plutôt que du côté de l'apoptose (Adams et Cory, 1998 ; Adams et Cory, 2001). Cet équilibre est en effet maintenu principalement par la régulation de protéines et molécules dites anti-apoptotiques et pro-apoptotiques. Dans une cellule saine, il existe un équilibre entre les protéines activatrices, inhibitrices et sensibilisatrices à l'apoptose (Cory et al., 2003; Martin et Vuori, 2004). Il y a bien présence de protéines favorisant l'apoptose (par exemple : Bak, Bax, Bad etc.) à tout moment, mais en mode survie, des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 sont présentes en assez grande quantité pour les séquestrer, les inhiber ou les inactiver. La famille Bcl-2 inclut six membres qui s'opposent à la mort cellulaire et neuf qui la favorisent (Cory et al., 2003; Martin et Vuori, 2004). C'est bien reconnu que les protéines impliquées dans la survie et la mort

cellulaires diffèrent selon le type cellulaire et l'état de différenciation (Gauthier et al., 2001a; Gauthier et al., 2001b; Harnois et al., 2004). Le plus souvent, Bak et Bax sont localisés dans le cytoplasme dans une cellule saine mais transloquent à la membrane mitochondriale en présence d'un stimulus apoptotique, tel qu'illustré à la figure 1. Il s'ensuit une perte de l'intégrité de la membrane mitochondriale externe. En plus de stopper la chaîne des phosphorylations oxydatives par la perte du potentiel électrique membranaire, les pores formés dans la membrane causent un relâchement de molécules et de protéines normalement séquestrées dans la mitochondrie comme des activateurs de caspases, (par exemple le cytochrome C, Hsp 10, Hsp 60), des inhibiteurs d'IAP (comme Smac/Diablo, procaspase 2 et 9, adénylate kinase 2, AIF, etc.), des espèces activées de l'oxygène, ainsi que AIF (Apoptosis inducing factor) (Cory et al., 2003; Martin et Vuori, 2004). Le cytochrome C joue un rôle majeur pour la suite des événements, ou il se lie à APAF-1 dans le cytosol pour former l'apoptosome. Ensuite, une oligomérisation avec la pro-caspase 9, la transforme en caspase 9 activée (Cory et al., 2003, Martin et Vuori, 2004). La caspase 9 est une caspase initiatrice de l'apoptose et une fois cette étape atteinte, l'apoptose devient inévitable et irréversible. Les caspases exécutrices (caspases 3, 6 et 7) sont ensuite activées, entraînant une cascade d'activation d'un plus grand nombre de caspases exécutrices, de la CAD (caspase activated DNase), qui dégrade l'ADN internucléosomique, et de multiples protéases, dont l'aboutissement est la condensation de la chromatine, la désorganisation du cytosquelette, ou bourgeonnement membranaire.

Aussi, il se produit un rétrécissement cellulaire, une déshydratation du cytoplasme, une fragmentation des organelles et une dégradation du matériel nucléaire. Le processus se termine avec une protéolyse totale et une cytolysse non inflammatoire. Le corpuscule apoptotique ainsi formé pourra être phagocyté par les cellules environnantes ou bien être exfolié (Cory et al., 2003; Edinger et Thompson, 2004; Adams et Cory, 2007).

Figure 1. Voie commune de régulation de l'apoptose.

Résumé des étapes et protéines impliquées dans la voie commune de régulation de l'apoptose. Lorsque les homologues Bcl-2 sensibilisateurs d'apoptose sont présents en assez grande quantité, il y a inhibition des homologues Bcl-2 anti-apoptotique et activation des protéines activatrices d'apoptose telles que Bax, Bak, et Bok. Ces dernières sont responsables de la création du pore de perméabilité mitochondriale, qui détruit l'intégrité de la mitochondrie, relâchant ainsi une multitude de facteurs favorisant l'apoptose telles que le cytochrome C et APAF-1. Ces deux composants, forment l'apoptosome qui a pour rôle de transformer la pro-caspase 9 en caspase 9 activée. La caspase 9 activée va induire une cascade d'activation de caspase effectrices, qui va causer la mise en marche de protéines chargées de dégrader les composantes cellulaires. Adapté de : Vachon, P.H., 2006.



- Activation de CAD → dégradation d'ADN internucléosomique
- Activation pro-Bid → tBid
- Clivage de Bcl-XL(anti-apoptotique) → Bcl-XS(pro-apoptotique)
- Clivage/inactivation de substrats (par exemple, PARP, kinases, noyau, cytosquelette, ribosomes, etc.)

2. Adhésion cellulaire, survie et anoïkose

Afin de survivre, la majorité des cellules, dont les cellules épithéliales, doivent interagir avec la matrice extracellulaire (Giancotti, 1997; Boudreau et Jones, 1999; Frisch et Screaton, 2001; Grossmann, 2002; Stupack et Cheresch, 2002; Martin et Vuori, 2004; Ameisen, 2005). L'objet de la présente étude a porté sur la signalisation de survie induite par l'adhésion cellulaire. Une perte de ces signaux de survie entraîne la mort de la cellule par une forme d'apoptose nommée anoïkose (Frisch et Screaton, 2001; Grossmann, 2002). L'anoïkose joue des rôles importants au niveau du développement ainsi que du maintien et du renouvellement des tissus (Boudreau et Jones, 1999). Les signaux de survie engendrés par l'adhésion de la cellule à la matrice extracellulaire se font principalement via des récepteurs de type intégrines (Beaulieu, 1999). En plus de former un lien physique entre la cellule et la matrice, les intégrines déclenchent une multitude de signaux de transduction (Boudreau et Jones, 1999; Giancotti, 1999a; Giancotti, 1999b; Stupack et Cheresch, 2002). Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires hétérodimériques composés d'une sous-unité α et d'une sous-unité β . Il existe 18 sous-unités α et 8 sous-unités β , et leur combinaison détermine la spécificité de l'intégrine à son ligand. À ce jour, on dénombre 24 intégrines différentes issues de combinaisons de sous-unités α et β (Beaulieu, 1999; Barczyk et al, 2010). La signalisation de survie induite par la sous-unité $\beta 1$ supprime l'anoïkose en causant l'activation de kinases telles que p125^{Fak}, PI3-K/Akt et/ou Mek/Erk, dépendamment du contexte cellulaire (Stupack et Cheresch, 2002; Zhao et Guan, 2009; Desgroseillier et Cheresch, 2010; Guan, 2010). La signalisation de survie induite par les intégrines sera développée à la section "Régulation, activation et effecteurs".

Une perte d'interaction cellule-matrice induit entre autres une baisse des signaux de survie, ce qui cause une baisse d'activation des voies de survie PI3-K/Akt-1 et Mek/Erk, tel qu'illustré à la figure 2. La perte d'adhésion cause aussi une perturbation du cytosquelette, qui a pour effet de libérer les homologues Bcl-2 sensibilisateurs d'apoptose Bim et Bmf, qui sont normalement séquestrés dans les microtubules et les microfilaments

(Cory et al., 2003; Martin et Vuori, 2004). De plus, il y a activation de la caspase initiateur CASP-8 qui va mener à une faible activation des caspases effectrices CASP-3 et CASP-7, puis à l'activation de la voie des kinases de stress JNK et p38 (SAPK). Les caspases effectrices vont également activer Bid, inactiver les kinases liées à la signalisation intégrines comme Fak et Akt, ainsi que causer l'activation de MEKK1, un activateur de certaines SAPK. L'activation des SAPK est aussi facilitée par Ask-1, qui est normalement inhibée par la signalisation de survie des intégrines (Frisch et Screaton, 2001; Martin et Vuori, 2004).

En conclusion de tous ces événements, le signal est transmis à la mitochondrie et il y a formation de l'apoptosome, activation de la caspase 9, et finalement, la cascade d'activation des caspases effectrices. Avant la formation de l'apoptosome, la mort cellulaire peut être évitée s'il se produit une ré-adhésion de la cellule. Il existe donc une certaine fenêtre de réversibilité de l'anoïkose qui peut durer jusqu'à 4 heures dépendamment du type cellulaire. Par contre, une fois l'apoptosome formé, la mort cellulaire devient irréversible et inévitable. Plusieurs types de cellules cancéreuses ont développé des stratégies d'évasion de l'anoïkose qui leur permettent de survivre même en absence d'ancrage à la matrice extracellulaire. Parmi ces stratégies, il y a une altération de la kinase Fak (surexpression ou mutation la rendant constitutivement active) (Weiner et al., 1993; Basson et al., 2006; Hao et al., 2009), de la voie PI3-K/Akt (Samuels et al., 2004; Vanhaesebroeck et al., 2010), ou du type ou de la quantité d'un type d'intégrine (Rathinam et Alahari, 2010). L'implication de la voie PI3-K/Akt dans le cancer sera discuté en détail à la section 3.3 PI3-K et cancer.

3. PI3-K : Généralités

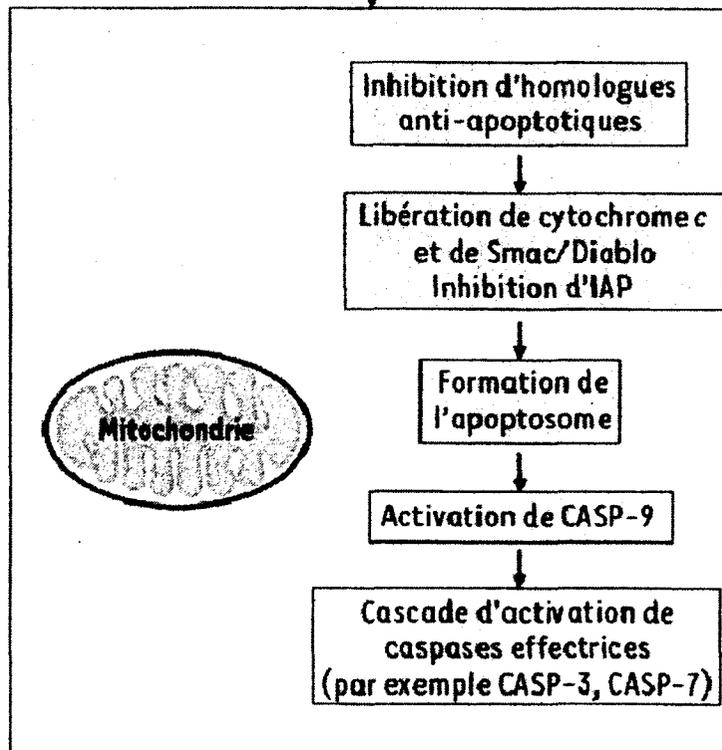
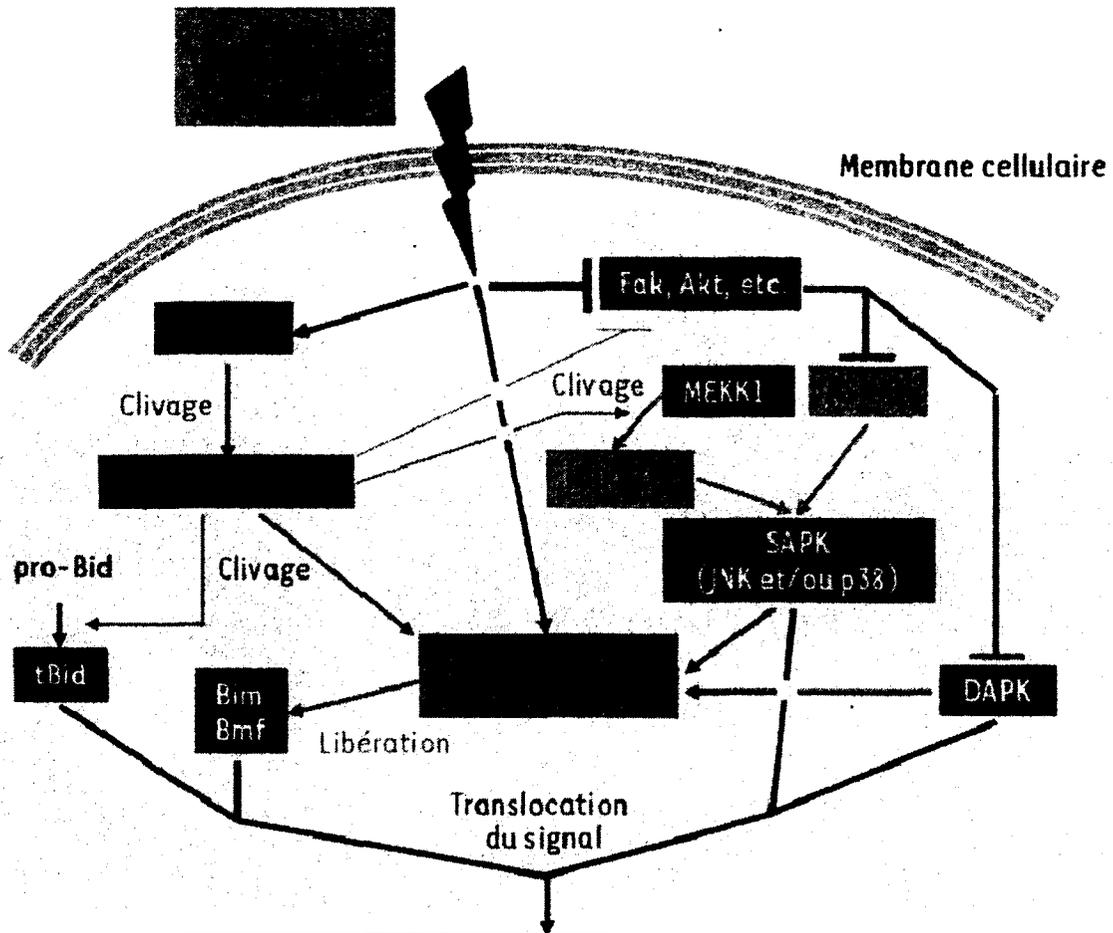
La PI3-K est une enzyme de type lipide kinase hétérodimérique, c'est-à-dire qu'elle est composée d'une sous-unité régulatrice et d'une sous-unité catalytique. Son rôle principal est de phosphoryler le groupement hydroxyle en position trois de l'anneau

inositol de son substrat, soit principalement le phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate, afin de former le phosphatidylinositol (3,4,5) triphosphate. La PI3-K peut aussi utiliser comme substrat le phosphatidylinositol et le phosphatidylinositol 4 phosphate (Vanhaesebroeck et al., 2001; Engelman et al., 2006).

La préférence du substrat dépend du type de PI3-K impliquée et des conditions. Par exemple, un même complexe isoforme de PI3-K peut avoir une préférence d'utilisation du substrat lors d'essais *in vitro* qui est différente de ce qui est observé *in vivo*. La PI3-K est au cœur de la voie PI3-K/Akt et joue un rôle très important dans plusieurs processus cellulaires tels que la différenciation, la prolifération et la survie (Engelman et al., 2006; Fayard et al., 2010).

Figure 2. Voie commune d'induction de l'anoïkose

Résumé des étapes et protéines impliquées dans la voie commune d'induction de l'anoïkose. Lors de la perte d'interaction entre la cellule et la matrice extracellulaire, il y a inhibition des voies de survie impliquant entre autres Fak, PI3-K/Akt et Mek/Erk. Il se produit également une perturbation du cytosquelette, qui va permettre le relâchement de Bim et Bmf, des homologues Bcl-2 sensibilisateurs d'apoptose séquestrés dans les microfilaments et les microtubules. Aussi, il y a activation de la caspase 8, qui va contribuer à l'activation des caspases effectrices, et par le fait même, l'activation de la voie des SAPK. Tous ces événements conduiront à la translocation du signal à la mitochondrie, à la formation de l'apoptosome et à la mort cellulaire causée par la cascade d'activation des caspases effectrices. Adapté de : Vachon, P.H., 2006.



3.1 Classes et complexes isoformes

Les différentes isoformes sont classifiées selon leur homologie, leur structure, leur régulation et leur spécificité de substrat. Elles sont divisées en trois classes principales : I, II et III, et la classe I se divise elle-même en deux sous-classes : IA et IB. La classe I est celle qui est la plus étudiée puisque ces isoformes sont activées principalement par des récepteurs de surface. Les enzymes de la classe IA sont constitués d'une sous-unité régulatrice p85 et d'une sous-unité catalytique p110 et sont activés par des récepteurs à activité tyrosine kinase, des récepteurs couplés aux protéines G, par Ras et par des tyrosines kinases (Engelman et al., 2006; Liu et al., 2009).

Tableau 1 : Classes de PI3-K

Classe	Sous unités		Activation	Substrat
	Catalytique	Régulatrice		
IA	p110 α p110 β p110 δ	p85 α p55 α p50 α p85 β p55 γ	RTK Ras Récepteurs couplés protéines G Intégrines	PI PI(4)P PI(4,5)P ₂
IB	p110 γ	p101 P84 p87	Récepteurs couplés protéines G Ras	PI PI(4)P PI(4,5)P ₂
II	PIK3C2 α PIK3C2 β PIK3C2 γ		Récepteurs couplés Protéines G	PI PI(4,5)P ₂
III	Analogues de Vps34	p150	Constitutive	PI

Pour les sous-unités régulatrices, il existe plusieurs isoformes, soit p85 α , p85 β , et p55 γ . Il existe aussi p50 α et p55 α qui sont des produits d'épissage alternatif de p85 α . Il y a aussi trois isoformes catalytiques, soit p110 α , p110 β et p110 δ . Les enzymes de la classe IB sont des hétérodimères composés d'une sous-unité catalytique p110 γ et d'une sous-unité régulatrice p101, p84 ou p87. Ces enzymes sont activées par des récepteurs couplés

aux protéines G, et sont retrouvés chez les leucocytes, le muscle squelettique, le foie, le pancréas et le cœur (Vivanco et Sawyers, 2002; Liu et al., 2009). Celles de la classe II sont constituées seulement d'une sous-unité catalytique, soit PI3KC2 α , PI3KC2 β ou PIK3C2 γ , et leur fonctions cellulaires demeurent jusqu'à ce jour inconnues. Les enzymes de la classe III, on ne retrouve que VPS34, qui serait impliquée dans le trafic vésiculaire et dans la régulation de l'autophagie (Funderburk et al., 2010), mais cette enzyme est très peu étudiée.

La présente étude s'intéresse principalement aux isoformes de la classe IA. Toutes les isoformes de cette classe contiennent un domaine de liaison à la sous-unité catalytique p110 ainsi que deux domaines SH2 qui permettent de lier les résidus tyrosine phosphorylés. Les isoformes p85 α et p85 β contiennent en plus un domaine SH3, qui permet de lier les domaines riches en proline, et aussi un domaine BCR, qui a un rôle activateur de GTPase pour les petites protéines G (Fry et Waterfield, 1993). Pour ce qui est des sous-unités catalytiques, les isoformes sont très semblables. Elles contiennent toutes un domaine de liaison à p85, un domaine de liaison à Ras, un domaine de reconnaissance du substrat, un domaine kinase et un domaine hélical, qui a un rôle structural (Engelman et al., 2006; Vogt et al., 2010). Les différentes isoformes régulatrices et catalytiques peuvent s'associer en différentes combinaisons, formant ainsi divers complexes-isoformes.

3.2 Régulation, activation et effecteurs

3.2.1 Signalisation de survie induite par les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK)

Le mode d'activation de la PI3-K le plus étudié est celui impliquant les récepteurs à activité tyrosine kinase. Des exemples de tels récepteurs capables d'activer la PI3-K sont le récepteur de l'insuline, et aussi les récepteurs de facteurs de croissance tels que l'EGF, le PDGF et le VEGF. La liaison du ligand du côté extracellulaire induit une

dimérisation ou multi-dimérisation du récepteur, causant une autophosphorylation croisée des résidus tyrosine des récepteurs du côté intracellulaire. La sous-unité p85 peut lier directement les tyrosines phosphorylées grâce à ses domaines SH2, entraînant l'activation de la sous-unité catalytique, et ainsi la phosphorylation des phosphatidylinositols membranaires. Les tyrosines phosphorylées peuvent également recruter Grb2 via ses domaines SH2, avec ou sans l'intermédiaire de Shc, qui va lier SOS via des domaines SH3. Cette liaison cause l'activation de SOS, qui elle-même activera Ras. Ras peut directement activer p110, qui possède un domaine de liaison à Ras, et il y aura alors production de PIP3 (Castallano et Downward, 2010). Src est une autre protéine importante qui peut être recrutée par les tyrosines phosphorylées du récepteur, ce qui cause son activation aussi par phosphorylation sur sa tyrosine 418. La sous-unité p85 de la PI3-K peut alors être recrutée par la tyrosine phosphorylée de Src, avec ou sans l'intermédiaire de IRS, pour finalement effectuer son travail (Figure 3A) (Abram et Courtneidge 2000; Hawkins et al., 2006).

3.2.2 Signalisation de survie induite par les intégrines

Dans les cellules épithéliales, la signalisation de survie induite par les intégrines provient principalement de la sous-unité $\beta 1$ (Stupack et Cheresh, 2002; Vachon, 2006). Non seulement les intégrines sont responsables de l'ancrage des cellules à la matrice extracellulaire mais elles engendrent également une variété de signaux de transduction visant à supprimer l'anoïkose. Lorsque l'intégrine se lie à son ligand dans la matrice extracellulaire, celle-ci change de conformation permettant le recrutement et l'activation de la kinase $p125^{\text{Fak}}$ par autophosphorylation sur sa tyrosine 397. Le site de tyrosine phosphorylé ainsi créé peut directement recruter et activer la PI3-K, ce qui mènera à la production de PIP3. La tyrosine phosphorylée de $p125^{\text{Fak}}$ peut également mener à l'activation indirecte de la PI3-K via le recrutement et à l'activation de Src et/ou IRS (Figure 3B) (Frisch et al., 1996; Cornillion et al., 2003).

Figure 3 : Signalisation par les RTK et intégrines

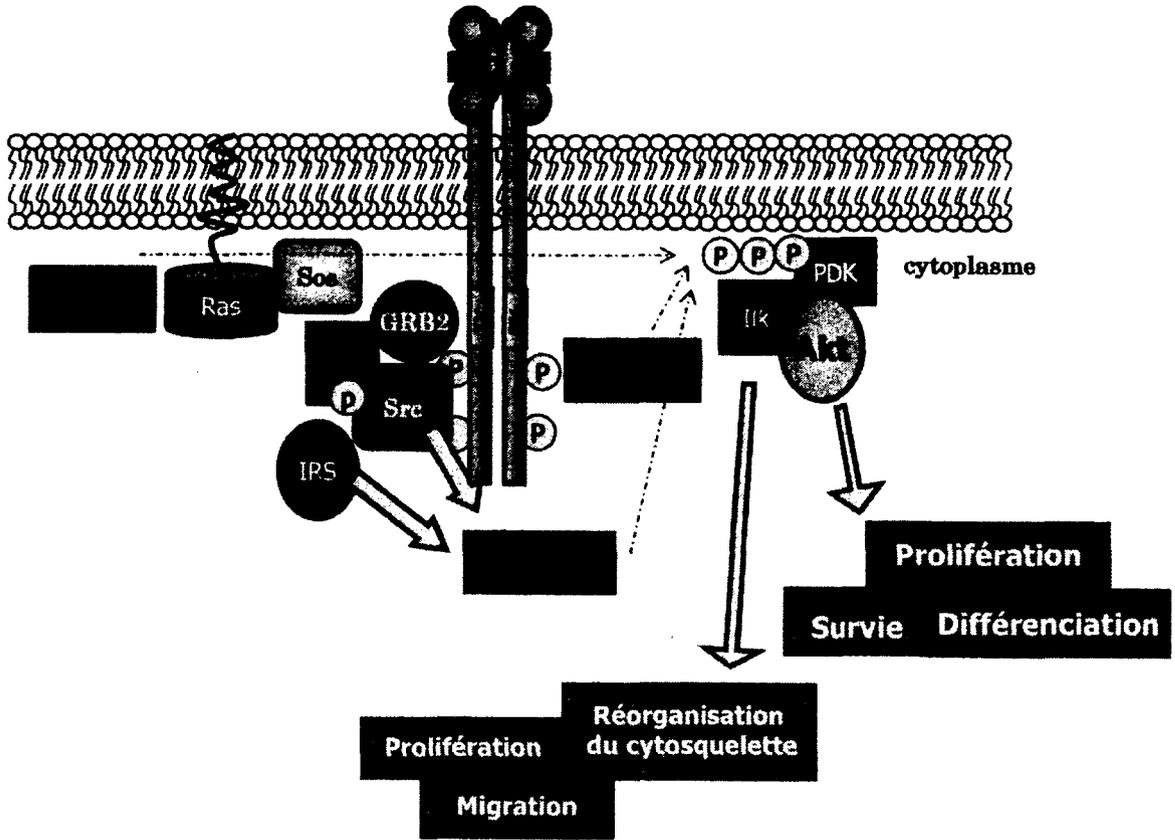
A. Signalisation PI3-K/Akt induite par les RTK

La liaison d'un ligand au récepteur de la famille des RTK induit sa dimérisation/multidimérisation, ce qui provoque l'autophosphorylation croisée de ses résidus tyrosine. Ces tyrosines phosphorylées servent alors de site d'ancrage pour des protéines contenant des domaines SH2 telles que Src, Grb2 et PI3-K. Le complexe Grb2, PI3-K peut être activée par la voie Grb2/Sos/Ras/PI3-K. Src peut directement activer la PI3-K, ou bien par l'intermédiaire de IRS. Une fois activée, la PI3-K phosphoryle les PI membranaires, le PIP2, pour former du PIP3. Le PIP3 agit comme second messager, et recrute des protéines comme Ilk, PDK et Akt, qui possèdent des domaines PH pouvant lier le PIP3. Une fois activé, la voie d'Ilk mène à divers processus cellulaires tels que la prolifération, la migration et la réorganisation du cytosquelette. Aussi, le PIP3, ainsi que Ilk, avec ou sans PDK, peuvent causer l'activation d'Akt, qui va favoriser la survie, la prolifération ou la différenciation cellulaire, en fonction du contexte ou du type cellulaire impliqué.

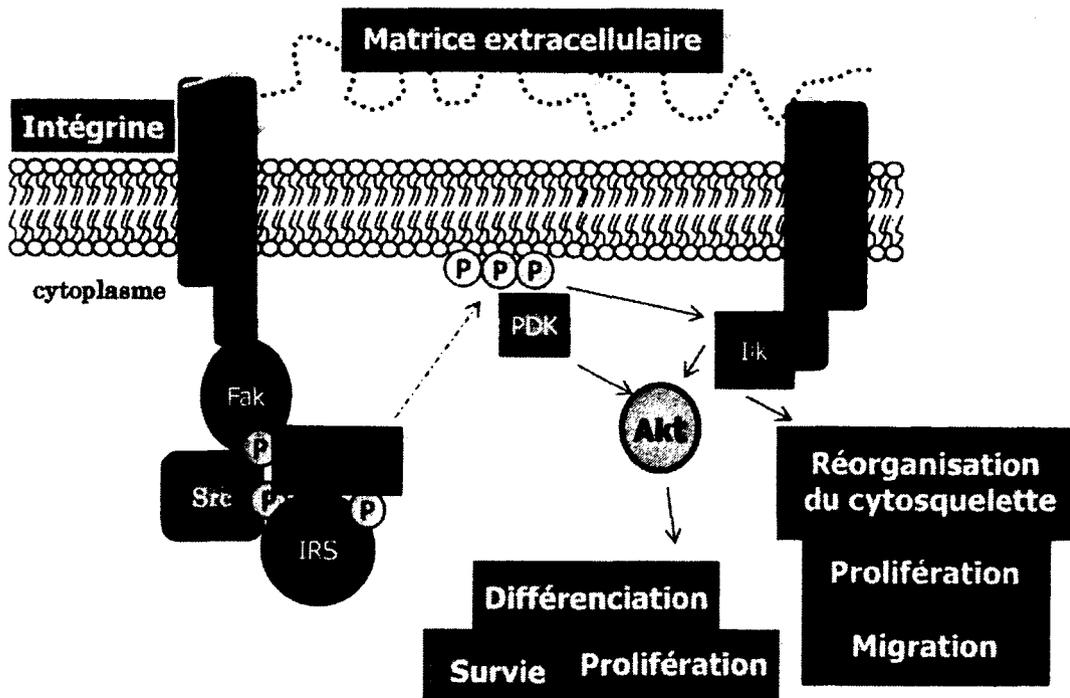
B. Signalisation PI3-K/Akt induite par les intégrines

La liaison de l'intégrine à son ligand de la matrice extracellulaire induit un changement de conformation de l'intégrine, ce qui permet le recrutement et l'activation de Fak. La PI3-K peut être recrutée par Fak, avec ou sans l'aide de Src ou IRS, ce qui causera son activation, et la production de PIP3. Adapté de : Vachon, P.H., 2006.

A.



B.



3.2.3 Effecteurs et régulation

Les PIP3 ainsi formés sont des seconds messagers, et servent de point d'ancrage dans le feuillet membranaire interne pour des protéines possédant principalement des domaines PH. Parmi ces protéines, mentionnons les sérines/thréonines kinases telles que p57^{Akt} et PDK, qui participent à la survie cellulaire et à la prolifération. Il y a aussi les tyrosines kinases possédant un domaine PH telles que les protéines de la famille Tec, qui sont responsables de la mobilisation du calcium et de la transcription de certains gènes reliés à la motilité cellulaire (Finkelstein et Schwartzberg, 2004). D'autres types de protéines possèdent des domaines PH et participent à la réorganisation du cytosquelette et au trafic membranaire, telles que les GEFs, Rac/Arf et les GAPs, Arf (Casanova, 2007). Finalement, il y a les protéines d'échafaudage qui contiennent des domaines PH telles que Gab et Grb2 (Wymann et Pirola, 1998; Vanhaesebroeck et al., 2001; Cantley, 2002; Engelman et al., 2006). Puisque la présente étude s'intéresse principalement à la signalisation de survie induite par les intégrines, les travaux porteront principalement sur la signalisation induite par p57^{Akt}.

La régulation de la voie PI3-K/Akt est importante puisque cette voie est centrale dans de multiples processus, tels que l'embryogénèse, le développement, la survie, la prolifération, la différenciation (Engelman et al., 2006; Fayard et al., 2010). Les niveaux de PIP3 sont régulés par l'activité de lipide phosphatases, la plus importante étant PTEN (Zhang et Yu, 2010). Il en existe cependant d'autres, telles que MTM1, MTMR2, SBF2, OCRL1 et SNJ1 (Bunney et Katan, 2010). La dérégulation des mécanismes de contrôle assurant des niveaux définis de PIP3 est associée à de nombreuses maladies. Ces maladies impliquent entre autres des défauts de trafic vésiculaire, le métabolisme, l'inflammation, le diabète et le cancer (Samuels et al., 2004; Kok et al., 2008). La présente étude, s'intéresse principalement aux rôles de la PI3-K dans le cancer.

3.3 PI3-K et cancer

Puisque la voie PI3-K/Akt est centrale dans plusieurs processus cellulaires impliqués dans le cancer, il y a de multiples façons dont cette voie peut être dérégulée et ainsi devenir oncogénique. Des mutations dans un des gènes encodant la PI3-K sont très souvent retrouvées dans plusieurs cancers. La mutation la plus souvent rencontrée est une mutation de p110 α augmentant son activité enzymatique ou même le rendant constitutif actif. On retrouve aussi de nombreux cas où l'expression de p110 α est altérée de telle sorte qu'elle est amplifiée et mène à une suractivation d'Akt (Vogt et al., 2010; Zhao et Vogt, 2010). Aussi, on peut retrouver plusieurs copies du gène PIK3CA, le gène codant pour p110 α , menant ainsi à sa surexpression (Racz et al., 1999; Shayesteh et al., 1999; Ma et al., 2000; Redon et al., 2001). Les essais *in vitro* démontrent qu'une inhibition sélective de p110 α permet de faire chuter la prolifération, la chimiorésistance et la migration de plusieurs types de cellules cancéreuses (Guerreiro et al., 2008; Zhang et al., 2009; Paz-Ares et al., 2010; Ihle et al., 2010). Plus récemment, p110 β a été identifié comme oncogène potentiel lorsqu'il a été démontré que des fibroblastes embryonnaires de souris dont le gène codant pour p110 β , PIK3CB, avait été invalidé, ne pouvaient pas être transformés par Ras muté constitutif actif ou bien EGFR muté constitutif actif (Jia et al., 2008). Dans la même étude, mais cette fois-ci avec un modèle murin de tumorigénèse de la prostate induite par la perte de PTEN, l'ablation de p110 β a permis de bloquer la formation de tumeurs. En ce qui concerne p110 δ , elle représente tout de même une cible thérapeutique intéressante même si, au contraire de p110 α et p110 β , elle n'est pas exprimée de façon ubiquitaire. En effet, il a été montré que son expression est augmentée dans la leucémie myéloblastique (Sujobert et al., 2005 ; Billottet et al., 2006).

Même si la majorité des études dans ce domaine se concentrent surtout sur les isoformes catalytiques, plusieurs évidences pointent aussi en direction des sous-unités régulatrices. Il a été montré que p85 α était muté dans de nombreux cas de cancer du côlon. Cette mutation augmente la stabilité et l'activité de la sous-unité p110, favorisant ainsi l'activation d'Akt, la survie cellulaire, la prolifération et par le fait même, l'oncogénèse (Jaiswal et al., 2009). Dans cette étude, une forme tronquée de p85 α

tronqué a été isolée de tumeurs lymphoïdes de souris irradiée. Ce mutant de p85 α a la capacité d'activer constitutivement la sous-unité p110 menant à une augmentation de l'activité PI-3K (Jimenez et al., 1998).

Ces résultats illustrent bien le potentiel thérapeutique des éléments de la voie PI3-K/Akt dans le traitement des patients atteints de cancer. Quelques inhibiteurs sélectifs sont même déjà testés en essais cliniques de phase I (Cleary et al., 2010). Le pouvoir oncogénique de la dérégulation de la voie PI3-K est d'autant plus amplifié lorsque couplé à d'autres altérations de protéines importantes telles que PTEN, p53 ou Ras (Zhang et Yu, 2010; Vogt et al., 2010). L'étude des isoformes PI3-K est donc importante dans un contexte de recherche sur la survie entérocytaire humaine.

3.4 Rôles distincts des isoformes PI3-K

Il a longtemps été considéré que les différentes isoformes de PI3-K avaient des fonctions redondantes (Chaussade et al., 2007; Foukas et al., 2010). Depuis, il a été démontré que certaines isoformes pouvaient exécuter une tâche spécifique au sein d'un type cellulaire en particulier. Ainsi, certains complexes isoformes peuvent avoir des rôles distincts, dépendamment du type cellulaire, ou du contexte cellulaire, par exemple l'état de différenciation. Premièrement, il existe une répartition tissu-spécifique des isoformes PI3-K (Inukai et al., 2000). Cependant, certaines isoformes qui sont plus fortement exprimées pour un type cellulaire donné; par exemple, p110 δ et p110 γ prédominent dans les leucocytes (Kok et al., 2009). Bien que ces isoformes se retrouvent dans d'autres types de tissus, c'est surtout dans les cellules du système immunitaire que leurs rôles distincts sont documentés. Par exemple, p110 δ est impliqué au niveau de la régulation du développement des cellules B dans la rate et les cavités pleurales ainsi que dans le processus de prolifération des cellules T (Okkenhaug et al., 2007). Il a aussi été montré que p110 γ était essentiel pour la chimiotaxie des neutrophiles et des macrophages (Oak et al., 2007).

L'étude du rôle des isoformes PI3-K a grandement progressé grâce aux modèles murins. Par exemple, il a été montré que les isoformes p110 α et p110 β sont importants lors du développement et de l'embryogénèse. En effet, les souris homozygotes pour la délétion d'un ou l'autre de ces gènes meurent au stade embryonnaire résultant de sévères anomalies vasculaires (Bi et al., 1999). La souris hétérozygote pour une mutation rendant p110 α incapable d'activité kinase avait une croissance et une régulation du métabolisme défectueuses, de l'hyperinsulinémie et une intolérance au glucose (Foukas et al., 2006). La souris homozygote pour une mutation rendant p110 β incapable d'activité kinase survit parfois jusqu'à l'âge adulte mais avec une croissance retardée et des défauts dans le métabolisme du glucose (Ciraolo et al., 2008). La souris homozygote pour la délétion de p110 δ est viable, mais possède des cellules B et NK défectueuses, un faible pouvoir de réponse humorale, des niveaux bas d'immunoglobulines et leur neutrophiles sont incapables de chimiotaxie (Clayton et al., 2002; Jou et al., 2002; Okkenhaug et al., 2002; Ali et al., 2004; Puri et al., 2004; Kim et al., 2007; Guo et al., 2008). En ce qui concerne les sous-unités régulatrices, la souris homozygote pour la délétion de p85 α et ses produits d'épissage alternatif (p50 α et p55 α) meurt à la naissance et a une nécrose du foie, de l'hyperglycémie et des cellules B dysfonctionnelles (Fruman et al., 1999; Fruman et al., 2000). La souris homozygote pour la délétion de p85 β est viable mais présente une sensibilité accrue à l'insuline et une hyperprolifération des cellules T (Ueki et al., 2002).

Avec l'avènement d'inhibiteurs pharmacologiques sélectifs, l'étude des rôles particuliers des isoformes PI3-K dans divers types cellulaires a dernièrement connu de remarquables avancées. Il a été depuis longtemps montré que l'expression des isoformes PI3-K variait selon le type de tissus étudié. Certaines isoformes peuvent être presque absentes dans un certain type cellulaire et être majoritaires dans un autre (Inukai et al., 1997). Non seulement il devient important d'étudier quelle isoforme prédomine en expression protéique, mais aussi quel complexe isoforme est majoritaire, et quels rôles peuvent y être associés.

Par exemple, dans une étude publiée en 2000 par Bénistant et al., il a été montré que, le complexe p85 α /p110 α serait impliqué dans la survie cellulaire alors que

p85 α /p110 β serait impliqué dans la synthèse *de novo* d'ADN des cellules de carcinome de colon humain. Aussi, un même isoforme peut avoir un rôle différent dépendamment du type cellulaire. En effet, il a été démontré que p110 α régulerait les fonctions de barrière endothéliale des jonctions adhérentes (Cain et al., 2010); alors que dans le tissus osseux, cette isoforme joue un rôle dans l'ostéoclastogénèse et dans la prolifération des cellules ostéoblastiques et stromale (Grey et al., 2010).

Non seulement les rôles d'une isoforme peuvent varier selon le type cellulaire, on peut également retrouver des rôles distincts selon l'état de différenciation. Par exemple, chez les adipocytes de souris, l'expression de p110 β augmente de plus de dix fois lors de la différenciation, et la protéine ainsi présente chez l'adipocyte différencié est responsable du transport et du métabolisme du glucose (Asano et al., 2000). Puisque p110 δ et p110 γ sont surtout associés à la régulation de la signalisation du système immunitaire, mes travaux ont portés tout particulièrement sur les rôles distincts des isoformes catalytiques p110 α et p110 β dans la régulation de la survie entérocytaire humaine selon l'état de différenciation.

4. L'épithélium intestinal

4.1 Modèles in vitro de différenciation entérocytaire humaine

L'épithélium intestinal est un modèle pratique pour étudier les mécanismes impliqués dans le renouvellement tissulaire, incluant l'apoptose (Ménard et al., 2005). Ce renouvellement se fait de façon rapide, c'est-à-dire entre 3 et 5 jours, le long de l'axe crypte-villosité, tel qu'illustré à la figure 4. Cette unité fonctionnelle de l'intestin grêle est essentiellement constituée de deux populations cellulaires, soit les cellules prolifératrices et immatures de la crypte, et les cellules différenciées de la villosité (Ménard et al., 2005). Plus en détails, les cellules souches sont situées dans le fond de la crypte, alors que des cellules filles progénitrices et prolifératives se retrouvent dans le compartiment de prolifération. Ce compartiment est situé dans la moitié inférieure de la crypte. Les

cellules prolifératives vont migrer de façon ascendante le long de l'axe, et les cellules en voie de différenciation sont retrouvées dans le tiers supérieur de la crypte. Les cellules se différencient en quatre types cellulaires : les cellules entéroendocrines, les cellules de Paneth, les cellules caliciformes et les entérocytes. Les cellules en voie de différenciation vont migrer aussi de façon ascendante le long de l'axe excepté pour les cellules de Paneth, qui migrent de façon descendante de sorte qu'une fois différenciée, elles se retrouvent dans le fond de la crypte. Lorsque les trois autres types de cellules atteignent la base de la villosité, elles sont pleinement différenciées et fonctionnelles. Une fois à l'apex de la villosité, les cellules entrent en anoïkose et sont exfoliées dans la lumière intestinale (Ménard et al., 2005). On peut parfois retrouver des cellules apoptotiques dans la crypte, mais c'est un événement rare, qui sert à se débarrasser des cellules endommagées ou défectueuses (Ménard et al., 2005).

Pour étudier *in vitro* l'axe crypte-villosité, deux modèles de culture cellulaire seront utilisés; premièrement, les HIEC, qui sont des cellules normales de la crypte intestinale humaine. Ces cellules sont indifférenciées, prolifératives et n'entament pas de processus de différenciation (Pageot et al., 2000). Dans un deuxième temps, les cellules Caco-2/15 seront utilisées comme modèle de différenciation entérocytaire. Les cellules de cette lignée proviennent d'un adénocarcinome de colon humain, et se différencient en cellules ayant le phénotype d'entérocytes fonctionnels et matures. Cette lignée est très utile dans l'étude de la différenciation puisque ces cellules entament leur processus de différenciation lorsqu'elles atteignent la confluence. Elles sont donc complètement différenciées environ 25 à 30 jours après l'atteinte de la confluence et sont très semblables tant morphologiquement que fonctionnellement au modèle cellulaire PCDE provenant de culture primaires pures (Zweibaum et Chantret, 1989; Vachon et Beaulieu, 1992; Perreault et Beaulieu, 1996; Pageot et al., 2000).

4.2 Mécanismes de survie : distinctions selon l'état de différenciation

Il est maintenant bien établi que la survie, l'apoptose et l'anoïkose entérocytaire humaine impliquent des mécanismes distincts selon l'état de différenciation. Tout d'abord, les cellules épithéliales intestinales indifférenciées sont moins susceptibles à l'apoptose/anoïkose que les cellules différenciées (Gauthier et al., 2001b; Harnois et al., 2004). Ces dernières, en effet, exhibent une dégradation de l'ADN internucléosomique de façon significativement plus rapide que les cellules indifférenciées lors de l'induction de l'anoïkose (Vachon et al., 2002).

L'apoptose survenant chez les entérocytes différenciés à l'apex de la villosité constitue un phénomène normal faisant partie du renouvellement de l'épithélium, tandis que l'apoptose survenant chez les cellules indifférenciées de la crypte représente un processus plutôt rare servant à détruire les cellules défectueuses ou anormales (Potten et al., 1997; Thomson et al., 2003; Ménard et al., 2005). Un des effecteurs importants dans le processus d'apoptose, est la SAPK p38. Il a été montré que p38 était essentielle au bourgeonnement membranaire, à la dégradation de l'ADN internucléosomique et à l'activation des caspases (Vachon et al., 2002). Cependant, il existe quatre isoformes de p38 (p38 α , p38 β , p38 γ , et p38 δ), et il a été démontré que p38 β est nécessaire à l'induction de l'apoptose chez les cellules épithéliales intestinales indifférenciées, alors que p38 δ joue ce rôle chez les cellules différenciées (Vachon et al., 2002). De plus, il y a des distinctions au niveau des voies de signalisation de survie impliquées selon l'état de différenciation (Figure 5). La voie Mek/Erk n'est pas requise pour la survie des cellules épithéliales intestinales indifférenciées, alors qu'elle est importante pour la survie des entérocytes différenciés (Gauthier et al., 2001a; Gauthier et al., 2001b; Harnois et al., 2004). La voie PI3-K/Akt-1 est cruciale pour la survie autant chez les entérocytes indifférenciés que différenciés, cependant, son inhibition induit un taux d'apoptose significativement plus élevé chez les cellules indifférenciées (Gauthier et al., 2001a; Gauthier et al., 2001b, Harnois et al., 2004).

Figure 4. L'axe crypte-villosité

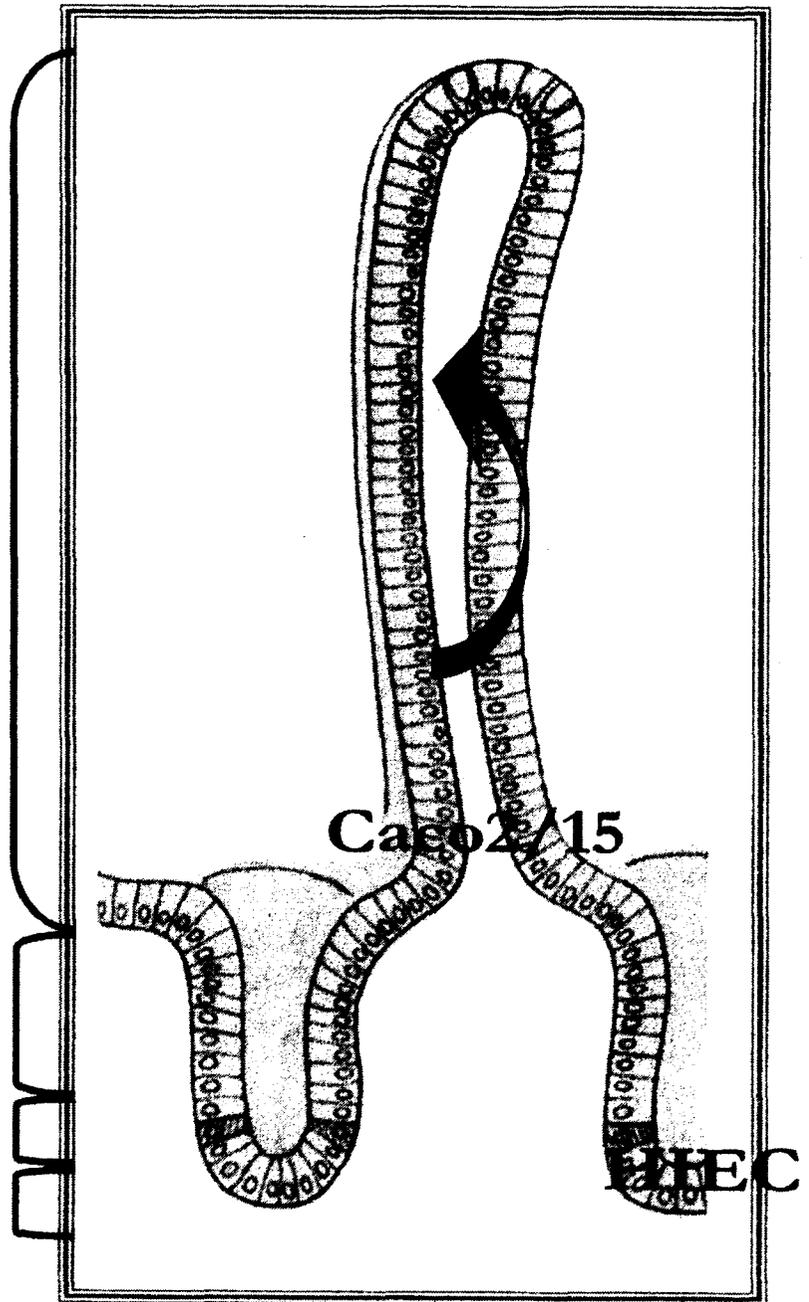
L'axe est divisé en deux parties, soit la villosité, où on retrouve les cellules différenciées et matures, et la crypte, où on retrouve les cellules souches ainsi que les cellules de Paneth, les cellules filles progénitrices et les cellules en voie de différenciation. Les cellules en voie de différenciation migrent de façon ascendante le long de l'axe, et lorsqu'elles atteignent la base de la villosité, elles sont pleinement différenciées. Lorsqu'elles atteignent l'apex de la villosité, elles meurent par anoïkose et sont exfoliées dans la lumière intestinale. Dans nos expérimentations, les entérocytes différenciés de la villosité sont représentés par les Caco-2/15 et les cellules souches indifférenciées de la crypte sont représentées par les cellules HIEC-6.

Villosité

Cellules différenciées matures

Crypte

Cellules en voie de différenciation
Cellules prolifératives
Cellules souches et cellules de Paneth

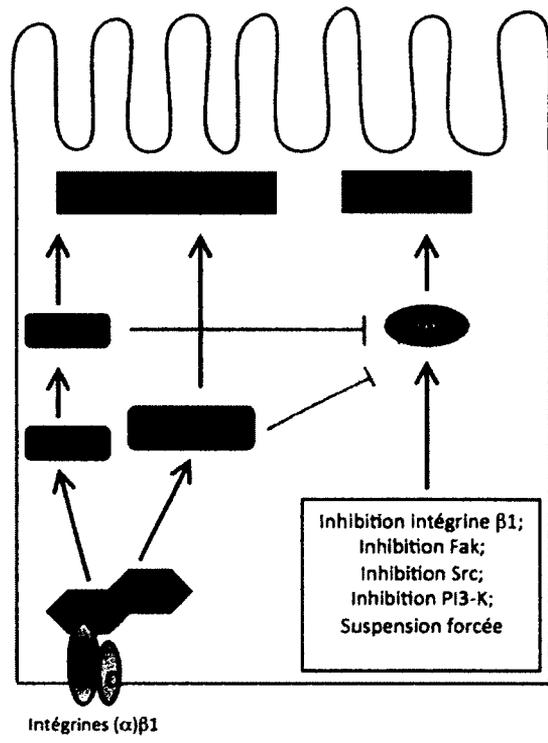
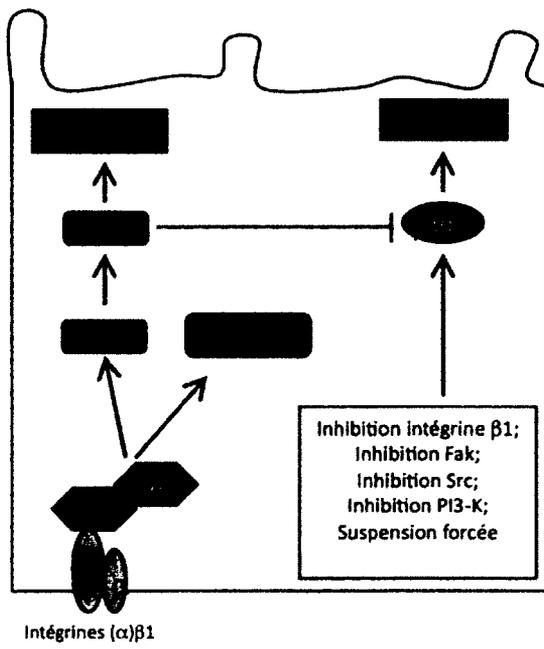


Précisons que seul Akt-1 est important pour la survie des entérocytes humains puisqu'il a été démontré que Akt-2 était indépendant de l'activation de la PI3-K, et donc non requis pour la survie, peu importe l'état de différenciation (Dufour et al., 2004). Il y a aussi une distinction selon l'état de différenciation au niveau de l'engagement de la voie PI3-K/Akt-1. Cette dernière est en effet engagée dépendamment de Src chez les cellules indifférenciées alors qu'elle est engagée indépendamment de Src chez les entérocytes différenciés (Bouchard et al., 2007; Bouchard et al., 2008). L'expression des homologues Bcl-2 est différentielle selon l'état de différenciation et la régulation des homologues Bcl-2 se fait de façon distincte par les voies PI3-K/Akt-1 et Mek/Erk, selon l'état de différenciation (Vachon et al., 2000; Vachon et al., 2001; Ménard et al., 2005).

Il a aussi été observé qu'il existait une modulation différentielle des niveaux relatifs d'activation de $p125^{\text{Fak}}$, de $p57^{\text{Akt-1}}$ et de Erk-1/Erk-2 au cours de la différenciation entérocytaire, suggérant ainsi des rôles distincts de chacune de ces voies selon l'état de différenciation (Dufour et al., 2004; Gauthier et al., 2001a, Gauthier et al., 2001b; Harnois et al., 2004).

Figure 5. Signalisation de survie induite par les intégrines : distinctions selon l'état de différenciation

Dans la voie de signalisation intégrine $\beta 1$ /Fak, la voie PI3-K/Akt-1 antagonise p38 β chez les entérocytes indifférenciés tandis qu'elle antagonise p38 δ chez les entérocytes différenciés. Aussi, chez les cellules indifférenciées, la voie Mek/Erk est non-requise pour la survie, et la voie PI3-K/Akt est Src-dépendante. Chez les cellules différenciées, la voie PI3-K/Akt-1 est Src-indépendante, et la voie Mek/Erk est requise pour la survie. Adapté de : Vachon, P.H., 2006 et Bouchard et al., 2007.



5. Hypothèse et objectifs

Considérant que : 1) la PI3-K est un complexe étant susceptible d'être formé de différents isoformes, 2) ces différents complexes isoformes peuvent avoir des rôles distincts dans les divers processus cellulaires, 3) la voie PI3-K/Akt-1 exerce des rôles distincts dans la survie entérocytaire selon l'état de différenciation et 4) dans la signalisation intégrine β 1/Fak, la voie PI3-K/Akt-1 est engagée de façon Src-dépendante chez les entérocytes indifférenciés mais se trouve à être Src-indépendante chez les cellules différenciés ; **l'hypothèse posée est que des complexes isoformes de la PI3-K sont impliqués de façon distincte dans la survie entérocytaire humaine, selon l'état de différenciation.** Afin de vérifier cette hypothèse, les objectifs spécifiques à ce projet de recherche sont les suivants :

- 1) Déterminer les profils d'expression des différents isoformes (p85 et p110) selon l'état de différenciation.
- 2) Déterminer les complexes isoformes (p85/p110) prédominants selon l'état de différenciation.
- 3) Déterminer les complexes isoformes prédominants dans la signalisation intégrine β 1/Fak selon l'état de différenciation.
- 4) Déterminer les rôles des isoformes dans la survie entérocytaire.

II – MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Culture cellulaire

La lignée cellulaire Caco-2/15 (Beaulieu et Quaroni, 1991; Vachon et Beaulieu, 1992), un clone qui provient de la lignée parentale Caco-2 (Pinto et al., 1983), est dérivée d'un adénocarcinome de côlon et provient du laboratoire de Dr Jean-François Beaulieu (Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec). Les cellules Caco-2/15 représentent notre modèle de différenciation entérocytaire. Lorsqu'elles sont cultivées à sous-confluence (70% confluence, -2 PC), elles sont prolifératives et indifférenciées. Elles amorcent le processus de différenciation à l'atteinte de la confluence (0 PC) et celui-ci sera complété 25 à 30 jours après l'atteinte de la confluence (25-30 PC). Les Caco-2/15 25-30 PC sont morphologiquement et fonctionnellement différenciées en une monocouche d'entérocytes, très semblables au modèle cellulaire PCDE tant morphologiquement que fonctionnellement, ainsi qu'au niveau du transcriptome (Tremblay et al., 2006). Les cellules PCDE proviennent de cultures primaires pures, fraîchement isolées et pleinement différenciées d'entérocytes villositaires (Zweibaum et Chantret, 1989; Perreault et Beaulieu, 1996; Pageot et al., 2000). Les cellules Caco-2/15 ont été cultivées dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco, Burlington, Ontario) supplémenté de 10% de sérum fœtal bovin (FBS) (Wisent, St-Bruno, Québec), de 2 mM de glutamine (Gibco), de 10 mM HEPES (Gibco) et d'antibiotiques (Gibco) (100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine) ; Gauthier et al., 2001; Dufour et al., 2004; Bouchard et al., 2007).

Les cellules HIEC (fournies par le Pr Jean-François Beaulieu) sont des cellules normales isolées de la crypte de l'intestin grêle humain, non transformées et non immortalisées. Elles sont prolifératives, indifférenciées, et n'entament pas de processus de différenciation (Pageot et al., 2000). Les cellules HIEC sont cultivées dans du milieu OPTI-MEM (Gibco) supplémenté de 5% de sérum fœtal bovin (Wisent), de 2 mM de

glutamine (Gibco), de 10 mM HEPES (Gibco), d'antibiotiques (Gibco) (100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine), de 0,2 U/ml d'insuline (Novolin, Toronto, Ontario) et de 5 ng/ml d'EGF (BD Biosciences, Mississauga, Ontario) (Gauthier et al., 2001; Harnois et al., 2004; Bouchard et al., 2008). Les cellules Caco-2/15 et HIEC-6 ont été incubées à 37°C sous une atmosphère humide composée de 95% d'air et de 5% de CO₂. Le milieu de culture a été changé à toutes les 48 heures jusqu'au niveau de confluence désiré.

2. Analyses par immunoprécipitation et immunobuvardage (Western blot)

2.1 Préparation des échantillons pour immunobuvardage

Les cellules (2 pétris 100 mm (Corning, Lowell, MA, USA) pour HIEC et Caco-2/15 sous-confluentes, 1 pétri 100 mm pour Caco-2/15 post-confluentes) ont été récupérées avec le milieu de culture dans un tube conique de 15 mL (BD Biosciences). Les cellules ont été culottées par centrifugation (Centrifugeuse Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Le culot a été lavé deux fois avec du PBS (137 mM NaCl (Fisher, Ottawa, Ontario), 2,7 mM KCl (Sigma, Oakville, Ontario), 1,5 mM KH₂PO₄ (Fisher), 5,2 mM Na₂HPO₄ (Fisher)) froid à pH 7,4 pour ensuite être solubilisé dans 500 µl (HIEC-6 et Caco-2/15 sous-confluentes) ou 1 ml (Caco-2/15 post-confluentes) de tampon de solubilisation Laemmli (125 mM Tris (Bio-Rad, Mississauga, Ontario), 0,23 mM SDS (Sigma), 10% Glycérol (Fisher), 0,005% Bleu de Bromophénol (Sigma), 5% β-mercaptoéthanol (Bio-Rad)) et transféré dans un microtube 1,5 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Germany). Les échantillons ont été soniqués (Ultrasonic processor, Mandel Scientific, St-Laurent, Québec) et vortexés (Fisher) pendant 30 secondes (HIEC) ou 1 minute (Caco-2/15) jusqu'à disparition de la texture visqueuse. Les échantillons ont ensuite été chauffés à 100°C (Bloc chauffant VWR, Mississauga, Ontario) pendant 5 minutes et centrifugés 5 minutes à 15 000 g à température pièce (T°p). Les surnageants, contenant les protéines, ont été conservés à -80°C.

2.2 Préparation des échantillons pour immunoprécipitation

Les cellules (2 pétris 100 mm pour les HIEC et les Caco-2/15 sous-confluentes, 1 pétri 100 mm pour les Caco-2/15 post-confluentes) ont été récupérées avec le milieu de culture dans un tube conique de 15 mL (BD Biosciences). Les cellules ont été culottées par centrifugation. Ce culot a été lavé deux fois avec du PBS froid pour ensuite être solubilisé dans 500 µl (HIEC et Caco-2/15 sous-confluentes) ou 1 ml (Caco-2/15 post-confluentes) de tampon de solubilisation RIPA (50 mM Tris-HCl (BioRad) pH 8,0, 150 mM NaCl (Fisher), 1 mM DTT (Sigma), 0,5 mM EDTA (Sigma), 1% NP-40 (Roche, Basel, Suisse), 0,5% acide sodium déoxycholate (Sigma), 0,1% SDS (Sigma), 100 µM sodium orthovanadate (Sigma), 1 mM PMSF (Sigma), 0,5 µg/ml leupeptine (Sigma), 0,5 µg/ml aprotinine (Sigma), 0,7 µg/ml pepstatine (Sigma), 40 mM β-glycérophosphate (Sigma) et 10 mM p-NPP (Sigma)). Les échantillons ont été récupérés dans un microtube 1,5 ml, lysés sur glace pendant 30 minutes en vortexant aux 5 minutes, et centrifugés à 4 °C, à 15 000 g pendant 5 minutes. Les surnageants ont été conservés à -80 °C.

2.3 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

Lorsque nécessaire, la concentration en protéines a été déterminée par la méthode modifiée de Lowry (Peterson G.L., 1977), pour les lysats cellulaires dans le tampon Laemmli, ou par la méthode BCA (Trousse de dosage, Thermo Scientific) pour les lysats cellulaires dans le tampon RIPA. Les échantillons (50 µg de protéines) ou 30 µl d'un immunoprécipitat, non dosé, selon le cas, ont été chauffés à 100°C et vortexés pendant 5 minutes puis ont été séparés sur un gel de polyacrylamide dénaturant (7,5% ou 12% acrylamide (BioShop, Burlington, Ontario)). Un marqueur de poids moléculaire coloré (Full range rainbow, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) a été utilisé comme indicateur visuel de migration. L'électrophorèse a été effectuée à 100-125 V dans un tampon d'électrophorèse (25 mM Tris (Bio-Rad), 0,1% SDS (Sigma), 192 mM glycine

(Roche)) jusqu'à l'atteinte du degré de séparation des protéines désiré (variant de 1h30 à 7h). Le gel a alors été soumis à un électrotransfert liquide dans un tampon de transfert (20% méthanol (EMD, Gibbstown, NJ, USA), 25 mM Tris (Bio-Rad), 192 mM glycine (Roche)) sur une membrane de nitrocellulose (Bio-Rad) pendant 1 h à 100 V. Les protéines transférées sur la membrane ont ensuite été visualisées par coloration au rouge de Ponceau (Sigma). La membrane est ensuite décolorée par 3 lavages de 10 minutes avec agitation (Agitateur GX-100 Gyrotwister, Labnet, Edison, NJ, USA) dans une solution de PBS contenant 0,05% de Tween-20 (Bio-Rad).

2.4 Immunoprécipitation

Nous avons utilisé des billes d'agarose liées à la protéine A (Sigma, utilisé pour une immunoprécipitation utilisant un anticorps produit chez le lapin) ou liées à la protéine G (Sigma, utilisé pour une immunoprécipitation utilisant un anticorps produit chez la souris). Les billes (50 µl de billes par échantillon) ont été lavées 3 fois avec 500 µl de tampon RIPA ne contenant pas d'inhibiteurs de protéases/phosphatases (RIPA incomplet). Les billes sont centrifugées 30 secondes (billes d'agarose-protéine G) ou 1 minute (billes d'agarose-protéine A) à 15 600 g entre les lavages. Ensuite, 300 µl de RIPA et la quantité appropriée d'anticorps reconnaissant la protéine que l'on veut immunoprécipiter (voir tableau 2) ont été ajoutés aux billes lavées. Les tubes ont été incubés 2 h à T°P avec agitation (Agitateur rotatif, Sarstedt) afin de permettre la liaison de l'anticorps avec les billes. Les billes ont été lavées 2 fois avec 300 µl de tampon RIPA complet et centrifugées 30 secondes ou 1 minute à 15 600 g entre les lavages. Le complexe billes-anticorps a alors été incubé avec 500 µl de lysat cellulaire dans le tampon RIPA pendant 4h à 4°C avec agitation. Après centrifugation à 15 600 g pendant 30 secondes ou 1 minute, le lysat cellulaire a été récupéré et pourra être réutilisé ultérieurement. Les billes ont été lavées 3 fois avec le tampon RIPA complet. Après avoir ajouté 100 µl de tampon Laemmli aux billes, celles-ci ont été chauffées 5 minutes à

100°C et centrifugées 5 minutes à 15 600 g. Finalement, les immunoprécipitats ont été conservés à -80°C.

2.5 Immunodétection des protéines (Western blot)

Suite à l'électrophorèse et au transfert, les membranes ont été saturées en protéines dans une solution de blocage à laquelle a été ajouté 0,05% d'azide de sodium (Sigma) (10% de lait écrémé en poudre (Nestlé Carnation, North York, Ontario) ; "Blotto", ou 2% de BSA (Sigma), dissouts dans du PBS avec 0,05% de Tween-20 (Bio-Rad) durant toute la nuit, à T°P sous agitation. La solution de blocage primaire était la même que la solution utilisée pour diluer l'anticorps primaire. Les conditions d'incubation avec l'anticorps primaire (solution utilisée pour la dilution, temps et température d'incubation) sont présentées dans le tableau 2. Les membranes ont ensuite été lavées avec la solution de PBS-Tween 4 fois pendant 10 minutes avec agitation. Les membranes ont été incubées 1 h avec agitation à T°P dans un premier temps avec la solution de blocage secondaire (Blotto 10% sans azide de sodium), et ensuite avec une solution d'anticorps secondaire (voir tableau 2) dans la même solution que le blocage secondaire. Les membranes ont été lavées 2 fois avec la solution de PBS-Tween et 2 fois avec du PBS pendant 10 minutes sous agitation. Les bandes immunoréactives ont été détectées par l'ajout de la solution ECL (GE Healthcare) pendant 1 minute et ont été révélées par une exposition des films Hyper Film ECL (GE Healthcare). Les temps d'exposition varient de 1 seconde à 30 minutes selon l'anticorps primaire utilisé.

2.6 Anticorps primaires utilisés

Nous avons utilisé un anticorps monoclonal de souris reconnaissant le domaine SH3 unique à p85 α (#05-212 Clone Ab6, Millipore, Billerica, MA, USA). Nous avons également utilisé un anticorps monoclonal de souris reconnaissant spécifiquement la

sous-unité p85 β de la PI3-K (Ab251 Clone T4, Abcam, Cambridge, MA, USA). Pour détecter la sous-unité p110 α , nous avons utilisé un anticorps polyclonal de lapin (#4255, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), et pour détecter p110 β , un anticorps monoclonal de lapin (#04-400 Clone Y384, Millipore). Nous avons utilisé un anticorps monoclonal de souris reconnaissant spécifiquement la protéine Fak (#05-537 Clone 4.47, Millipore). Pour ce qui est de p57^{Akt}, nous avons utilisé un anticorps polyclonal de lapin dirigé spécifiquement contre la forme active, soit phosphorylé sur la sérine 473 (#9271, Cell signaling Technology), et un anticorps polyclonal de lapin reconnaissant spécifiquement l'isoforme Akt-1 (#07-416, Millipore). Pour des fins de normalisation, nous avons utilisé un anticorps monoclonal de souris reconnaissant l'actine filamentaire et globulaire (MAB1501, Millipore).

2.7 Anticorps secondaires utilisés

Nous avons utilisé un anticorps monoclonal de chèvre lié à la peroxydase reconnaissant la partie Fc des anticorps de souris. (A2554, Sigma). Nous avons aussi utilisé un anticorps monoclonal de chèvre lié à la peroxydase reconnaissant la partie Fc des anticorps de lapin. (#7074, Cell Signaling).

2.8 Déshybridation des membranes

Afin de faire plus d'un immunobuvardage sur la même membrane, on peut procéder à la déshybridation de celle-ci. Pour ce faire, la membrane a été incubée 20 minutes à T°P sous agitation dans une solution à pH 2,9 de 100 mM de glycine (Roche), 1% Tween-20 (Bio-Rad). La membrane a ensuite été lavée 3 fois 10 minutes avec PBS.

Tableau 2. Anticorps utilisés dans la présente étude

Anticorps	Type	Protéine reconnue	Dilution	Incubation	Compagnie
05-212	Monoclonal	p85 α	1 :500	2h, T°P, Blotto 10%	Millipore
Ab251	Monoclonal	p85 β	1 :100	2h, T°P, Blotto 10%	Abcam
4255	Polyclonal	p110 α	1 :250	O/N, T°P, Blotto 10%	Cell Signaling
04-400	Monoclonal	p110 β	1 :200	O/N, T°P, Blotto 10%	Millipore
05-537	Monoclonal	Fak	1 :1500	2h, T°P, Blotto 10%	Millipore Cell
9271	Polyclonal	p-Akt (Ser 473)	1 :250	2h, T°P, BSA 2% O/N, 4°C, Blotto	Signaling
07-416	Polyclonal	Akt-1	1 :2000	10%	Millipore
MAB1501	Monoclonal	Actine	1 :5000	1h, T°P, Blotto 10%	Millipore
A2554	Monoclonal	Anticorps de souris	1 :1500	1h, T°P, Blotto 10%	Sigma
7074	Monoclonal	Anticorps de lapin	1 :1500	1h, T°P, Blotto 10%	Cell Signaling

3. Traitement des cellules et incubation avec différents inhibiteurs pharmacologiques

Dans le but d'étudier l'effet de l'inhibition d'une protéine et/ou d'une voie de signalisation en particulier, nous avons traité les cellules avec différents inhibiteurs pharmacologiques. Pour les cellules HIEC et Caco-2/15, les traitements ont toujours été faits pendant 24 heures, dans le milieu de culture en absence de FBS. Avant le début du traitement, les cellules ont été lavées deux fois avec 5 ml de milieu DMEM sans sérum pour retirer les possibles constituants du sérum pouvant être présents dans les pétris. Pour l'incubation avec un inhibiteur pharmacologique, la quantité appropriée de l'inhibiteur a été ajoutée au milieu DMEM sans sérum et la solution résultante a été vortexée pour assurer une répartition égale d'inhibiteur, avant d'être ajoutée au pétri. Dans le cas spécifique du traitement pour mettre les cellules en condition d'anoïkose pure, nous avons utilisé des pétris recouverts de polyHEMA (2-hydroxyethylmethacrylate #P-3932, Sigma). Le polyHEMA est un polymère qui empêche l'adhésion cellulaire (Minett et al., 1984; Frisch, 1999). Pour l'ensemencement des cellules sur pétri de polyHEMA, les cellules à la confluence désirée (100% pour HIEC, 70% pour Caco-2/15) ont été décollées du pétri avec une solution de 0,025% trypsine et 0,01% EDTA (Gibco) puis ont été récoltées dans 5 ml de milieu DMEM sans sérum. Les cellules ont été transférées dans un tube conique de 15 ml (BD Biosciences) puis ont été centrifugées 5 minutes à 1 500 g. Le culot a été suspendu dans 10 ml de milieu DMEM sans sérum pour ensuite être déposé dans le pétri de polyHEMA préalablement rincé 2 fois avec 5 ml de milieu sans sérum. Pour induire l'anoïkose chez les Caco-2/15 différenciés, puisque leur nature ne nous permettait pas de les trypsiniser, nous avons simplement décollé la monocouche de cellules avec un jet de milieu DMEM sans sérum doucement envoyé sous la monocouche. Nous avons assumé que les jonctions cellulaires étaient intactes. Les Caco-2/15 ainsi décollés étaient incapables de ré-adhérer au pétri, ce qui permettait de garder la monocouche en suspension pendant la période du traitement, soit 24 h.

3.1 Inhibiteurs pharmacologiques utilisés

Nous avons utilisé le LY294002 (Calbiochem, San Diego, CA, USA), un inhibiteur sélectif de l'activité kinase de la sous-unité p110 de la PI3-K (Datta et al., 1999). Cet inhibiteur a été utilisé à une concentration de 30 μM (Gauthier et al., 2001; Laprise et al., 2002). Le PP2 (Calbiochem), un inhibiteur de l'activité kinase de Src (Keely et Parise, 1996; Parsons et Parsons, 1997; Abram et Courtneidge, 2000), a été utilisé à une concentration de 20 μM (Laprise et al., 2002; Laprise et al., 2003; Bouchard et al., 2007; Bouchard et al., 2008). Le Pik-75 (PI3-K α inhibitor VIII, # 528116, Calbiochem) est un inhibiteur sélectif de p110 α , qui bloque son activité kinase (Hayakawa et al., 2006; Chaussade et al., 2007). Cet inhibiteur a été utilisé à une concentration de 1 μM pour les cellules HIEC et 2 μM pour les cellules Caco-2/15. Le TGX-221 (PI3-K β inhibitor VI, # 528113, Calbiochem) inhibe sélectivement l'activité kinase de p110 β (Chaussade et al., 2007; Straub et al., 2008). Cet inhibiteur a été utilisé à une concentration de 1 μM pour les cellules HIEC, et de 2 μM pour les cellules Caco-2/15 (Voir tableau 3). La concentration appropriée de Pik-75 et TGX-221 pour induire l'apoptose a été déterminée à l'aide d'une courbe concentration-réponse (0,5-10 μM).

Tableau 3. Inhibiteurs pharmacologiques utilisés dans la présente étude

Inhibiteur	Kinase inhibée	Concentration utilisée		Source
		HIEC	Caco-2/15	
Tyrosines kinases				
PP2	famille Src	20 μM	20 μM	Calbiochem
LY294002	PI3-K	30 μM	30 μM	Calbiochem
Pik-75	p110 α	1 μM	2 μM	Calbiochem
TGX221	p110 β	1 μM	2 μM	Calbiochem

4. Mise en évidence de l'apoptose par essais TUNEL *in situ*

Le TUNEL *in situ* (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP mediated nick end labelling) permet de détecter la dégradation de l'ADN, survenant lors de l'apoptose, de cellules individuelles. La technique consiste en l'ajout d'un nucléotide dUTP marqué à la digoxigénine à l'extrémité 3'-OH des fragments d'ADN résultant de la dégradation induite par le processus apoptotique. L'utilisation d'un anticorps secondaire anti-digoxigénine couplé à un fluorophore permet la visualisation des sites de dégradation de l'ADN grâce à un microscope à fluorescence. Dans le cas présent, nous avons utilisé la trousse de détection d'apoptose "ApopTag" (Millipore) (Vachon et al., 1996; Gauthier et al., 2001; Vachon et al., 2002; Laprise et al., 2002). Les cellules ont été cultivées sur une lamelle de verre de 12 mm (de diamètre) (Fisher) jusqu'à l'atteinte du niveau de confluence désiré. Après le traitement de 24 h, les cellules ont été fixées sur la lamelle de verre à l'aide d'une solution de 2% formaldéhyde (Sigma) dans un tampon phosphate 0,2 M à pH 7,4, pour une durée de 45 minutes, à 4°C. La lamelle a ensuite été déposée sur une lame de microscope (Fisher), qui, elle, se trouvait dans une chambre humide, pour le reste de l'expérience. Les cellules ont été lavées avec du PBS 2 fois, pendant 5 minutes. Les groupements aldéhydes restants ont été neutralisés par l'ajout d'une solution de "quenching" (150 mM glycine dans le PBS, pH 7,2) pendant 15 minutes. Les cellules ont été lavées une fois 5 minutes avec le PBS, ont été perméabilisées avec l'ajout d'une solution de 0,1% Triton X-100 (Roche) dissout dans du PBS, pendant 3 minutes, puis ont été lavées 2 fois 5 minutes avec le PBS. Les sites non spécifiques ont été bloqués avec une solution de Blotto 10% pendant 5 minutes. Les cellules ont été incubées avec le tampon d'équilibration (Trousse de détection de l'apoptose, Millipore) pendant 5 minutes, puis avec la solution de TdT (Millipore), dilué 1:2,4 dans le tampon de réaction (Millipore), pendant 1 h à 37 °C (La solution de TdT avait été pré-incubée à 37 °C pendant 15 minutes pour activer l'enzyme). La réaction a été arrêtée par l'ajout du tampon d'arrêt (solution tampon d'arrêt (Millipore) dilué 1:34 dans de l'eau) pendant 10 minutes. Les cellules ont ensuite été lavées 2 fois 5 minutes avec le PBS, puis ont été

incubées avec le Blotto 10% pendant 15 minutes. Les cellules ont été incubées avec la solution d'anticorps digoxigénine couplé à la fluorescéine (Millipore) (dilué 1:2,13 dans la solution de Blotto 10%) pendant 45 minutes et les cellules ont été gardées à l'abri de la lumière pour le reste de l'expérience. Les cellules ont été lavées 2 fois 5 minutes avec le PBS, ont été incubées pendant 5 minutes avec la solution de DAPI (Sigma) diluée 1:50 000 dans le PBS, puis lavées à nouveau avec le PBS pendant 5 minutes. Les cellules ont été colorées avec une solution de 0,01% bleu d'Evans (Sigma) pendant 30 secondes et ont finalement été lavées 2 fois 10 minutes avec le PBS. La lamelle a été montée sur lame dans une solution de glycérol-PBS 9:1 contenant 0,1% de paraphénylène diamine (Sigma) puis une micrographie de 5 champs différents a été prise avec le microscope à fluorescence Leica DM-RxA (Leica, St-Laurent, Québec). Les comptes de cellules apoptotiques et totales ont été effectués avec le programme ImageJ (National Institute of Health, USA) et ont été compilés avec Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA) (Gauthier et al., 2001; Vachon et al., 2002). Le pourcentage de cellules apoptotiques pour chaque condition a été calculé et a été exprimé en terme de pourcentage de contrôle, en fixant le pourcentage de cellules apoptotiques de la condition contrôle à 100%.

5. Analyses par réaction en chaîne par polymérase après transcription inverse (RT-PCR)

5.1 Extraction et isolation de l'ARN

Nous avons utilisé la méthode d'extraction d'ARN au Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Le pétri 100 mm (de diamètre) de cellules à confluence désirée a été lavé 3 fois avec du PBS stérile. Les cellules ont ensuite été grattées dans 1 ml de PBS, ont été récoltées dans un microtube 1,5 ml et ont été centrifugées 5 minutes, à 1500 g et à 4°C. Le culot a été solubilisé dans 800 µl, pour les cellules HIEC, ou dans 1 ml, pour les Caco-2/15, de solution Trizol. Le tube a ensuite été incubé 5 minutes à T°P. Pour les HIEC, 160 µl de chloroforme/alcool isoamyl (24:1) (Sigma) ont été ajoutés (200 µl pour

les Caco-2/15). Le tube a été agité vigoureusement pendant 15 secondes, laissé reposer pendant 3 minutes, et centrifugé à 4°C, 10 minutes à 12 000 g. Le surnageant a été transféré dans un nouveau microtube et 500 µl d'isopropanol (Fisher) y a été ajouté. Le tube a été agité vigoureusement, laissé au repos 10 minutes et centrifugé à 4°C pendant 10 minutes à 12 000 g. Le culot d'ARN a été lavé avec 1 ml d'une solution 70% d'éthanol (Les Alcools du Commerce, Montréal, Québec) puis a été séché à l'air. Pour terminer, le culot a été dissout dans un volume d'eau traitée DEPC approprié pour avoir une concentration d'ARN d'au plus 2,5 µg/µl.

5.2 Réaction de transcription inverse

La transcription inverse permettant de synthétiser l'ADNc à partir de l'ARNm a été réalisée à l'aide d'une ADN polymérase ARN-dépendante, soit l'enzyme transcriptase inverse du virus de la myéloblastose aviaire (AMV). L'ARNm (5 µg) et 1 µg d'oligo dT ont été mélangés avec de l'eau traitée DEPC pour un volume final de 20 µl dans un microtube. Le tube a été incubé à 70°C pendant 10 minutes, puis a été incubé à 4°C pendant 3 minutes. Au même tube, 1 µl de dNTPs 10 mM (Roche), 1 µl de l'enzyme AMV (Roche), 6 µl de tampon de réaction 5X (Roche) et 3 µl d'eau traitée DEPC ont été ajoutés. Le tube a ensuite été incubé 1 heure à 37°C et le produit final, les ADNc, a été conservé à -20°C.

5.3 Réaction en chaîne par polymérase

Afin de détecter la présence d'un transcrit en particulier, nous avons utilisé la technique de réaction en chaîne par polymérase (PCR). Dans un microtube pour PCR (Sarstedt), les constituants suivants ont été mélangés : 4 µl d'ADNc (réaction de RT), 0,5 µl de dNTPs (Roche) concentrés à 10 mM, 0,5 µl d'oligonucléotides sens et anti-sens

concentrés à 10 μ M, 0,625 U de l'enzyme ADN polymérase Taq (GE Healthcare), 2,5 μ l de tampon de réaction concentré à 10X et 16,875 μ l d'eau traitée DEPC. Le tube est ensuite mis dans l'appareil thermocycleur (MyCycler, BioRad). Le programme d'amplification utilisé contient une première étape de dénaturation des brins d'ADN à 94°C pendant 10 minutes, puis est suivi de 25 cycles de trois étapes, soit la dénaturation, l'hybridation des amorces et la synthèse du nouveau brin d'ADN. La phase de dénaturation est à 94°C et dure 30 secondes, la température de la phase d'hybridation dépend de la constitution des oligonucléotides (tableau 4) et sa durée était de 30 secondes. La phase d'élongation se fait à 72 °C et sa durée dépend de la longueur de l'ADN synthétisé (on calcule en moyenne 1 minute par 1000 paires de bases). Puisque tous nos essais résultaient en des fragments d'une longueur variant entre 311 et 694 paires de bases, nous avons toujours utilisé un temps d'élongation de 30 secondes. Suite à ces 25 cycles, il y a une étape finale d'élongation de 10 minutes à 72°C qui sert à terminer l'élongation de tous les brins dont la réplication avait été amorcée. Les produits de PCR ont été visualisés par migration sur gel d'agarose 1% (Sigma) préparé à l'aide de TBE (89 mM Tris (Bio-Rad), 89 mM acide borique (Sigma), 2 mM EDTA (Sigma)) auquel du bromure d'éthidium (Sigma) a été ajouté à une concentration finale de 0,5 μ g/ml. À 12 μ l de chaque échantillon, ont été ajoutés 2,5 μ l de colorant de migration 6X (New England Biolabs, Pickering, Ontario). Un marqueur de migration 100 bp ladder (New England Biolabs) a été utilisé comme indicateur de migration. Le gel a été soumis à l'électrophorèse à 100 V pendant 45 minutes. L'ADN séparé sur le gel a été visualisé et documenté par exposition aux ultraviolets à l'aide d'un transilluminateur Alpha Imager 1200 Documentation and Analysis System (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, USA).

6. Analyses densitométriques et statistiques

L'intensité des bandes obtenues par immunobuvardage et par RT-PCR a été estimée par analyse densitométrique. Les films ont été numérisés et la densitométrie de

chaque bande, représentant l'aire sous la courbe, a été évaluée avec ImageJ. Pour obtenir un niveau relatif d'expression pour une protéine d'intérêt ou un transcrit codant pour une protéine d'intérêt, nous avons normalisé avec l'expression de la β -actine en faisant un ratio des valeurs obtenues avec ImageJ. Pour obtenir un niveau relatif d'activation, comme par exemple dans le cas d'Akt-1, nous avons utilisé le ratio de la valeur correspondant à la protéine phosphorylée sur la valeur correspondant à la protéine totale multiplié par 100. Nous avons fixé à 100% le ratio correspondant au contrôle et les ratios d'activation des conditions expérimentales sont exprimés en pourcentage de contrôle. Sauf lorsque spécifié, les données obtenues représentent la moyenne \pm SEM d'au moins 3 expériences indépendantes, avec des échantillons différents. Le degré de significativité a été obtenu avec un test *t* de Student réalisé à l'aide du logiciel SigmaStat (Systat software, San Jose, CA, USA).

Tableau 4. Oligonucléotides utilisés pour analyses RT-PCR dans la présente étude

Gène d'intérêt	Séquence des amorces Sens	Séquence des amorces Anti-Sens	Longueur du fragment résultant (pb)	Température d'hybridation (T _m) (°C)
β-Actine	5'-TGAGGGGTCACCCACAGTGTGCCATCTA-3'	5'-CTAGAAGCATTTGCGGTGGACGATGGAGGG-3'	694	60
p85α	5'-ATTCTCAGCAGCCAGCTCTG-3'	5'-GAGAATCATTCGGTAGTGG-3'	332	55
p85β	5'-GGCGGCCGGCAGAAGAAAATCA-3'	5'-CGGTGCTCAGCGGGCGGCAG-3'	441	64
p55γ	5'-ATCAAACCTGACCTGATCCAG-3'	5'-AGTGCTTCACTTCCCATCG-3'	319	55
p110α	5'-ATAAACGAGAACGTGTGCCA-3'	5'-CCACCATGATGTGCATCATT-3'	311	50
p110β	5'-ACTGGCCAGCTCTCCACA-3'	5'-TTTCCCTGAGCGCCTCA-3'	375	51
p110δ	5'-ATCGAGCCATTGAGGAGTTC-3'	5'-GTCTTTGGAGCAGCTGAGCT-3'	377	52
p110γ	5'-CTGAATCACTGGCTCAAAGA-3'	5'-CAATGTCTTCTTTGCTTGT-3'	427	57

III – RÉSULTATS

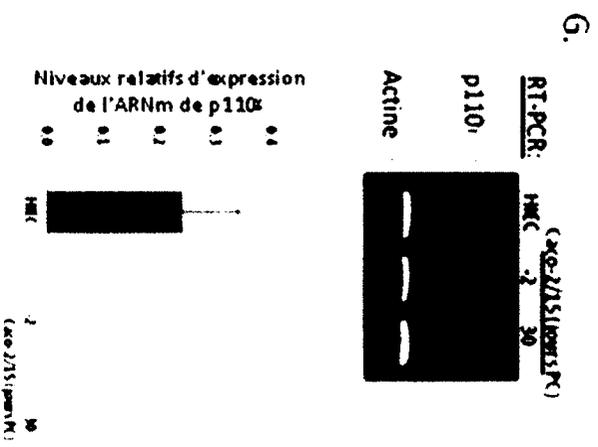
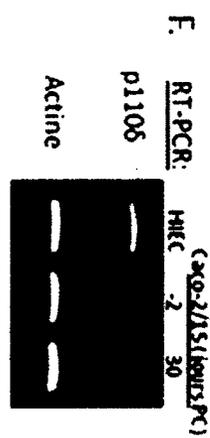
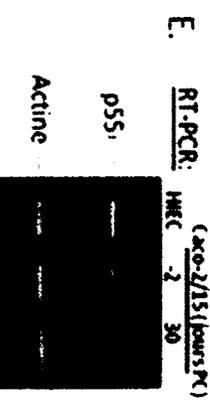
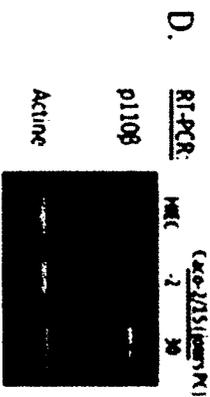
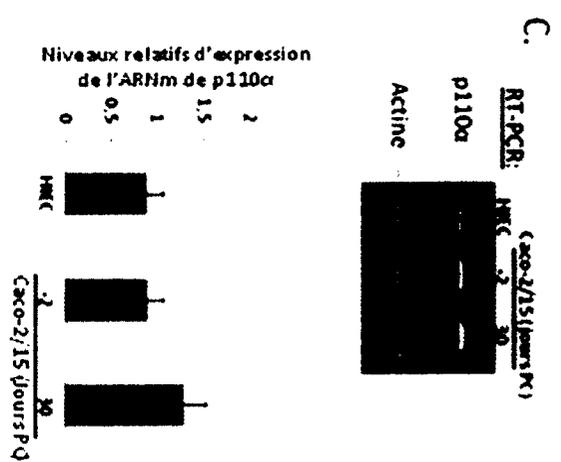
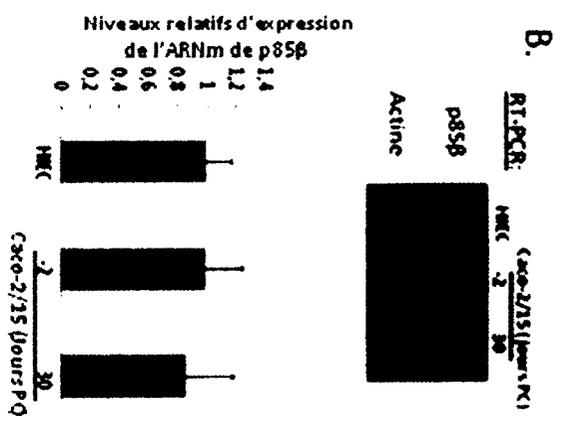
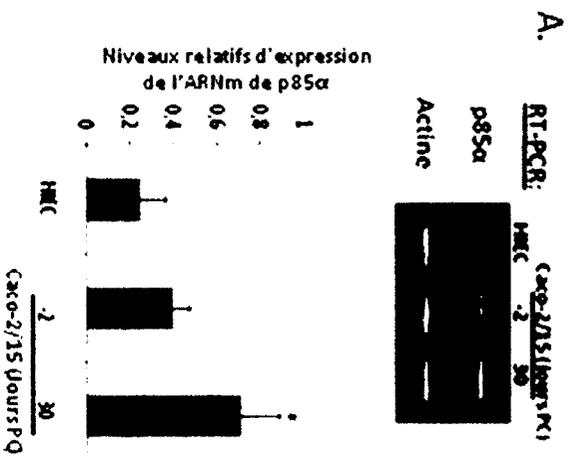
1. Profils d'expression des différents isoformes PI3-K (p85 et p110) selon l'état de différenciation

1.1 Profils d'expression transcriptionnelle

Nous avons déterminé de façon semi-quantitative l'expression des transcrits correspondants aux gènes PIK3R1, PIK3R2, PIK3R3, PIK3CA, PIK3CB, PIK3CD et PIK3CG chez les cellules HIEC et Caco-2/15 indifférenciés (-2 PC) et différenciés (30 PC). Ces gènes codent respectivement pour les protéines p85 α , p85 β , p55 γ , p110 α , p110 β , p110 δ et p110 γ . L'ARN total extrait des cellules a été soumis à une réaction de RT-PCR utilisant des paires d'amorces spécifiques à chaque gène (Tableau 2). Nous avons utilisé l'expression du transcrit ACTA1, codant pour l'actine, afin de normaliser l'expression de chaque transcrit étudié. Nous observons que l'ARNm de p85 α et p110 β est faiblement exprimée chez les cellules HIEC et les Caco-2/15 indifférenciés alors que chez les Caco-2/15 différenciés, cette expression est significativement plus élevée (Figure 6 A et D). L'expression de l'ARNm de p85 β et p110 α ne varie pas significativement entre les cellules HIEC, Caco-2/15 indifférenciées et différenciées (Figure 6 B et C). Nous observons également que l'ARNm de p55 γ est exprimé fortement chez les cellules HIEC et les Caco-2/15 indifférenciées alors que cette expression est significativement plus faible chez les Caco-2/15 différenciées (Figure 6 E). Pour ce qui est de l'ARNm de p110 δ et p110 γ , nous avons détecté les transcrits seulement chez les cellules HIEC alors qu'il y a absence d'expression chez les cellules Caco-2/15 indifférenciées et différenciées (Figure 6 F et G).

Figure 6. Profils d'expression transcriptionnelle des isoformes PI3-K (p85 et p110) chez les cellules épithéliales intestinales indifférenciées et différenciées.

A-G, panneaux du haut : RT-PCR effectué avec de l'ARN total extrait de cellules HIEC, Caco-2/15 indifférenciés (-2 PC) et différenciés (30 PC) et utilisant des amorces spécifiques aux ARNm suivants : p85 α (A), p85 β (B), p110 α (C), p110 β (D), p55 γ (E), p110 δ (F) et p110 γ (G). La détection de l'ARNm de l'actine a été faite pour des raisons de normalisation. A-G, panneaux du bas: Niveaux relatifs d'expression de l'ARNm des différents isoformes chez les cellules HIEC, Caco-2/15 indifférenciées et différenciées. L'intensité des signaux a été quantifiée par densitométrie et les niveaux relatifs d'expression ont été déterminés en normalisant l'expression d'un transcrite avec l'expression de l'actine correspondante. Les données représentent la moyenne \pm SEM pour au moins 3 ($n \geq 3$) expériences indépendantes utilisant des échantillons différents. La significativité a été déterminée par un test t de Student.



1.2 Profils d'expression protéique

Nous avons déterminé, par analyses d'immunobuvardage, l'expression protéique de p85 α , p85 β , p110 α et p110 β chez les HIEC et les Caco-2/15 à différents jours post-confluence (-2 PC, 0 PC, 5 PC, 10 PC, 20 PC et 30 PC). L'étude de l'expression de ces isoformes avec des séries de différenciation nous permet donc de vérifier l'expression de ces protéines autant chez des cellules indifférenciées que différenciées ainsi qu'au cours de la différenciation entérocytaire. Nous observons que les cellules HIEC n'expriment pas ou à peu près pas l'isoforme p85 α (Figure 7 A), tandis que les cellules Caco-2/15 l'expriment en quantité plus élevée, et que cette expression augmente au cours de la différenciation entérocytaire. De plus, les cellules différenciées expriment une quantité significativement plus élevée de p85 α comparativement aux cellules indifférenciées (Figure 7 A). Pour ce qui est de l'expression de p85 β , on en retrouve en quantité similaire chez les HIEC et les Caco-2/15, et cette expression reste relativement stable au cours de la différenciation entérocytaire (Figure 7 B). L'isoforme p110 α est également exprimée chez les HIEC et les Caco-2/15 mais cette expression est significativement plus élevée chez les cellules différenciées (Figure 7 C). Les cellules HIEC n'expriment pas ou à peu près pas p110 β tandis que les Caco-2/15 l'expriment en quantité plus élevée, et cette expression augmente au cours de la différenciation entérocytaire. Les cellules différenciées expriment donc une quantité significativement plus élevée de p110 β comparativement aux cellules indifférenciées (Figure 7 D).

2. Complexes isoformes prédominants selon l'état de différenciation

Nous avons déterminé par des essais d'immunoprécipitation suivis d'analyses par immunobuvardage, les degrés d'association entre les sous-unités catalytiques p110 α ou p110 β et les sous-unités régulatrices p85 α ou p85 β . Les essais ont été réalisés avec des

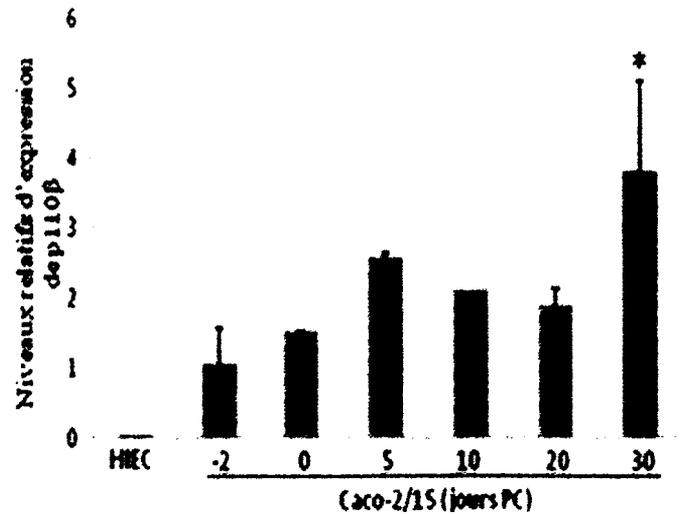
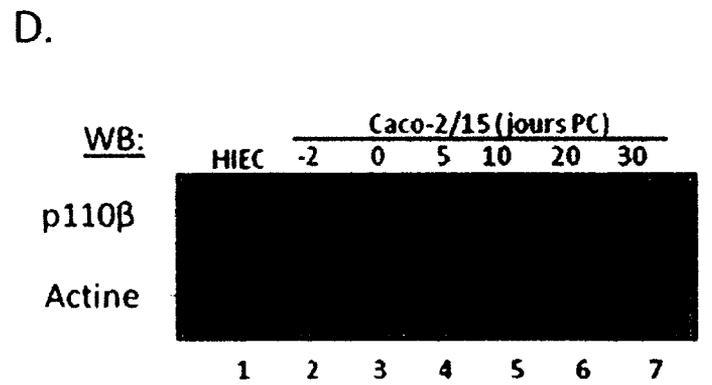
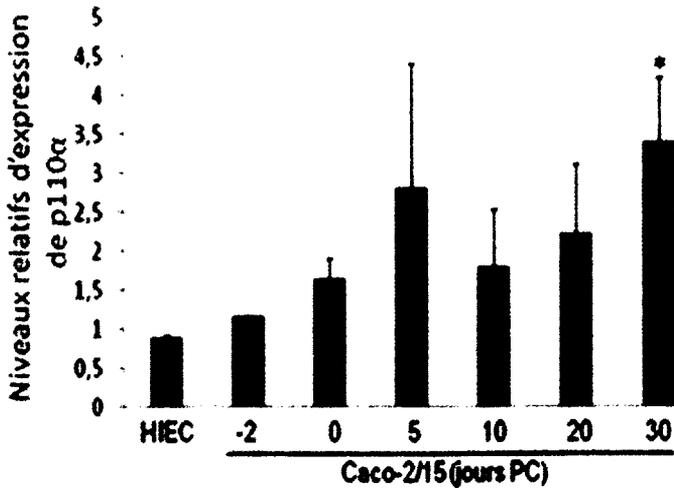
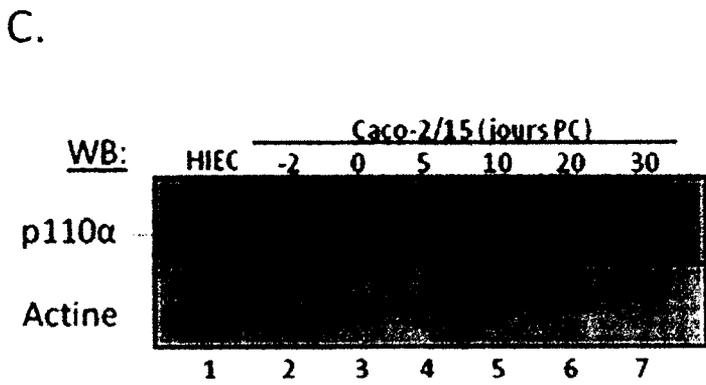
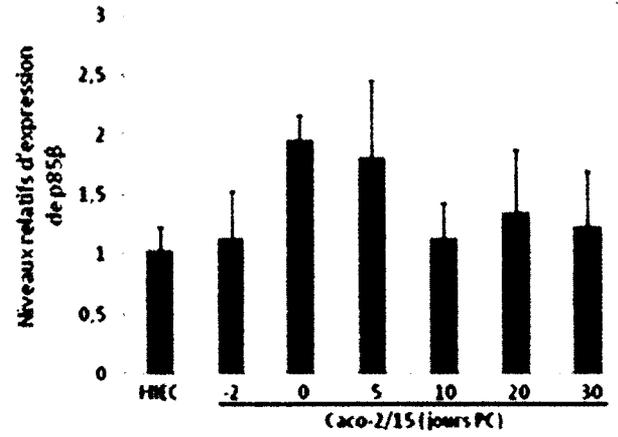
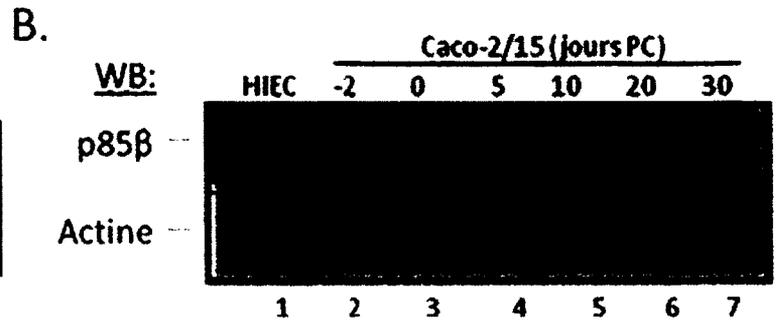
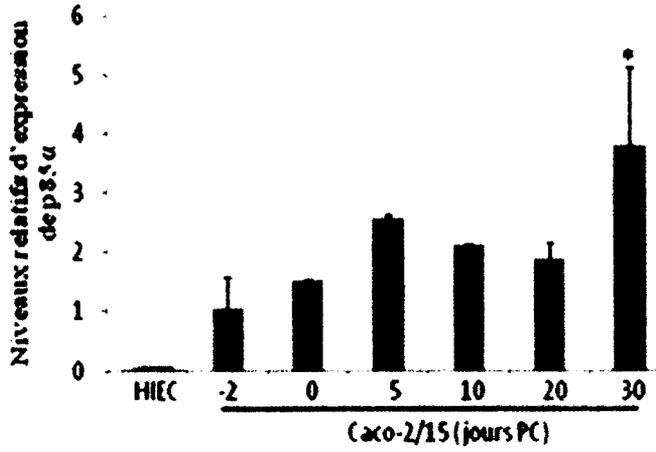
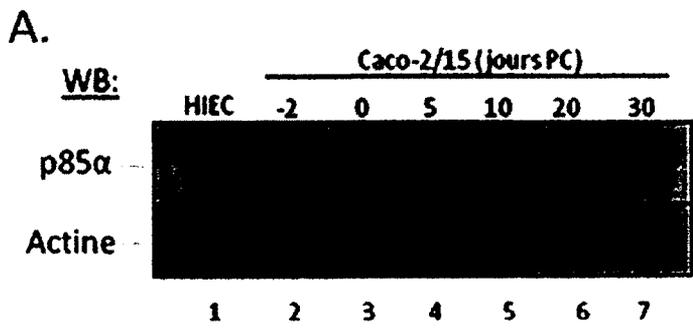
extraits de protéines de cellules HIEC, Caco-2/15 indifférenciées (-2 jours PC) et différenciées (30 jours PC). Le degré d'association a été déterminé en faisant le ratio de l'analyse densitométrique de la protéine co-immunoprécipitée sur la protéine immunoprécipitée. Nous observons que, lorsque nous immunoprécipitons la sous-unité régulatrice p85 α chez les cellules HIEC, la sous-unité catalytique p110 α , mais pas p110 β est associée à p85 α (Figure 8). Nous retrouvons le complexe isoforme p110 α /p85 α en prédominance chez les cellules Caco-2/15 indifférenciées alors qu'on retrouve de façon équivalente les complexes p110 α /p85 α et p110 β /p85 α chez les cellules Caco-2/15 différenciées (Figure 8 C).

Lorsque nous immunoprécipitons la sous-unité régulatrice p85 β , nous observons qu'il n'y a pas d'association de p110 α , ni de p110 β chez les cellules HIEC (Figure 9). Chez les cellules Caco-2/15 indifférenciées, il y a une faible présence des complexes p85 β /p110 α et p85 β /p110 β alors que chez les cellules Caco-2/15 différenciées, on retrouve en grande quantité autant les complexes p85 β /p110 α que p85 β /p110 β (Figure 9 C).

Comme nous l'avons montré à la figure 7A, les cellules HIEC expriment très faiblement p85 α . Pour cette raison, et aussi pour confirmer la réciprocité des résultats, nous avons procédé de façon inverse aux figures 10 et 11. Nous avons donc immunoprécipité les sous-unités catalytiques p110 α ou p110 β afin de déterminer quel est le complexe isoforme prédominant chez les cellules HIEC-6 et Caco-2/15 indifférenciées et différenciées. Lorsqu'on immunoprécipite p110 α , on retrouve p85 β mais pas p85 α associée à p110 α chez les cellules HIEC (Figure 10). Dans les cellules Caco-2/15 indifférenciées, on retrouve p85 β associée à p110 α de façon prédominante comparativement à p85 α tandis que chez les Caco-2/15 différenciées, on retrouve de façon équivalente les complexes p85 α /p110 α et p85 β /p110 α (Figure 10).

Figure 7. Profils d'expression protéique des isoformes PI3-K p85 α , p85 β , p110 α et p110 β chez les cellules épithéliales intestinales indifférenciées, différenciées ainsi qu'au cours de la différenciation entérocytaire.

A-D, panneaux du haut: Immunobuvardage représentatif de l'expression de p85 α (A), p85 β (B), p110 α (C) et p110 β (D) chez les cellules HIEC (ligne 1) et Caco-2/15 à différents jours post-confluence (-2 PC, 0 PC, 5 PC, 10 PC, 20 PC et 30 PC) (lignes 2 à 7). A-D, panneaux du bas : Niveaux relatifs d'expression des niveaux de p85 α détectés. L'intensité des signaux a été quantifiée par densitométrie et les niveaux relatifs d'expression ont été déterminés par le ratio de l'expression de la protéine immunodétectée avec l'actine correspondante. Les données représentent la moyenne \pm SEM pour au moins 3 ($n \geq 3$) expériences indépendantes utilisant des échantillons différents. La significativité des résultats a été déterminée par un test *t* de Student.



Il est à noter que lorsque nous avons immunoprécipité p110 α chez les Caco-2/15 différenciés (Figure 10B), nous avons dû considérer une exposition plus faible pour la détection de p85 β par immunobuvardage que pour les cellules indifférenciées étant donné la grande abondance du complexe p85 β /p110 α et la qualité plus faible de l'immunobuvardage résultant de l'immunoprécipitation avec notre anticorps anti-p110 α .

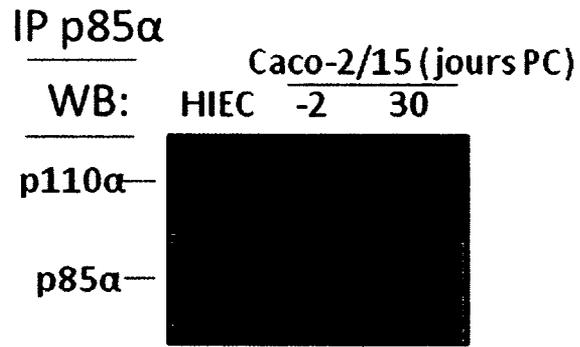
Lorsque l'on immunoprécipite p110 β , on ne retrouve pas d'association avec p85 α ou p85 β dans les cellules HIEC (Figure 11); alors que dans les cellules Caco-2/15 indifférenciées et différenciées, on retrouve de façon équivalente les complexes p85 α /p110 β et p85 β /p110 β (Figure 11).

En résumé, les cellules HIEC expriment de façon prédominante les complexes isoforme p85 α /p110 α et p85 β /p110 α alors qu'il y a absence de complexe contenant p110 β . Dans les cellules Caco-2/15 indifférenciées et différenciées, on retrouve toutes les combinaisons de complexes isoformes, soient p85 α /p110 α , p85 β /p110 α , p85 α /p110 β et p85 β /p110 β .

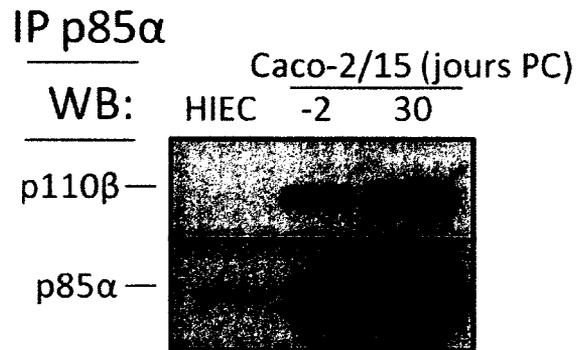
Figure 8. Niveaux relatifs d'association de p85 α avec p110 α et p110 β dans les cellules épithéliales intestinales indifférenciées et différenciées.

A,B : Analyses des protéines immunodétectées dans les cellules HIEC, Caco-2/15 indifférenciées et différenciées. Suite à une immunoprécipitation utilisant un anticorps dirigé contre p85 α , les complexes PI3-K sont détectés avec un anticorps spécifique dirigé contre p85 α (A,B), p110 α (A) ou p110 β (B). C : Graphique représentant les niveaux relatifs d'association de p85 α avec p110 α et p110 β . L'intensité des signaux a été quantifiée par densitométrie et les niveaux relatifs d'association ont été déterminés par le ratio de l'expression de la protéine co-immunoprécipitée sur l'expression de la protéine immunoprécipitée. Les données représentent la moyenne \pm SEM pour au moins 3 ($n \geq 3$) expériences indépendantes utilisant des échantillons différents.

A.



B.



C.

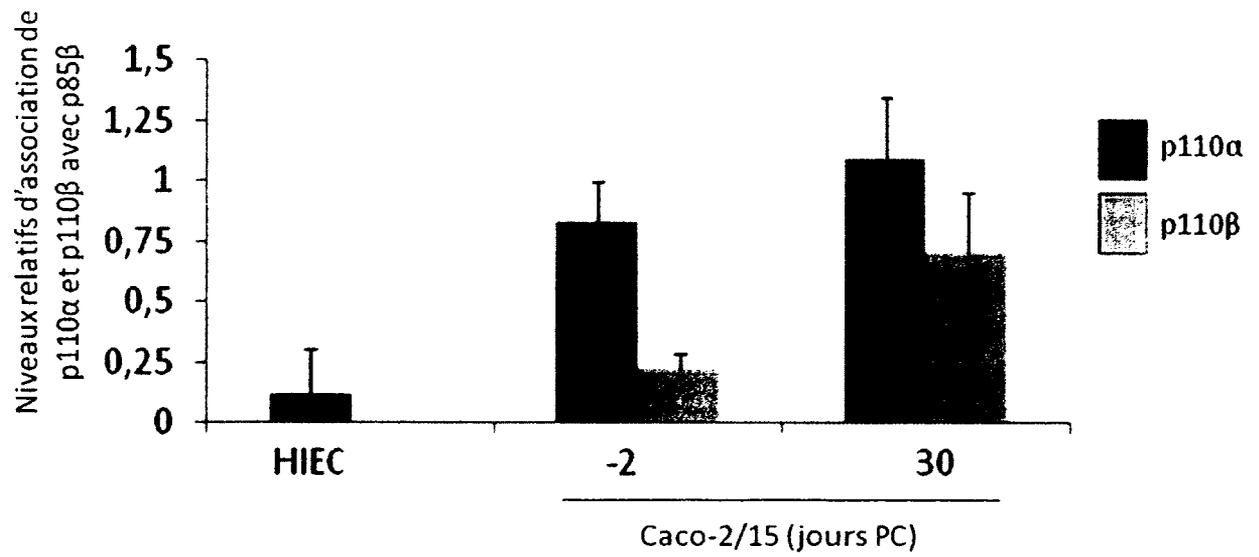


Figure 9. Niveaux relatifs d'association de p85 β avec p110 α et p110 β dans les cellules épithéliales intestinales indifférenciées et différenciées.

A,B : Analyses des protéines immunodétectées dans les cellules HIEC, Caco-2/15 indifférenciées et différenciées. Suite à une immunoprécipitation utilisant un anticorps dirigé contre p85 β , les complexes PI3-K sont détectés avec un anticorps spécifique à p85 β (A,B), p110 α (A) ou p110 β (B). C : Graphique représentant les niveaux relatifs d'association de p85 β avec p110 α et p110 β . L'intensité des signaux a été quantifiée par densitométrie et les niveaux relatifs d'association ont été déterminés par le ratio de l'expression de la protéine co-immunoprécipitée sur l'expression de la protéine immunoprécipitée. Les données représentent la moyenne \pm SEM pour au moins 3 ($n \geq 3$) expériences indépendantes utilisant des échantillons différents.

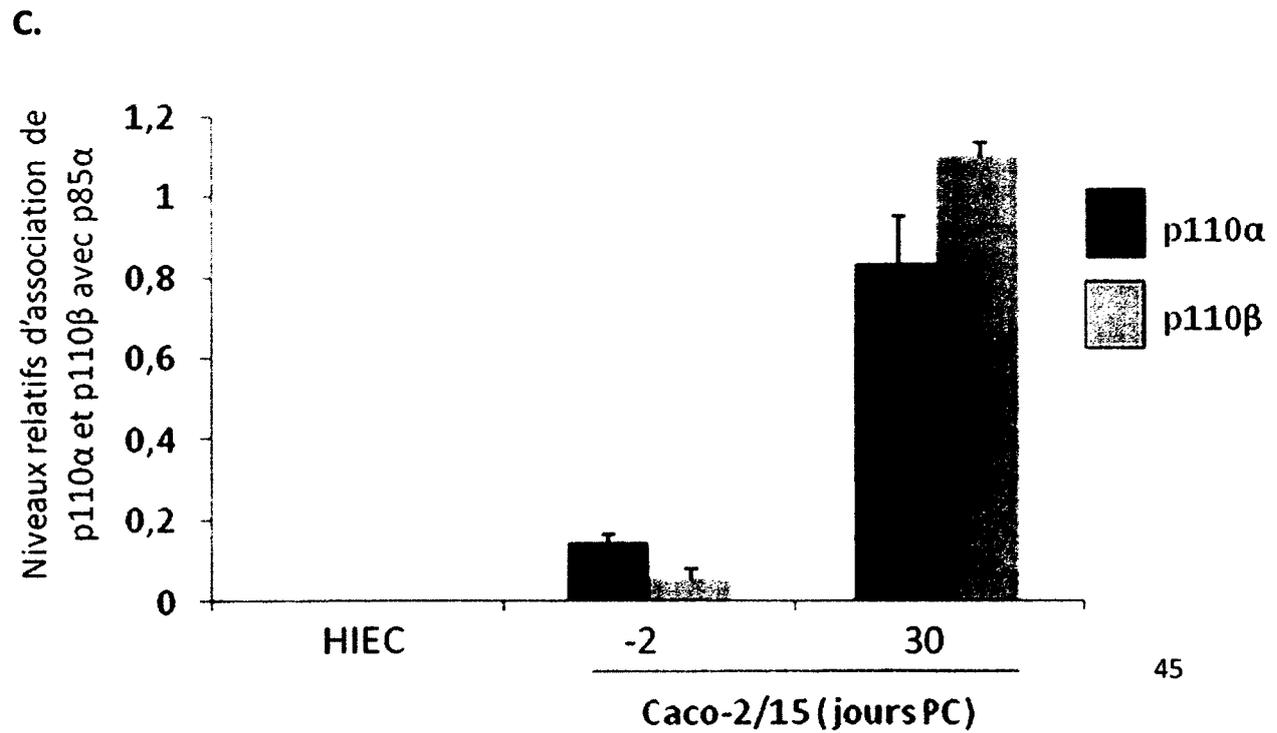
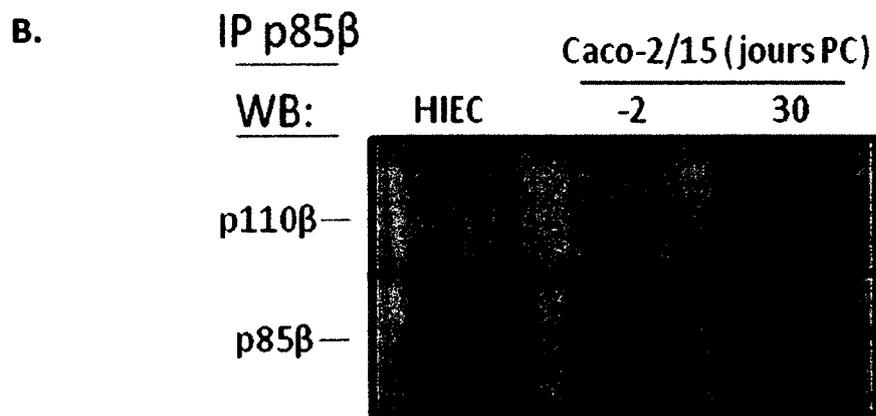
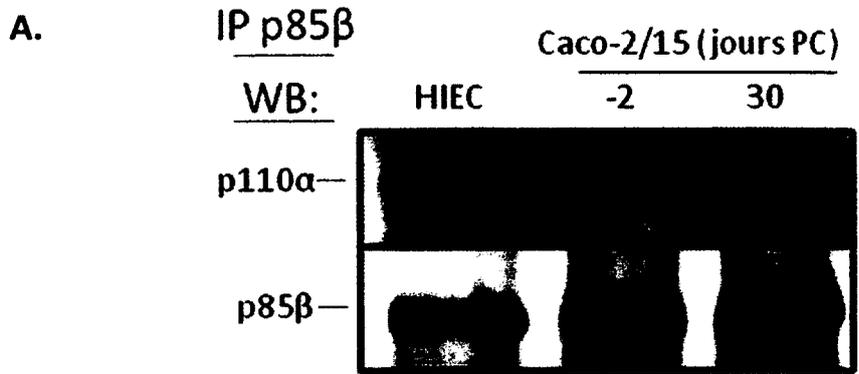
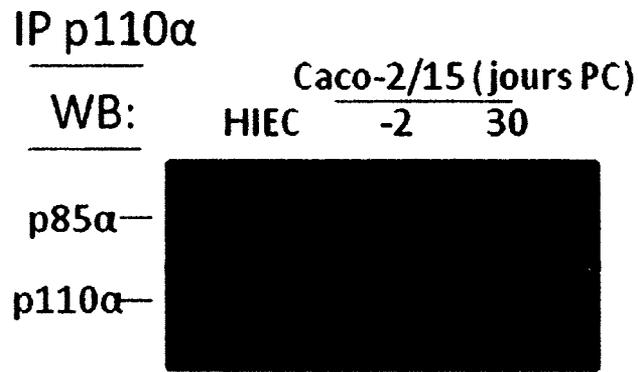


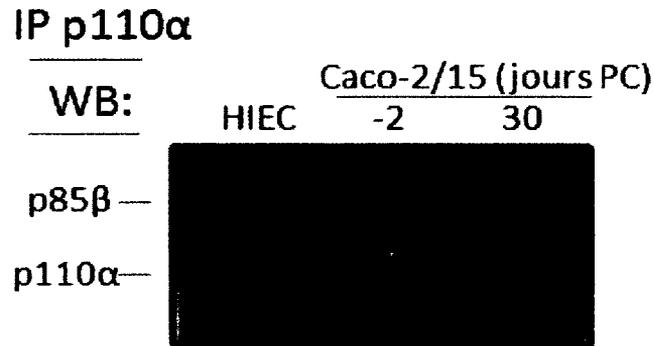
Figure 10. Niveaux relatifs d'association de p110 α avec p85 α et p85 β dans les cellules épithéliales intestinales indifférenciées et différenciées.

A,B : Analyses des protéines immunodétectées dans les cellules HIEC, Caco-2/15 indifférenciées et différenciées. Suite à une immunoprécipitation utilisant un anticorps dirigé contre p110 α les complexes PI3-K sont détectés avec un anticorps spécifique à p110 α (A,B), p85 α (A) ou p85 β (B). C : Graphique représentant les niveaux relatifs d'association de p110 α avec p85 α et p85 β . L'intensité des signaux a été quantifiée par densitométrie et les niveaux relatifs d'association ont été déterminés par le ratio de l'expression de la protéine co-immunoprécipitée sur l'expression de la protéine immunoprécipitée. Les données représentent la moyenne \pm SEM pour au moins 3 ($n \geq 3$) expériences indépendantes utilisant des échantillons différents.

A.



B.



C.

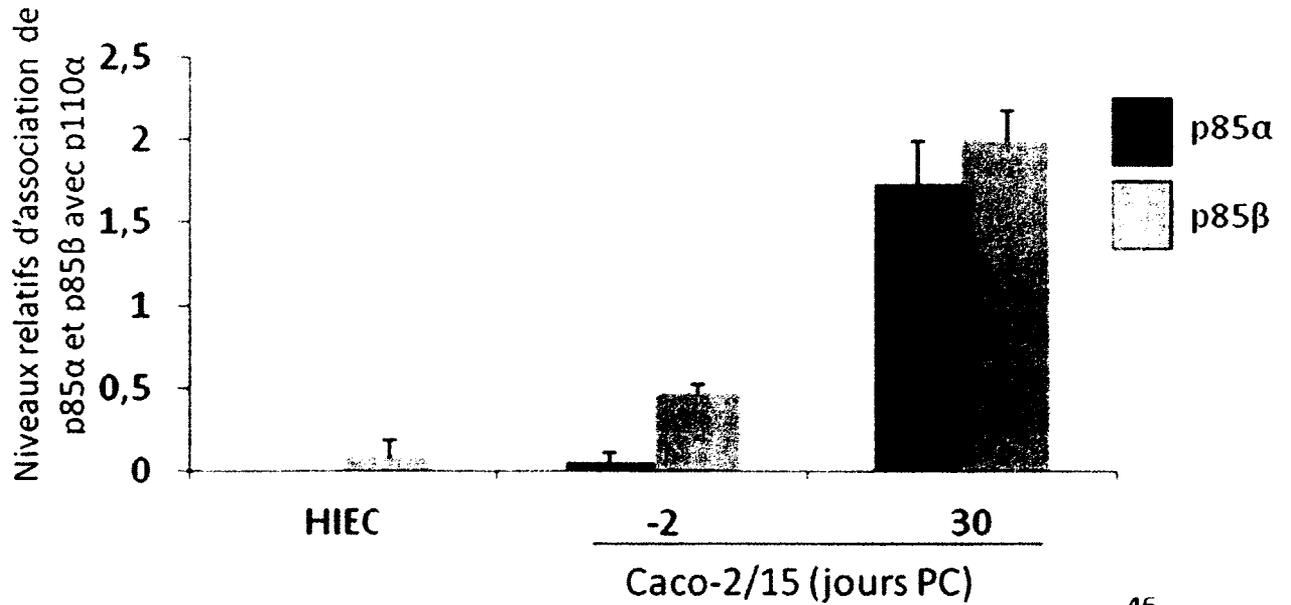
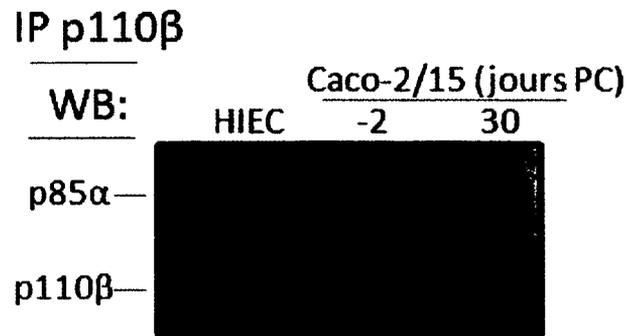


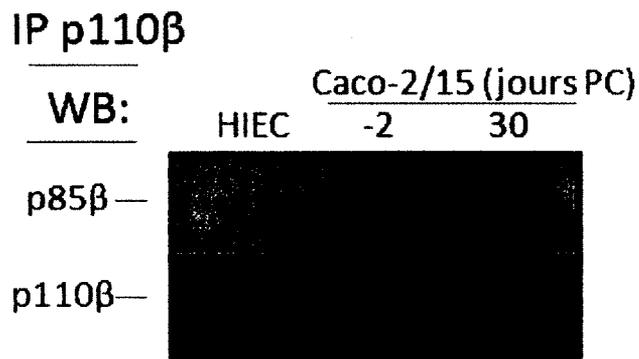
Figure 11. Niveaux relatifs d'association de p110 β avec p85 α et p85 β dans les cellules épithéliales intestinales indifférenciées et différenciées.

A,B : Analyses des protéines immunodétectées dans les cellules HIEC, Caco-2/15 indifférenciées et différenciées. Suite à une immunoprécipitation utilisant un anticorps dirigé contre p110 β , les complexes PI3-K sont détectées avec un anticorps spécifique à p110 β (A, B), p85 α (A) ou p85 β (B). C : Graphique représentant les niveaux relatifs d'association de p110 β avec p85 α et p85 β . L'intensité des signaux a été quantifiée par densitométrie et les niveaux relatifs d'association ont été déterminés par le ratio de l'expression de la protéine co-immunoprécipitée sur l'expression de la protéine immunoprécipitée. Les données représentent la moyenne \pm SEM pour au moins 3 ($n \geq 3$) expériences indépendantes utilisant des échantillons différents.

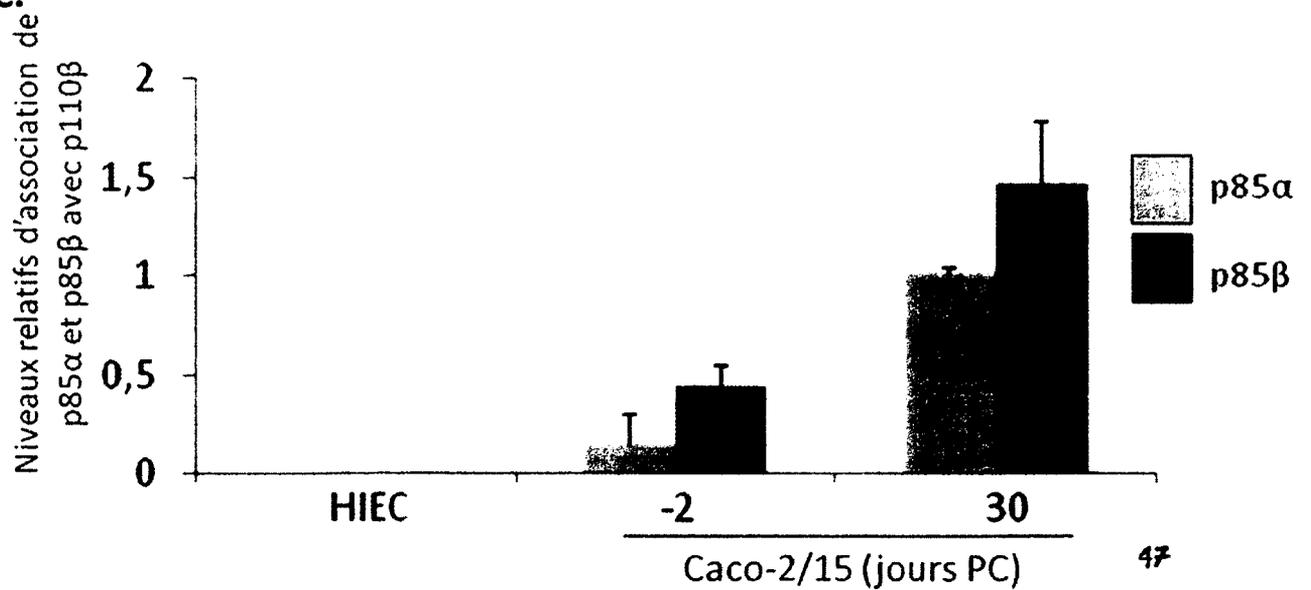
A.



B.



C.



3. Complexes isoformes prédominants dans la signalisation PI3-K/Fak, selon l'état de différenciation

Nous avons déterminé par des essais d'immunoprécipitation suivies d'analyses par immunobuvardage, les niveaux d'association entre les sous-unités régulatrices ou catalytiques, p85 α , p85 β , p110 α , p110 β et la kinase p125^{Fak}. Les essais ont été réalisés avec des extraits de protéines de cellules HIEC et Caco-2/15 indifférenciées (-2 jours PC) et différenciées (30 jours PC). Dans le but d'identifier quels sont les complexes isoformes prédominants dans la signalisation PI3-K/Fak selon l'état de différenciation, les cellules ont été traitées pendant 24 h dans un milieu sans sérum (condition contrôle), en suspension ou en présence de PP2 (20 μ M). Le niveau d'association a été déterminé en faisant le ratio de l'analyse densitométrique de la protéine co-immunoprécipitée sur la protéine immunoprécipitée. Nous observons que, lorsque nous immunoprécipitons p125^{Fak}, nous ne retrouvons pas d'association avec p85 α chez les cellules indifférenciées HIEC et Caco-2/15 -2 jours PC tandis que chez les cellules Caco-2/15 différenciées, il y a une association entre p85 α et p125^{Fak} (Figure 12). Aussi, nous observons une perte significative de cette association lorsqu'on inhibe Src et lorsque les cellules sont mises en suspension mimant ainsi les conditions d'anoïkose (Figure 12 B) (Vachon et al., 2002).

Lorsque nous immunoprécipitons p125^{Fak}, nous détectons la présence de p125^{Fak} associé au complexe PI3-K comportant p85 β chez nos cellules étudiées peu importe l'état de différenciation (Figure 13A). Aussi, chez les cellules indifférenciées, soit les HIEC et les Caco-2/15 -2 jours PC, nous observons une chute significative de l'association de p85 β avec p125^{Fak} lors de l'inhibition de Src et aussi en condition d'anoïkose. Cependant, chez les Caco-2/15 différenciées, cette chute significative d'association ne survient qu'en condition d'anoïkose, mais pas lors de l'inhibition de Src (Figure 13B).

Pour l'étude de l'association de p110 α avec p125^{Fak}, nous avons dû procéder de façon inverse pour des raisons techniques. L'anticorps anti-p110 α réagissait trop faiblement lorsque utilisé pour détecter une protéine co-immunoprécipitée. Nous avons donc immunoprécipité la sous-unité p110 α et avons détecté son association avec p125^{Fak}.

De façon similaire à l'association entre p125^{Fak} et p85 β , l'association entre p110 α et p125^{Fak} est retrouvée chez les cellules étudiées peu importe l'état de différenciation (Figure 14A). Dans les cellules HIEC et les Caco-2/15 -2 jours PC, cette association chute de façon significative lors de l'inhibition de Src par PP2 et en condition d'anoïkose. Cependant, dans les Caco-2/15 différenciées, cette chute significative d'association de p110 α avec p125^{Fak} ne survient qu'en condition d'anoïkose, mais pas lors de l'inhibition de Src (Figure 14B).

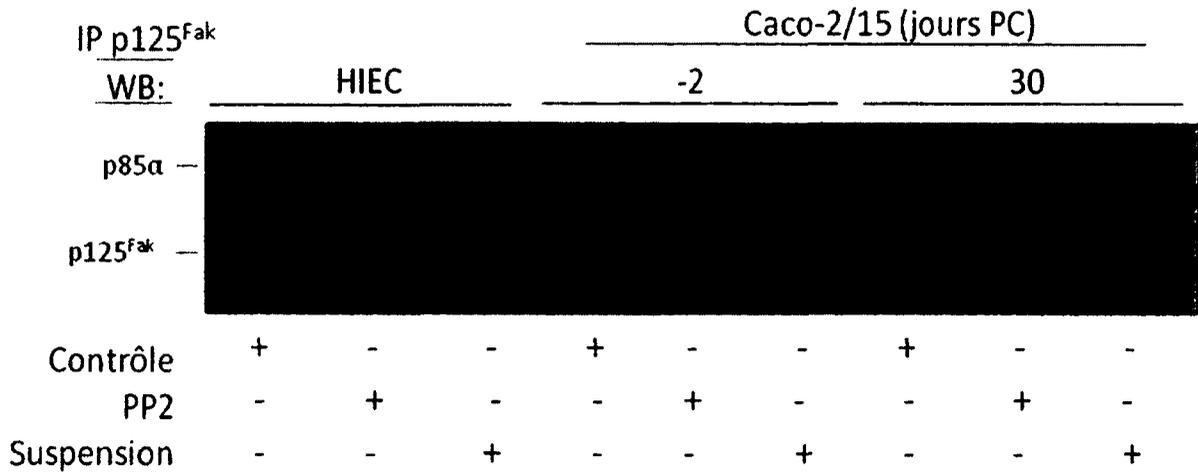
Lorsque nous immunoprécipitons p125^{Fak}, nous détectons la présence de p125^{Fak} associé au complexe PI3-K comportant p110 β chez les cellules Caco-2/15 peu importe l'état de différenciation mais pas chez les cellules HIEC (Figure 15 A). Chez les cellules Caco-2/15 indifférenciées, l'association entre p110 β et p125^{Fak} chute de façon significative lors de l'inhibition de Src et en condition d'anoïkose. Cependant, chez les Caco-2/15 différenciées, l'association de p110 β et p125^{Fak} chute de façon significative seulement lors de l'inhibition de Src, mais pas en condition d'anoïkose.

En résumé, dans les cellules HIEC, les sous-unités de PI3-K p85 β et p110 α sont associés aux cassettes de signalisation Fak alors que p85 α et p110 β n'y sont pas associées. Aussi, l'engagement de p85 β et p110 α aux cassettes de signalisation Fak est adhésion- et Src-dépendante. Ainsi, dans les cellules Caco-2/15 indifférenciées, on retrouve p85 β , p110 α et p110 β associées aux cassettes de signalisation Fak alors que p85 α n'y est pas associées. Aussi, l'engagement de p85 β , p110 α et p110 β aux cassettes de signalisation Fak est adhésion et Src-dépendante. Finalement, dans les Caco-2/15 différenciées, tous les isoformes étudiés sont retrouvés en association avec les cassettes de signalisation Fak. L'engagement de p85 α aux cassettes de signalisation Fak est adhésion- et Src-dépendante. L'engagement de p85 β et p110 α est adhésion-dépendante alors qu'elle est Src-indépendante. L'engagement de p110 β est Src-dépendante mais est adhésion-indépendante.

Figure 12. Niveaux relatifs d'association de p85 α avec p125^{Fak} selon la signalisation Fak/Src dans les cellules épithéliales intestinales indifférenciées et différenciées.

Les cellules ont été traitées à l'aide de l'inhibiteur de Src, PP2 (20 μ M), ou une mise en suspension, pendant 24 heures en absence de sérum. A : Analyses des protéines immunodéetectées chez les cellules HIEC, Caco-2/15 indifférenciées et différenciées. Suite à une immunoprécipitation utilisant un anticorps dirigé contre p125^{Fak}, les complexes sont détectés avec un anticorps spécifique à p85 α ou p125^{Fak}. B : Graphique représentant les niveaux relatifs d'association de p125^{Fak} avec p85 α . L'intensité des signaux a été quantifiée par densitométrie et les niveaux relatifs d'association ont été déterminés par le ratio de l'expression de la protéine co-immunoprécipitée sur l'expression de la protéine immunoprécipitée. Les données représentent la moyenne \pm SEM pour au moins 3 ($n \geq 3$) expériences indépendantes utilisant des échantillons différents. La significativité des résultats à été déterminée par un test *t* de Student.

A.



B.

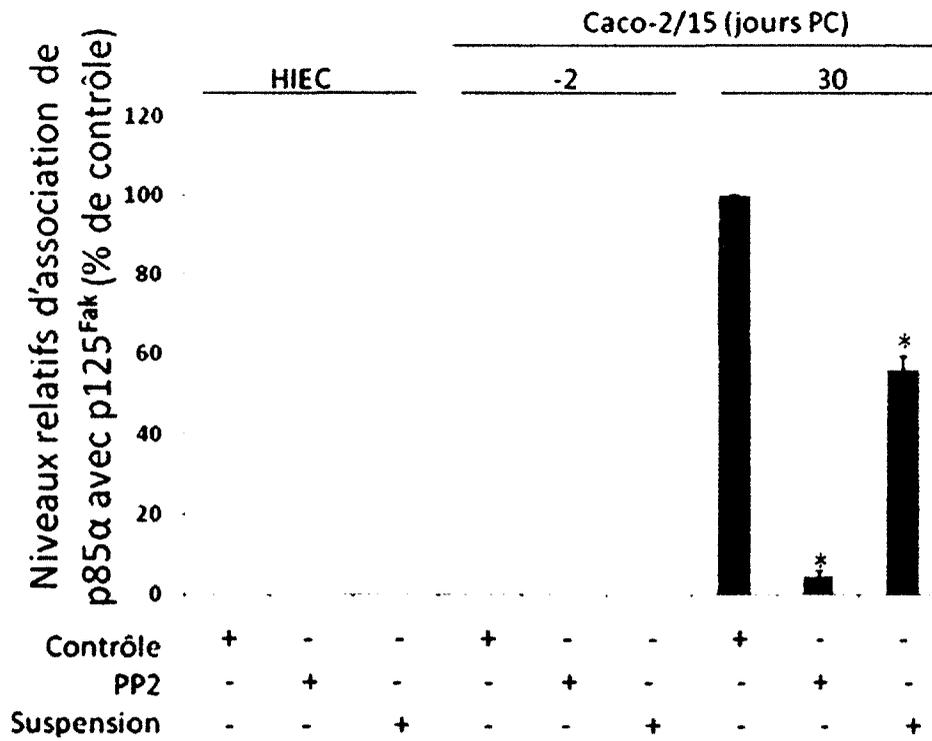
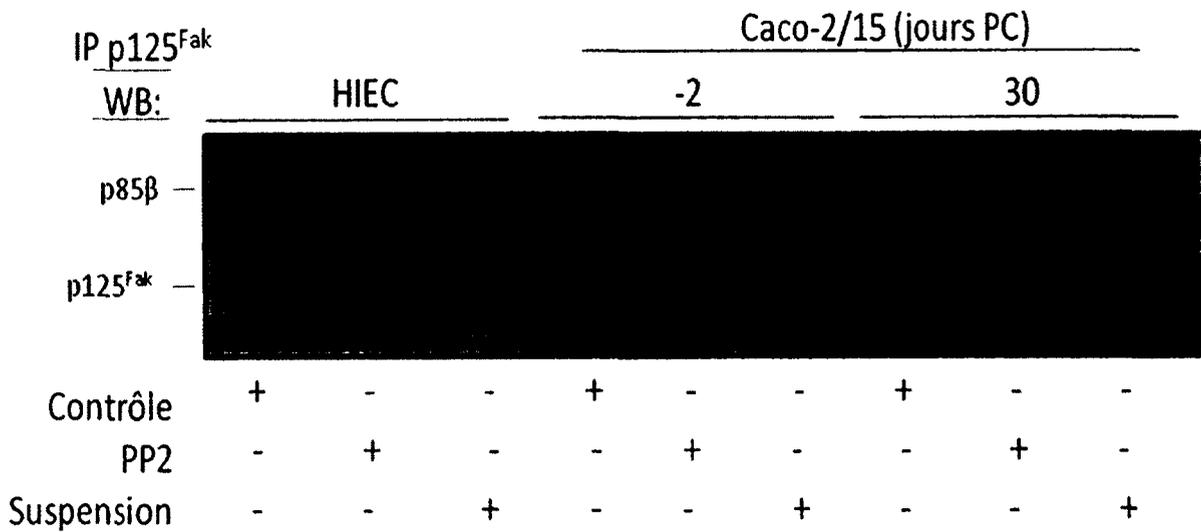


Figure 13. Niveaux relatifs d'association de p85 β avec p125^{Fak} selon la signalisation Fak/Src dans les cellules épithéliales intestinales indifférenciées et différenciées.

Les cellules ont été traitées à l'aide de l'inhibiteur de Src, PP2 (20 μ M) ou une mise en suspension, pendant 24 heures en absence de sérum. A : Analyses des protéines immunodétectées dans les cellules HIEC, Caco-2/15 indifférenciées et différenciées. Suite à une immunoprécipitation utilisant un anticorps dirigé contre p125^{Fak}, les complexes sont détectés avec un anticorps spécifique à p85 β ou p125^{Fak}. B : Graphique représentant les niveaux relatifs d'association de p125^{Fak} avec p85 β . L'intensité des signaux a été quantifiée par densitométrie et les niveaux relatifs d'association ont été déterminés par le ratio de l'expression de la protéine co-immunoprécipitée sur l'expression de la protéine immunoprécipitée. Les données représentent la moyenne \pm SEM pour au moins 3 ($n \geq 3$) expériences indépendantes utilisant des échantillons différents. La significativité des résultats a été déterminée par un test *t* de Student.

A.



B.

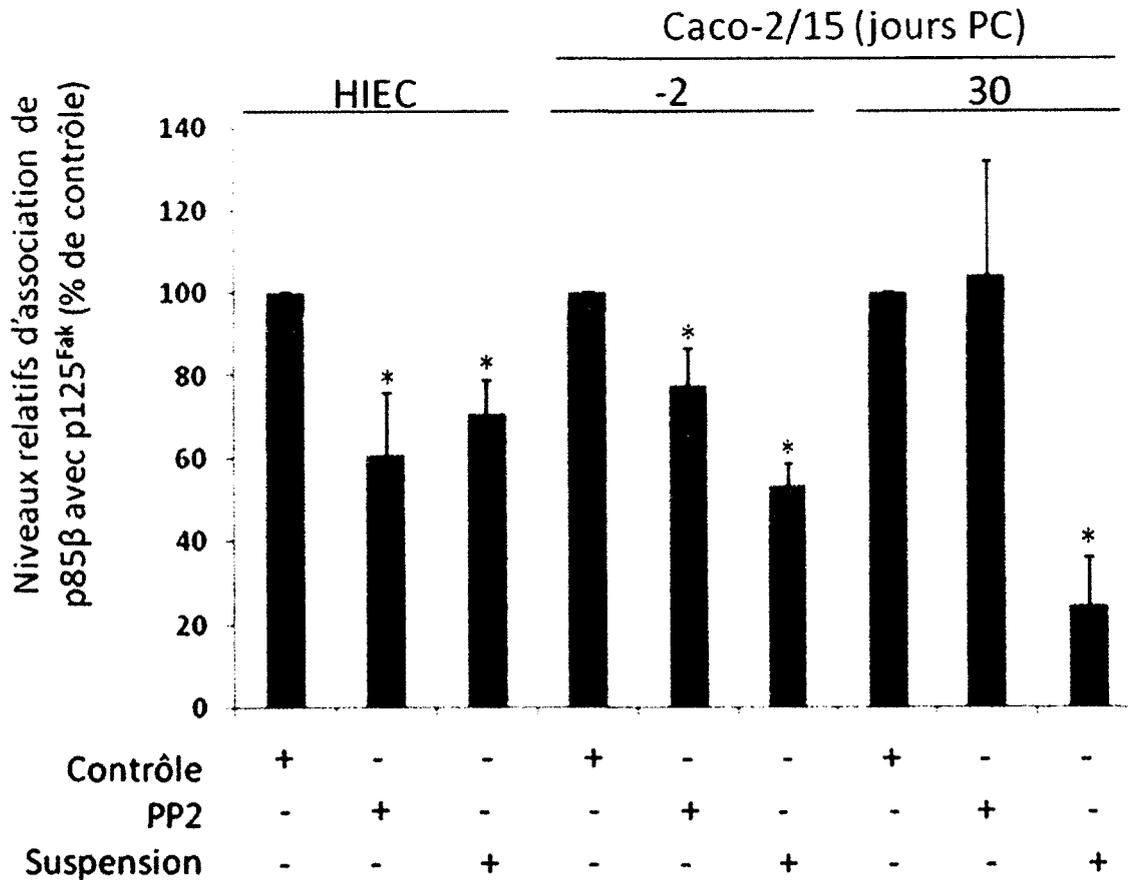
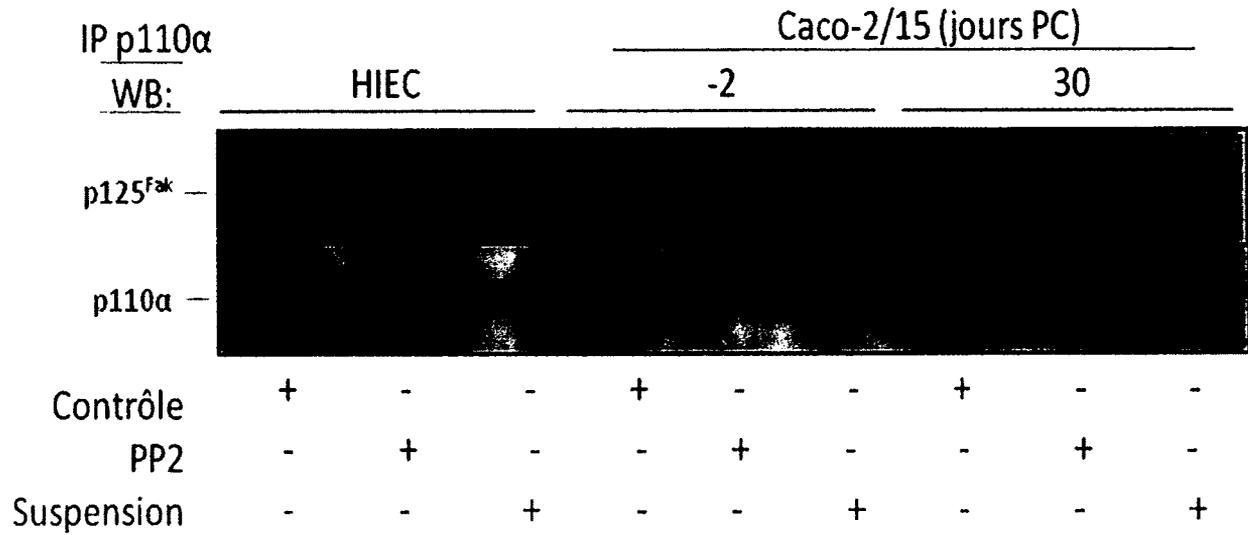


Figure 14. Niveaux relatifs d'association de p125^{Fak} avec p110 α selon la signalisation Fak/Src dans les cellules épithéliales intestinales indifférenciées et différenciées.

Les cellules ont subi un traitement avec le PP2 (20 μ M), un inhibiteur de Src, ou une mise en suspension, pendant 24 heures en absence de sérum. A : Analyses des protéines immunodétectées dans les cellules HIEC, Caco-2/15 indifférenciées et différenciées. Suite à une immunoprécipitation utilisant un anticorps dirigé contre p110 α , les complexes sont détectés avec un anticorps spécifique dirigé contre p110 α ou p125^{Fak}. B : Graphique représentant les niveaux relatifs d'association de p125^{Fak} avec p110 α . L'intensité des signaux a été quantifiée par densitométrie et les niveaux relatifs d'association ont été déterminés par le ratio de l'expression de la protéine co-immunoprécipitée sur l'expression de la protéine immunoprécipitée. Les données représentent la moyenne \pm SEM pour au moins 3 ($n \geq 3$) expériences indépendantes utilisant des échantillons différents. La significativité des résultats a été déterminée par un test *t* de Student.

A.



B.

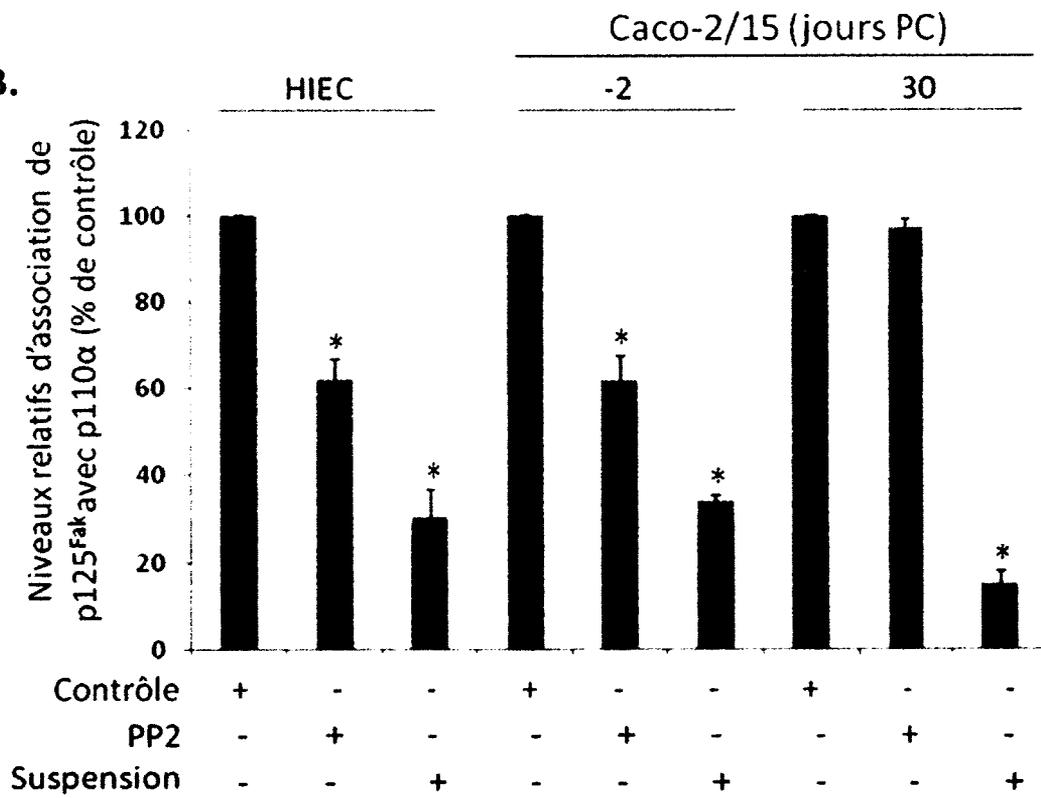
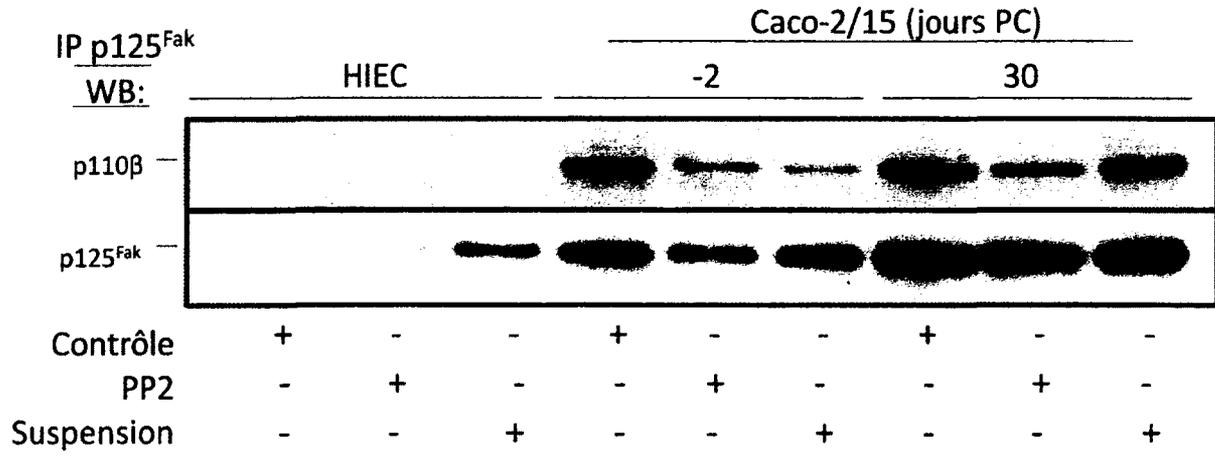


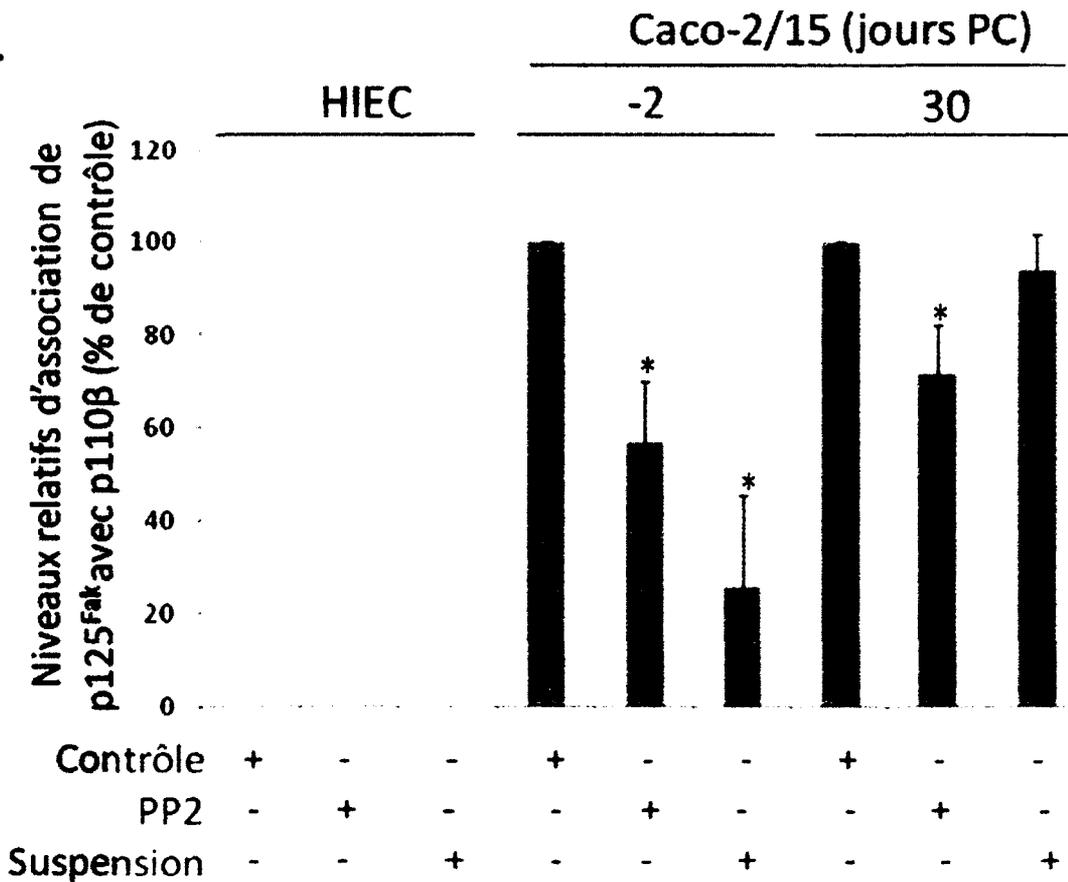
Figure 15. Niveaux relatifs d'association de p110 β avec p125^{Fak} selon la signalisation Fak/Src dans les cellules épithéliales intestinales indifférenciées et différenciées.

Les cellules HIEC et Caco-2/15 indifférenciées et différenciées ont subi un traitement avec le PP2 (20 μ M) ou une mise en suspension, pendant 24 heures en absence de sérum. A : Immunobuvardage représentatif dans les cellules HIEC, Caco-2/15 indifférenciées et différenciées. Suite à une immunoprécipitation utilisant un anticorps dirigé contre p125^{Fak}, les complexes sont détectés avec un anticorps spécifique à p110 β ou p125^{Fak}. B : Graphique représentant les niveaux relatifs d'association de p125^{Fak} avec p110 β . L'intensité des signaux a été quantifiée par densitométrie et les niveaux relatifs d'association ont été déterminés par le ratio de l'expression de la protéine co-immunoprécipitée sur l'expression de la protéine immunoprécipitée. Les données représentent la moyenne \pm SEM pour au moins 3 ($n \geq 3$) expériences indépendantes utilisant des échantillons différents. La significativité des résultats a été déterminée par un test *t* de Student.

A.



B.



4. Rôles des isoformes p110 dans la survie entérocytaire humaine

4.1 Rôles des isoformes p110 dans la survie

Nous avons vérifié l'impact de l'inhibition de p110 α ou p110 β par des inhibiteurs pharmacologiques sélectifs sur la survie des cellules HIEC-6, Caco-2/15 indifférenciées (-2 jours PC) et différenciées (30 jours PC). La concentration des inhibiteurs, appropriée pour induire l'apoptose chez nos cellules étudiées, a été préalablement déterminée par des essais dose-réponse (Figure 16). Nous nous sommes d'abord basés sur les recommandations du fabricant de l'inhibiteur, puis nous avons testé une concentration croissante jusqu'à 5 μ M. Nous avons utilisé la concentration appropriée où le taux d'apoptose atteignait un plateau (Figure 16). Il a été démontré que le TGX-221 cible principalement l'isoforme p110 β , mais qu'il peut avoir un certain effet sur les autres isoformes, dépendamment de la concentration utilisée. Lors d'essais *in vitro*, la concentration de TGX-221 requise pour inhiber de 50% l'activité PI3-kinase de p110 δ (IC₅₀) est 20 fois plus élevée que pour inhiber celle de p110 β . De plus, l'IC₅₀ pour p110 α est 1000 fois plus élevée que pour p110 β (Cosemans et al., 2006 ; Chaussade et al., 2007). Nous savons que lors d'essais en culture cellulaire, l'inhibiteur doit être utilisé un peu plus concentré pour avoir le même effet qu'*in vitro* dû à la nature même de la cellule. En effet, il y a une certaine quantité du composé qui ne pénétrera pas la membrane de la cellule, et il y a aussi de nombreuses sources d'interférences à l'intérieur de la cellule. Étant donné ce degré de sélectivité et aussi du fait que p110 δ n'est pas l'isoforme exprimée en majorité dans notre modèle, nous avons considéré que cet effet de réactivité croisée de ce composé était négligeable.

Nous avons donc utilisé le Pik-75 (1 μ M chez les HIEC-6, 2 μ M chez les Caco-2/15) qui inhibe sélectivement p110 α et le TGX-221 (1 μ M chez les HIEC-6, 2 μ M chez les Caco-2/15) qui inhibe sélectivement p110 β . À titre de contrôle positif, nous avons aussi utilisé un traitement au LY294002 (30 μ M), un inhibiteur général de la PI3-K. Comme nous l'avons montré dans le passé, cet inhibiteur induit l'apoptose dans les cellules que nous étudions (Gauthier et al, 2001; Laprise et al, 2002). L'induction de

l'apoptose à été visualisée par ISEL. Nous observons que, dans les cellules HIEC-6, les traitements par le LY294002 (30 μ M) et le Pik-75 (1 μ M) induisent une hausse significative de l'apoptose par rapport au contrôle sans sérum (Figure 17 et 18). Cependant, l'inhibition de la sous-unité p110 β par le TGX221 n'a pas induit l'apoptose chez les cellules HIEC (Figure 17 et 18).

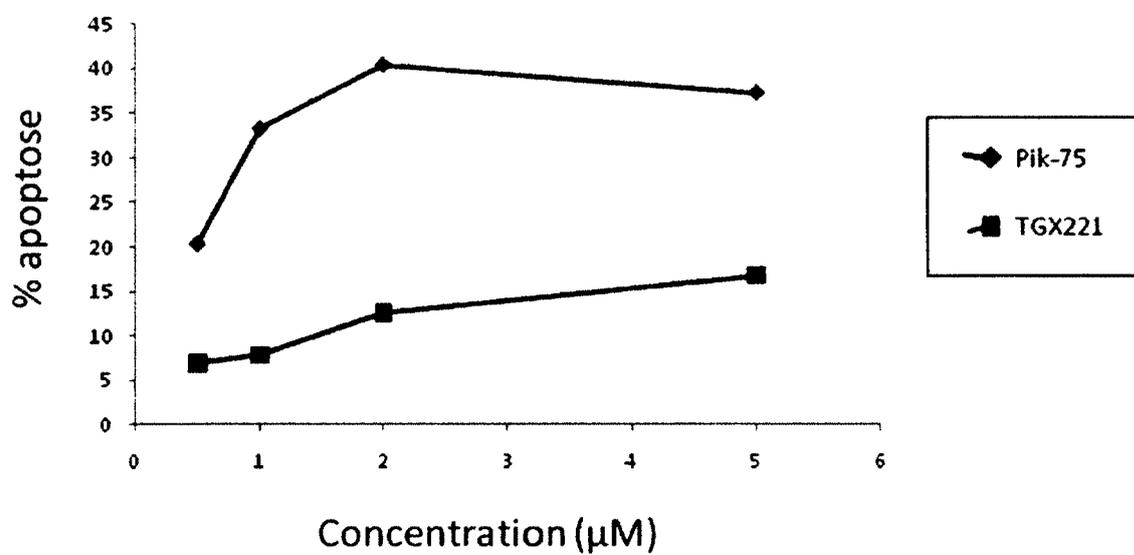
Dans les cellules Caco-2/15 indifférenciées, nous observons qu'il y a une induction significative d'apoptose avec les traitements par le LY294002 (30 μ M) et le Pik-75 (2 μ M) comparativement au contrôle sans sérum (Figure 19 et 20). Cependant, le traitement au TGX221 (2 μ M) n'a pas induit d'augmentation du taux d'apoptose des cellules Caco-2/15 indifférenciées (Figure 19 et 20). À l'opposé, les cellules Caco-2/15 différenciées traitées à l'aide de LY294002, un inhibiteur de PI3-K ainsi que l'inhibition sélective de p110 α (Pik-75) et de p110 β (TGX221) ont induit une hausse significative du taux d'apoptose comparativement au contrôle sans sérum (Figure 21 et 22).

En résumé, dans les cellules HIEC et les cellules Caco-2/15 indifférenciées et différenciées, l'isoforme p110 α est requis pour la survie. L'isoforme p110 β , est important pour la survie seulement des cellules Caco-2/15 différenciées alors qu'il est de moindre importance pour la survie des cellules HIEC et Caco-2/15 indifférenciées. La PI3-K, comme nous nous y attendions, est requise pour la survie des cellules HIEC et des cellules Caco-2/15 peu importe leur état de différenciation.

Figure 16. Établissement de la concentration effective pour inhiber p110 α et p110 β à l'aide de Pik-75 et TGX221.

Les cellules HIEC (A) et Caco-2/15 (B) ont subi un traitement de 24 h en absence de sérum et en présence de Pik-75 en concentration de 0,5 μ M à 5 μ M ou de TGX221 en concentration de 0,5 μ M à 5 μ M. Le % d'apoptose a été déterminé par essais TUNEL *in situ*.

A.



B.

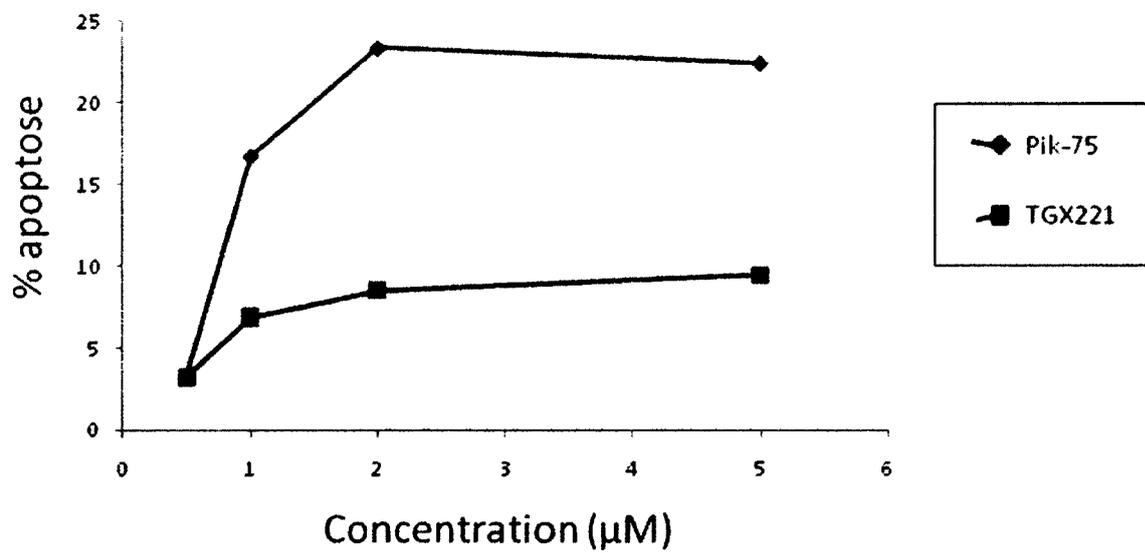
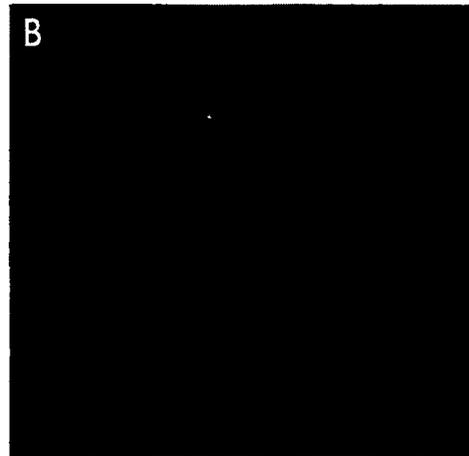
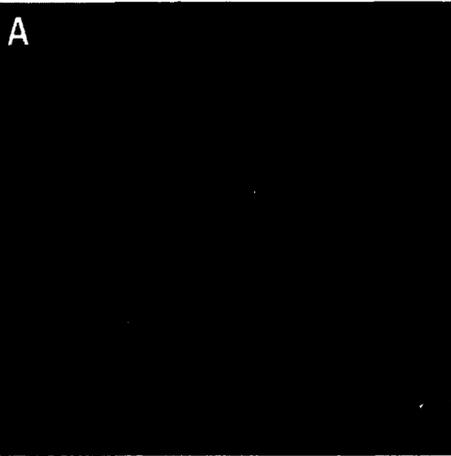


Figure 17. L'inhibition de la sous-unité p110 α induit l'apoptose des cellules HIEC.

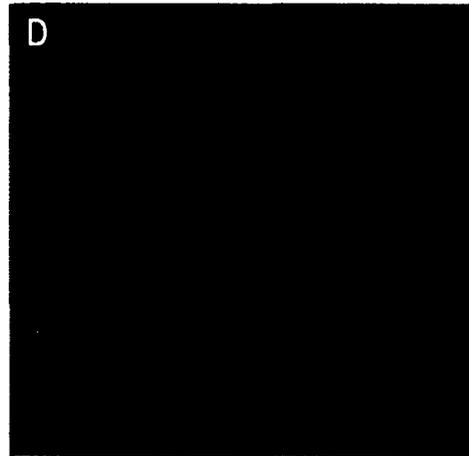
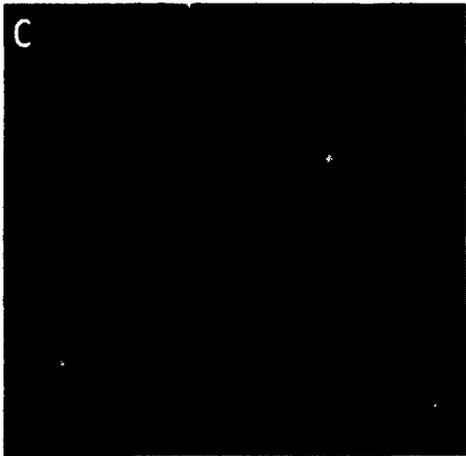
Micrographies représentatives de ISEL effectué dans les cellules HIEC ayant subi un traitement de 24 h en absence de sérum (Contrôle, A-B) ou en présence de LY294002 30 μ M (C-D), Pik-75 1 μ M (E-F) ou TGX221 1 μ M (G-H). Les noyaux des cellules totales ont été visualisés avec un filtre DAPI (A, C, E, G), alors que les cellules positives à l'ISEL ont été visualisées avec un filtre FITC (B, D, F, H). Grossissement final : 20X

DAPI

ISEL

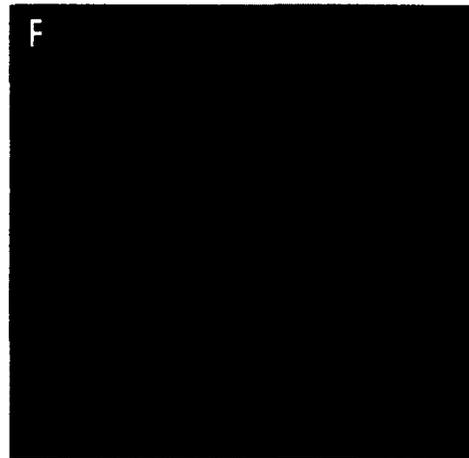
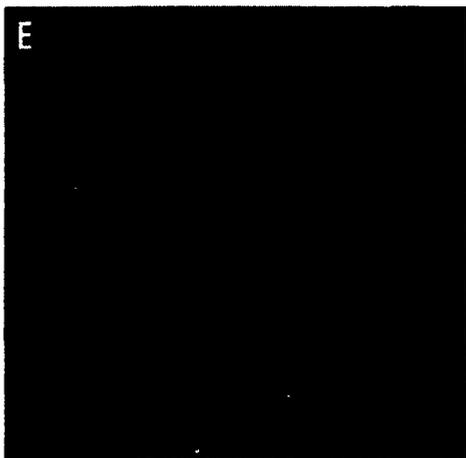


Contrôle

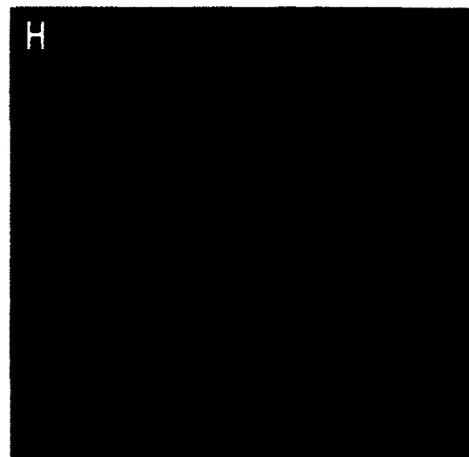


LY294002

30 μ M



PIK-75 1 μ M



TGX221 1 μ M

Figure 18. L'inhibition de la PI3-K ou de p110 α mais pas p110 β induit l'apoptose des cellules HIEC.

Les cellules ont été maintenues dans un milieu sans sérum (condition contrôle) et en présence de 30 μ M LY294002, qui inhibe la PI3-K, 1 μ M Pik-75, qui inhibe sélectivement la sous-unité p110 α de la PI3-K, ou 1 μ M TGX-221, qui inhibe sélectivement la sous-unité p110 β de la PI3-K. L'index relatif d'apoptose a été établi par ISEL et est défini en termes de pourcentage de contrôle, le nombre de cellules apoptotiques obtenues dans la condition contrôle étant fixé à 100%. Un minimum de 500 cellules a été compté dans chaque condition pour au moins 3 ($n \geq 3$) expériences et cultures séparées. La significativité des résultats a été déterminée par un test *t* de Student.

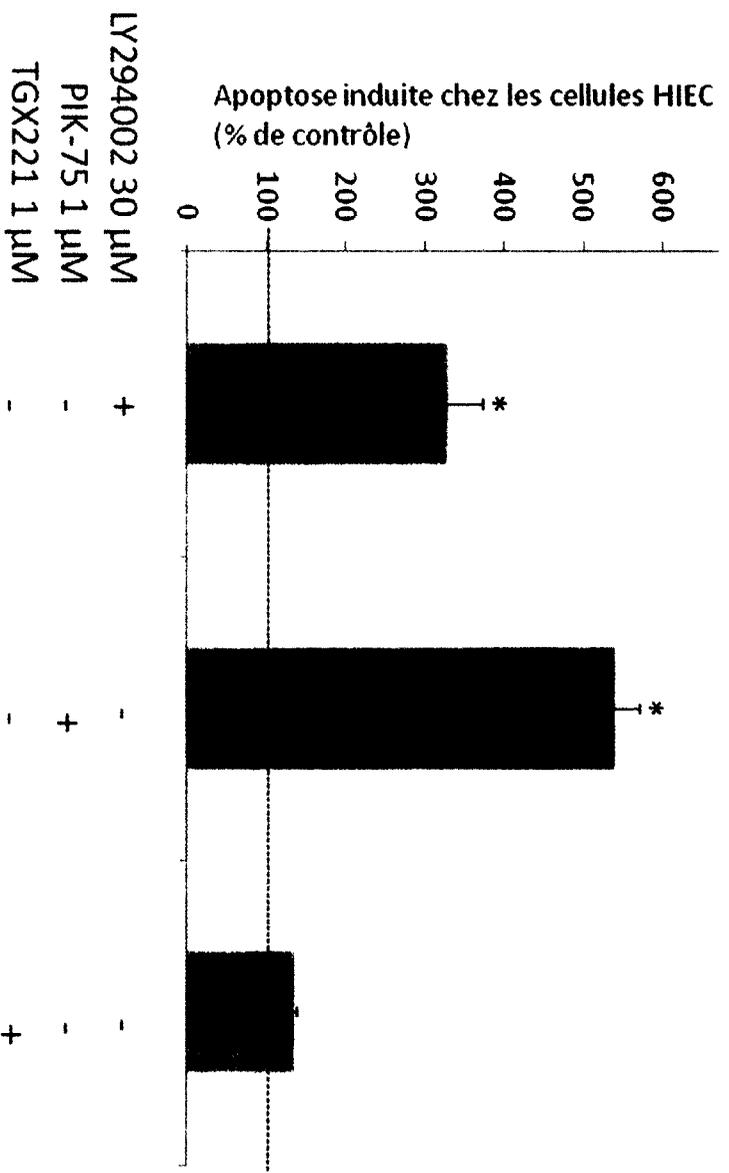


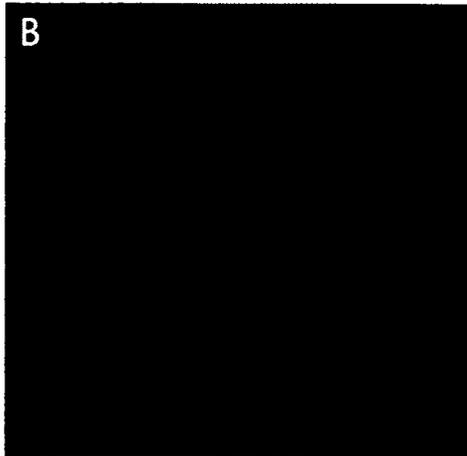
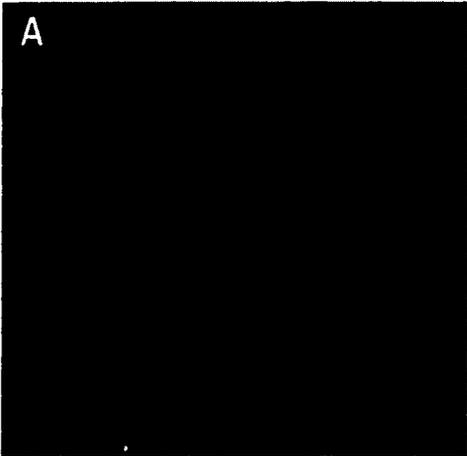
Figure 19. L'inhibition de la sous-unité p110 α induit l'apoptose des cellules Caco-2/15 indifférenciées.

Micrographies représentatives des essais d'ISEL effectué dans les cellules Caco-2/15 indifférenciées (-2 jours PC) ayant subi un traitement de 24 h en absence de sérum (Contrôle, A-B) ou en présence de LY294002 30 μ M (C-D), Pik-75 2 μ M (E-F) ou TGX221 2 μ M (G-H). Les noyaux des cellules totales ont été visualisés avec un filtre DAPI (A, C, E, G), alors que les cellules positives à l'ISEL ont été visualisées avec un filtre FITC (B, D, F, H). Grossissement final : 20X

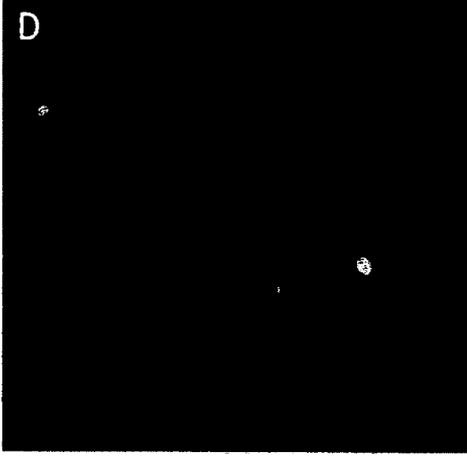
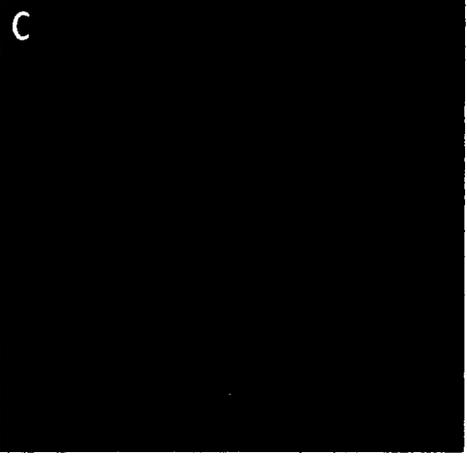
DAPI

ISEL

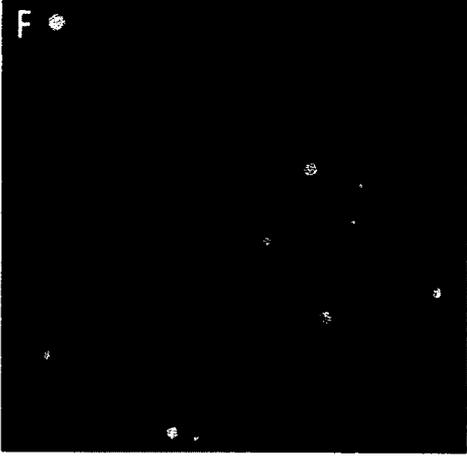
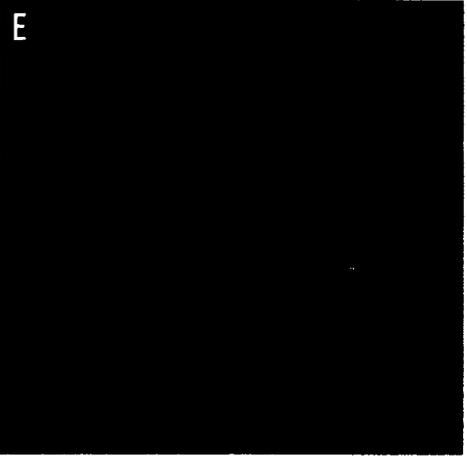
Contrôle



LY294002
30 μ M



PIK-75 2 μ M



TGX221 2 μ M

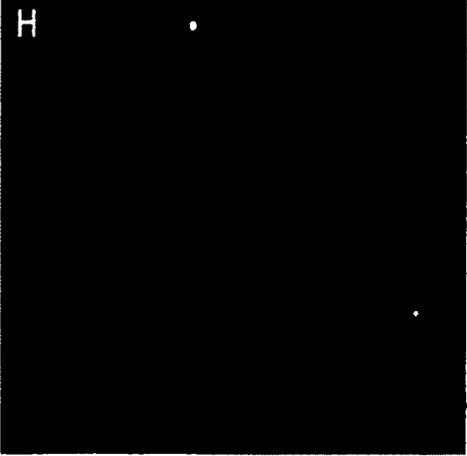


Figure 20. L'inhibition de la PI3-K ou de p110 α mais pas p110 β induit l'apoptose des cellules Caco-2/15 indifférenciées.

Les cellules ont été maintenues dans un milieu sans sérum (condition contrôle) et en présence de 30 μ M LY294002, qui inhibe la PI3-K, 2 μ M Pik-75, qui inhibe sélectivement la sous-unité p110 α de la PI3-K, ou 2 μ M TGX-221, qui inhibe sélectivement la sous-unité p110 β de la PI3-K. L'index relatif d'apoptose a été établi par ISEL et est défini en termes de pourcentage de contrôle, le nombre de cellules apoptotiques obtenues dans la condition contrôle étant fixé à 100%. Un minimum de 500 cellules a été compté dans chaque condition pour au moins 3 ($n \geq 3$) expériences et cultures séparées. La significativité des résultats a été déterminée par un test *t* de Student.

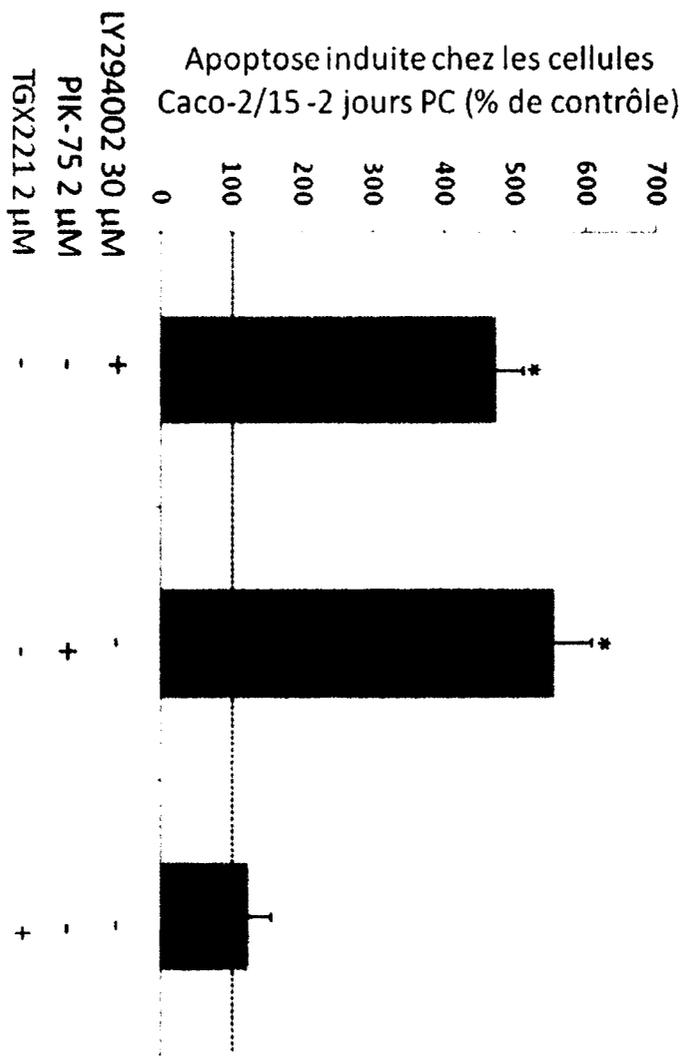


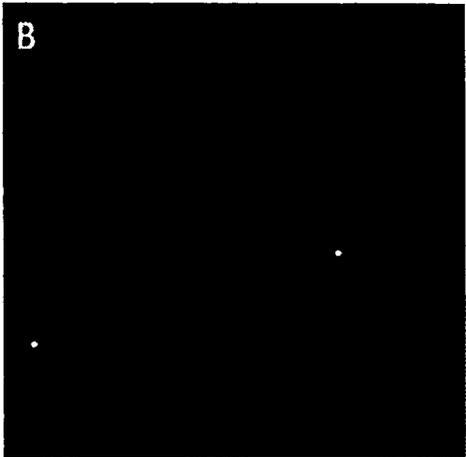
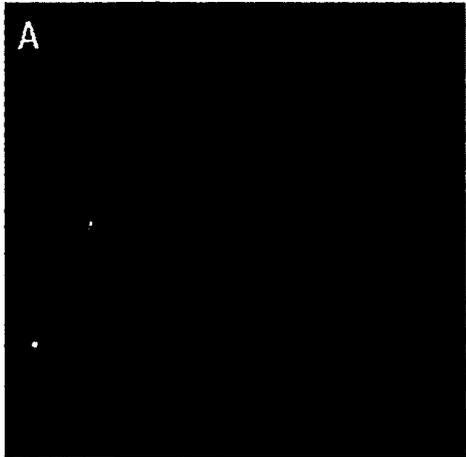
Figure 21. L'inhibition de la sous-unité p110 α et p110 β induit l'apoptose des cellules Caco-2/15 différenciées.

Micrographies représentatives d'ISEL effectué dans les cellules Caco-2/15 différenciées (30 jours PC) ayant subi un traitement de 24 h en absence de sérum (Contrôle, A-B) ou en présence de LY294002 30 μ M (C-D), Pik-75 2 μ M (E-F) ou TGX221 2 μ M (G-H). Les noyaux des cellules totales ont été visualisés avec un filtre DAPI (A, C, E, G), alors que les cellules positives à l'ISEL ont été visualisées avec un filtre FITC (B, D, F, H). Grossissement final : 20X

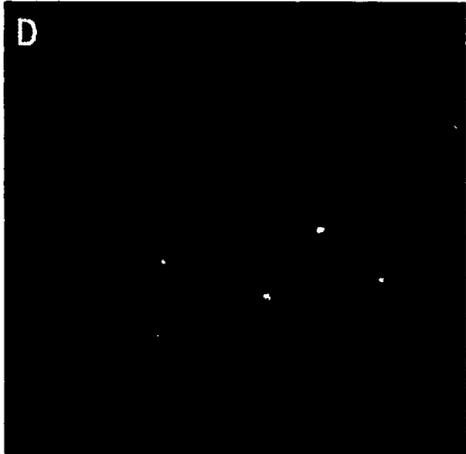
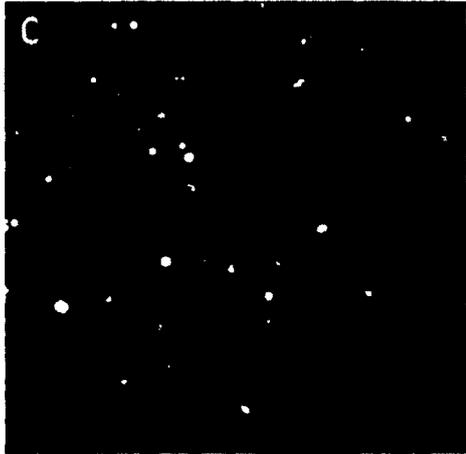
DAPI

ISEL

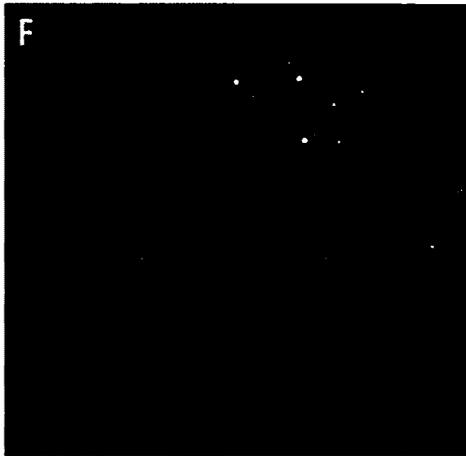
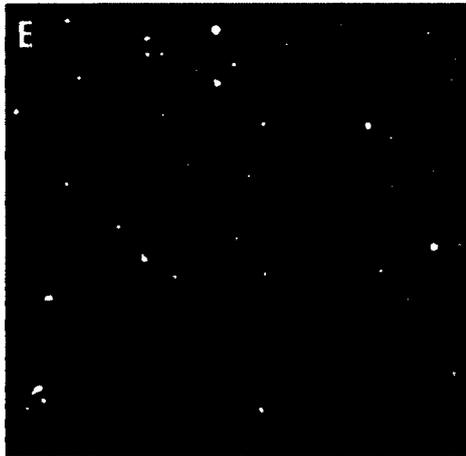
Contrôle



LY294002
30 μ M



PIK-75 2 μ M



TGX221 2 μ M

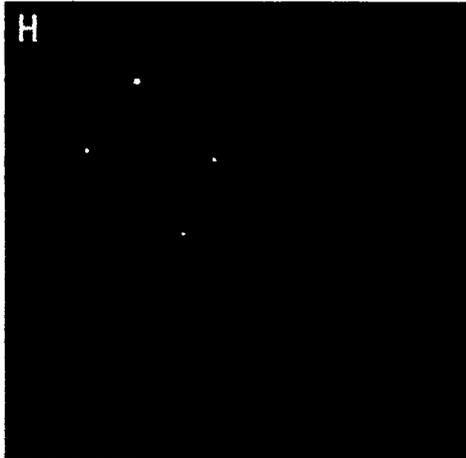
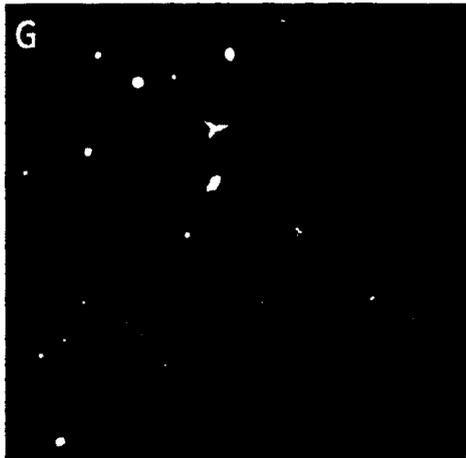
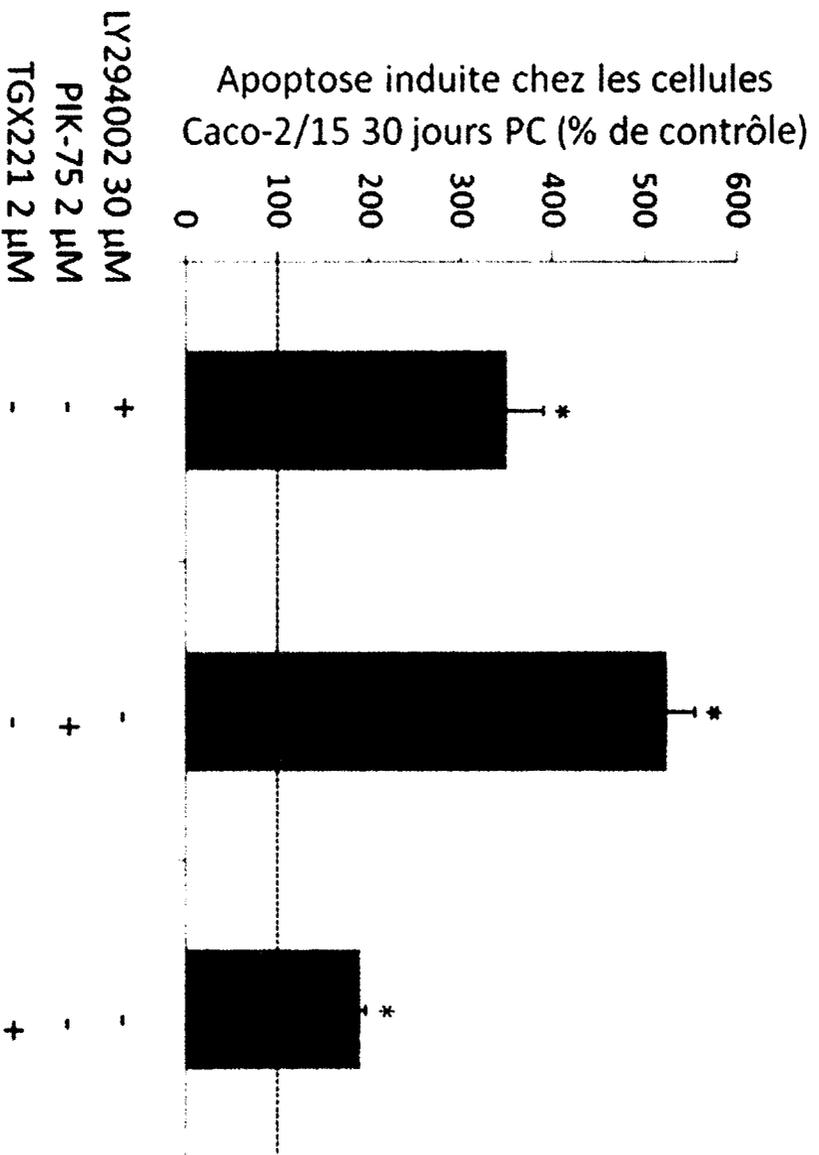


Figure 22. L'inhibition de la PI3-K, de p110 α et de p110 β induit l'apoptose des cellules Caco-2/15 différenciées.

Les cellules ont été maintenues dans un milieu sans sérum (condition contrôle) et en présence de 30 μ M LY294002, qui inhibe la PI3-K, 2 μ M Pik-75, qui inhibe sélectivement la sous-unité p110 α de la PI3-K, ou 2 μ M TGX-221, qui inhibe sélectivement la sous-unité p110 β de la PI3-K. L'index relatif d'apoptose a été établi par ISEL et est défini en termes de pourcentage de contrôle, le nombre de cellules apoptotiques obtenues dans la condition contrôle étant fixé à 100%. Un minimum de 500 cellules a été compté dans chaque condition pour au moins 3 ($n \geq 3$) expériences et cultures séparées. La significativité des résultats a été déterminée par un test *t* de Student.



4.2 Rôles des isoformes p110 dans l'activation de p57^{Akt-1}

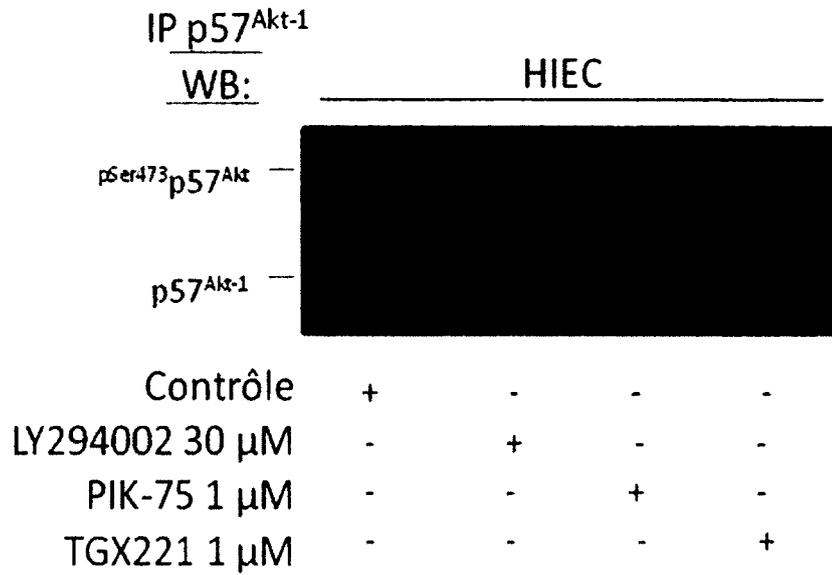
Nous avons étudié l'impact de l'inhibition de p110 α ou p110 β par des inhibiteurs pharmacologiques sélectifs sur l'activation de p57^{Akt-1} chez les cellules HIEC, Caco-2/15 indifférenciées (-2 jours PC) et différenciées (30 jours PC). La concentration appropriée des inhibiteurs a été préalablement déterminée tel que présenté à la figure 16. Nous avons donc traité les cellules 24 h tel que décrit à la section précédente et mesuré les niveaux d'activation de p57^{Akt-1}. Les niveaux relatifs d'activation de p57^{Akt-1} ont été déterminés en faisant le ratio de l'analyse densitométrique de la protéine phosphorylée sur la protéine totale immunoprécipitée. Nous observons que, dans les cellules HIEC, l'inhibition de la sous-unité p110 α par le Pik-75, ainsi que le traitement LY294002, induit une baisse significative de l'activation de p57^{Akt-1}. Cependant, l'inhibition de p110 β par le TGX221 n'affecte pas l'activation de p57^{Akt-1}, et au contraire, il semble même y avoir une légère augmentation (Figure 23).

Dans cellules Caco-2/15 indifférenciées, les traitements avec le LY294002 et le Pik-75 ont induit une baisse significative de l'activation de p57^{Akt-1}. Comme précédemment, le traitement au TGX221 ne semble pas moduler cette activation de p57^{Akt-1} (Figure 24). À l'opposé, dans les cellules Caco-2/15 différenciées, tous les traitements utilisés, soit le LY294002, Pik-75 et le TGX221 ont induit une diminution significative de l'activation de p57^{Akt-1}. Cependant, la diminution de l'activation de p57^{Akt-1} induite par le traitement avec le Pik-75, est significativement moins élevée que dans les cellules HIEC et Caco-2/15 indifférenciées (Figure 23 et 24).

Figure 23. Les inhibiteurs de la PI3-K modulent les niveaux d'activation de p57^{Akt-1} dans les cellules HIEC.

A : Immunobuvardage représentatif de l'activation de p57^{Akt-1} dans les cellules HIEC. Les cellules ont été maintenues 24 heures dans un milieu sans sérum ou en présence de 30 μ M LY294002, qui inhibe la PI3-K, 1 μ M Pik75, qui inhibe sélectivement la sous-unité p110 α de la PI3-K, ou 1 μ M TGX-221, qui inhibe sélectivement la sous-unité p110 β de la PI3-K. Suite à une immunoprécipitation utilisant un anticorps dirigé contre p57^{Akt-1}, les niveaux d'activation ont été détectés avec un anticorps spécifique à p^{Ser473}p57^{Akt-1} ou p57^{Akt-1}. B : Graphique représentant les niveaux relatifs d'activation de p57^{Akt-1}. L'intensité des signaux a été quantifiée par densitométrie et les niveaux relatifs d'activation ont été déterminés par le ratio de l'expression de la protéine phosphorylée sur l'expression de la protéine totale immunoprécipitée. Exceptionnellement, pour cette expérience, les données représentent la moyenne \pm SEM pour 2 (n = 2) expériences indépendantes utilisant des échantillons différents.

A.



B.

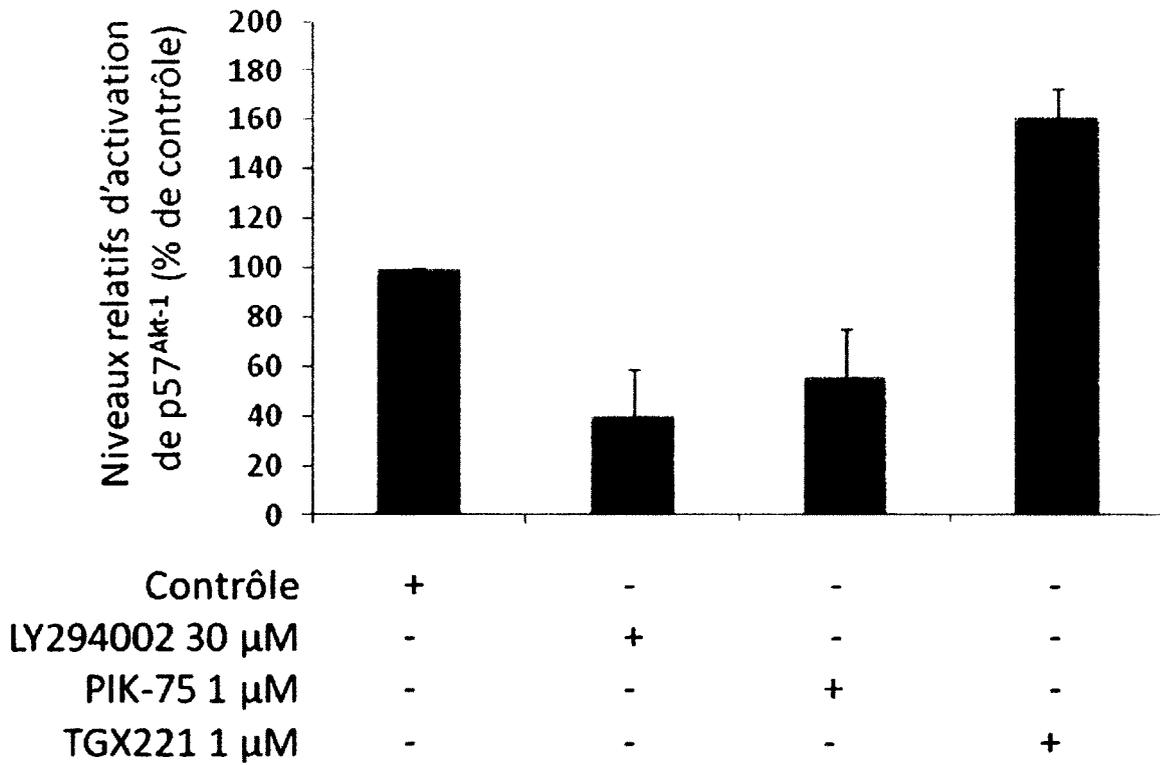
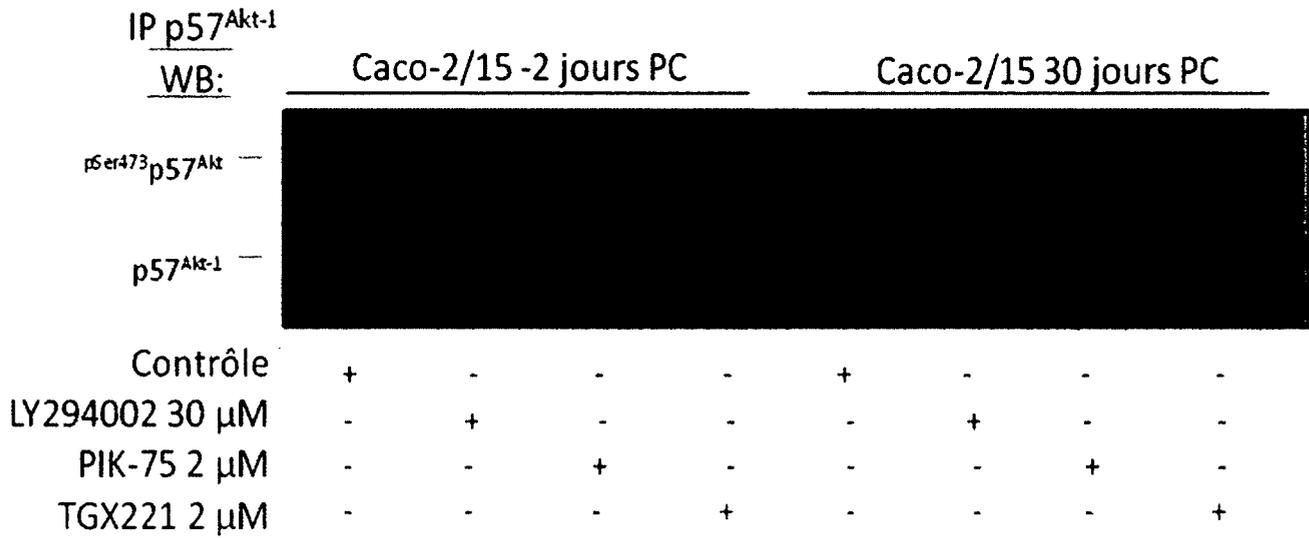


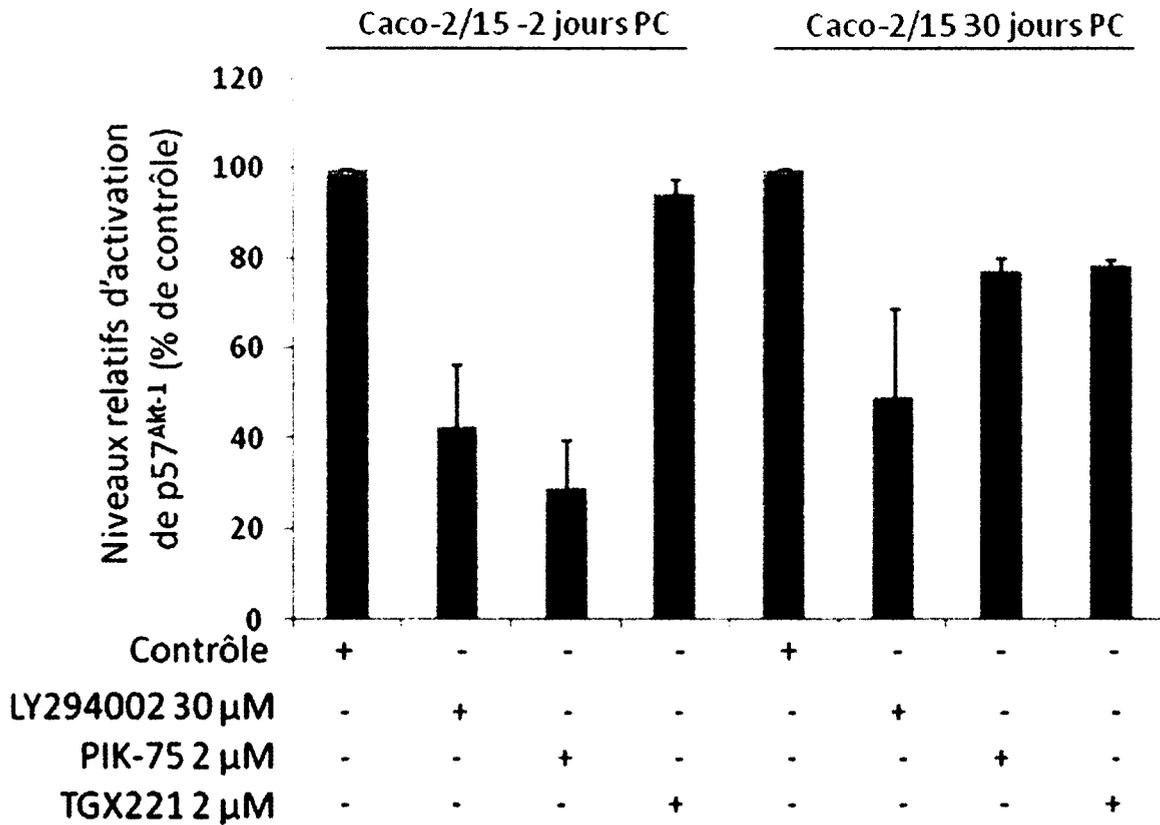
Figure 24. Les inhibiteurs de la PI3-K modulent les niveaux d'activation de p57^{Akt-1} des cellules Caco-2/15.

A : Immunobuvardage représentatif de l'activation de p57^{Akt-1} dans les cellules Caco-2/15 indifférenciées (-2 jours PC) et différenciées (30 jours PC). Les cellules ont été maintenues 24 heures dans un milieu sans sérum ou en présence de 30 μ M LY294002, qui inhibe la PI3-K, 2 μ M Pik-75, qui inhibe sélectivement la sous-unité p110 α de la PI3-K, ou 2 μ M TGX-221, qui inhibe sélectivement la sous-unité p110 β de la PI3-K. Suite à une immunoprécipitation utilisant un anticorps dirigé contre p57^{Akt-1}, les niveaux d'activation ont été détectés avec un anticorps spécifique à p^{Ser473}p57^{Akt} ou p57^{Akt-1}. B : Graphique représentant les niveaux relatifs d'activation de p57^{Akt-1}. L'intensité des signaux a été quantifiée par densitométrie et les niveaux relatifs d'activation ont été déterminés par le ratio de l'expression de la protéine phosphorylée sur l'expression de la protéine totale immunoprécipitée. Exceptionnellement, pour cette expérience, les données représentent la moyenne \pm SEM pour 2 (n = 2) expériences indépendantes utilisant des échantillons différents.

A.



B.



IV – DISCUSSION

Dans la présente étude, nous avons d'abord déterminé le statut d'expression des isoformes PI3-K dans les cellules épithéliales intestinales humaines indifférenciées, différenciées, ainsi qu'en cours de différenciation. Pour ce faire nous avons utilisé les cellules épithéliales intestinales humaines normales et indifférenciées de la crypte, les HIEC, et un modèle de différenciation entérocytaire, les Caco-2/15, une lignée provenant d'un adénocarcinome de côlon humain. Nous avons également déterminé la prédominance des complexes isoformes PI3-K chez ces mêmes cellules mais uniquement en fonction de l'état de différenciation. Pour approfondir les liens entre la voie PI3-K/Akt-1 et la signalisation Fak, nous avons étudié les complexes isoformes PI3-K associés aux cassettes de signalisation Fak selon l'état de différenciation, en condition d'anoïkose et lors de l'inhibition de Src. Nous avons aussi déterminé, à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques sélectifs aux isoformes p110 α ou p110 β , l'implication de ces isoformes catalytiques dans la survie et dans l'activation de p57^{Akt-1}, toujours selon l'état de différenciation. Nos résultats ont démontré que: (1) les cellules épithéliales intestinales exhibent des profils distincts d'expression des isoformes PI3-K selon l'état de différenciation; (2) il existe des complexes isoformes PI3-K distincts en prédominance selon l'état de différenciation; (3) l'association des isoformes PI3-K aux cassettes de signalisation Fak se fait de façon distincte selon l'état de différenciation; (4) l'implication des isoformes catalytiques dans la survie est distincte selon l'état de différenciation et (5) l'implication des isoformes catalytiques dans l'activation de p57^{Akt-1} est aussi distincte selon l'état de différenciation.

Mis ensembles, ces résultats nous indiquent que des complexes isoformes de la PI3-K sont impliqués de façon distincte dans la survie entérocytaire humaine, selon l'état de différenciation.

1. Profils distincts d'expression des isoformes PI3-K selon l'état de différenciation

Nous avons d'abord établi les profils d'expression des isoformes PI3-K chez les cellules étudiées. Il a déjà été démontré qu'il existait une répartition tissus-spécifique de certaines isoformes PI3-K alors que d'autres étaient retrouvées ubiquitairement (Inukai et al., 2000; Kok et al., 2009). Par exemple, rappelons que les isoformes p110 α et p110 β sont présents dans tous les types cellulaires alors que l'expression de p110 δ et p110 γ est restreinte aux cellules hématopoïétiques (Hawkins et al., 2006; Ameriks et Venable, 2009; Kok et al., 2009). Nous nous sommes donc interrogés à savoir si, dans notre modèle d'étude, des rôles ou des fonctions distincts peuvent être associées à cette expression des isoformes PI3-K. Aussi, certaines études démontrent qu'en plus d'avoir une expression tissus-spécifique, certaines isoformes ont une localisation intracellulaire et une signalisation qui leur sont propres. À titre d'exemple, p55 α et p55 γ réguleraient l'activité PI3-kinase associée aux microtubules en réponse à l'insuline (Inukai et al., 2000).

Nos résultats démontrent que les cellules HIEC expriment en prédominance les isoformes p85 β et p110 α (ARNm et protéine), et aussi l'ARNm de p55 γ , p110 δ et p110 γ (bien que la présence des protéines n'aie pas été confirmée). Les cellules Caco-2/15 différenciées, expriment les isoformes p85 α , p85 β , p110 α et p110 β (ARNm et protéine), et aussi p55 γ (ARNm seulement, la présence de la protéine n'a pas été confirmée), mais il y a absence du transcrite correspondant à p110 δ et p110 γ . De plus, lors du processus de différenciation entérocytaire des cellules Caco-2/15, il y a une augmentation de l'expression protéique de p85 α et p110 β , tandis que l'expression protéique de p85 β et p110 α demeure stable. Il a été suggéré que les mécanismes de régulation de l'expression des isoformes se situaient surtout au niveau transcriptionnel (Pankow *et al.*, 2006; Kok *et al.*, 2009), mais l'étude de la régulation de l'expression des isoformes PI3-K n'est malheureusement pas très approfondie et il reste encore beaucoup de mécanismes et d'interactions à élucider.

2. Complexes isoformes prédominants selon l'état de différenciation

Puisqu'il existe une répartition distincte des isoformes selon le type cellulaire et l'état de différenciation, nous supposons qu'il y a aussi prédominance de complexes isoformes distincts.

Nos résultats démontrent que, chez les cellules HIEC, on retrouve les isoformes PI3-K régulatrices p85 α et p85 β associées à p110 α , mais il y a absence de complexe isoforme constitué de p110 β . Ce résultat est en accord avec ce qui avait été montré précédemment, c'est-à-dire que les cellules intestinales épithéliales indifférenciées n'expriment pas ou à peu près pas p110 β . Il est donc logique que nous ne retrouvions pas de sous-unité régulatrice associée à p110 β chez ces cellules. Pour ce qui est des cellules Caco-2/15 différenciées, nous retrouvons toutes les combinaisons possibles de complexes isoformes PI3-K étudiés, c'est-à-dire : p85 α /p110 α , p85 β /p110 α , p85 α /p110 β et p85 β /p110 β . Ce résultat concorde aussi avec les patrons d'expression de ces isoformes : ces cellules expriment en effet une forte concentration de protéines de ces 4 isoformes. Nous ne savons pas exactement pourquoi certaines isoformes sont exprimées chez les cellules différenciées alors qu'elles sont presque absentes chez les cellules indifférenciées.

Il a déjà été démontré chez certains types cellulaires que des complexes isoformes distincts peuvent effectuer des rôles différents (Roche et al., 1998; Benistant et al., 2000). Comme nous le savons déjà, l'activation de la voie PI3-K/Akt mène à divers processus cellulaires tels que, la prolifération, la survie, la différenciation et la migration (Basson, 2008; Shtilbans et al., 2008; Liu et al., 2009). Aussi, nous savons qu'une activité PI3-kinase anormalement élevée peut promouvoir la transformation cellulaire (Zhao et Vogt, 2008; Kok et al., 2009). Dans un tel contexte, il est très probable que ces différents événements soient accomplis par des complexes isoformes distincts. Par ailleurs, les sous-unités régulatrices et catalytiques ne semblent pas avoir de préférence d'association, c'est-à-dire que lorsqu'une isoforme régulatrice est présente, elle est obligatoirement associée à une isoforme catalytique présente. Ainsi, dans des conditions normales, les

isoformes n'existent que sous forme d'hétérodimères obligatoires. Le seul moyen de contrôler quels sont les complexes isoformes prédominants serait donc de contrôler l'expression transcriptionnelle de chacune des isoformes (Kok et al., 2009). Par exemple, si dans un type cellulaire particulier on retrouve une surexpression de p85 α et de p110 α , on retrouvera nécessairement la prédominance du complexe p85 α /p110 α .

Différents processus ou stimuli cellulaires peuvent altérer de façon distincte l'expression des isoformes PI3-K et ainsi modifier la balance des complexes isoformes présents. Par exemple, une stimulation du tissu musculaire par l'insuline induit une augmentation de la transcription de l'ARNm de p85 α , p55 α et p50 α (Ducluzeau et al., 2001). Il a aussi été observé qu'il y avait une augmentation de la protéine p110 β lors de la différenciation adipocytaire de fibroblastes embryonnaires de souris (Asano et al., 2000). Il a été suggéré dans ce contexte que l'activité PI3-kinase associée à p110 α serait impliquée dans les activités cellulaires de base comme la prévention de l'apoptose et le métabolisme basal du glucose, tandis que l'activité PI3-kinase associée à p110 β serait impliquée chez les adipocytes différenciés dans l'absorption du glucose induite par l'insuline, une fonction qui leur est spécifique (Asano et al., 2000).

3. Complexes isoformes prédominants dans la signalisation Fak selon l'état de différenciation

La kinase d'adhésion focale p125^{Fak} et la tyrosine kinase Src occupent une place centrale dans la médiation des signaux de survie induits par l'adhésion cellulaire (Frisch et al., 1996; Bouchard et al., 2007; Zhao et Guan, 2009). Il a déjà été montré que ces deux kinases étaient importantes pour la survie des cellules indifférenciées et différenciées (Gauthier et al., 2001; Bouchard et al., 2007). Il a été aussi démontré que l'engagement de la voie PI3-K/Akt-1 se faisait de façon Src-dépendante dans les cellules indifférenciées alors qu'elle était Src-indépendante chez les cellules différenciées

(Bouchard et al., 2007). Nous voulions donc savoir si ce résultat pouvait s'appliquer à tous ou bien seulement à certains complexes isoformes de la PI3-K.

Nos résultats démontrent que, chez les cellules intestinales épithéliales indifférenciées, nous ne retrouvons pas les isoformes p85 α et p110 β associées aux cassettes de signalisation p125^{Fak}. Aussi, le recrutement de p85 β et p110 α par p125^{Fak} se fait de façon adhésion- et Src-dépendante. On peut donc dire que, chez les cellules indifférenciées, l'engagement de la voie PI3-K/Akt-1 se fait de façon adhésion- et Src-dépendante et implique le complexe PI3-K suivant : p85 β /p110 α . Cependant, chez les cellules différenciées, nous avons retrouvé toutes les isoformes étudiées associées aux cassettes de signalisation p125^{Fak}, soit p85 α , p85 β , p110 α et p110 β . Aussi, le recrutement de p85 α aux cassettes de signalisation p125^{Fak} est adhésion- et Src-dépendante et l'engagement de p85 β et p110 α est adhésion-dépendante alors qu'elle est Src-indépendante. Cependant, l'engagement de p110 β est Src-dépendante mais est adhésion-indépendante. Ces résultats d'association à p125^{Fak} concordent avec les patrons d'expression protéique des isoformes PI3-K obtenus précédemment. Pour comparer ces résultats obtenus à ceux de l'étude de Bouchard et al., 2007, la différence se situe au niveau des cellules différenciées. Rappelons que cette étude démontrait à l'aide d'anticorps non spécifique aux isoformes PI3-K, que la voie PI3-K/Akt-1 était adhésion cellulaire-dépendante et Src-indépendante. Nos résultats sur les isoformes PI3-K suggèrent que l'engagement de la voie PI3-K/Akt-1 aux cassettes de signalisation p125^{Fak} impliquant le complexe p85 β /p110 α est bel et bien adhésion cellulaire-dépendant et Src-indépendant. Cependant, l'isoforme p85 α est adhésion cellulaire- et Src-dépendant, tandis que p110 β serait Src-dépendant mais adhésion cellulaire indépendant. Nous constatons alors que la régulation de l'association des complexes PI3-K aux cassettes de signalisation p125^{Fak} est beaucoup plus complexe chez les cellules différenciées que chez les cellules indifférenciées.

4. Rôles des isoformes p110 α et p110 β dans la survie selon l'état de différenciation

La voie PI3-K/Akt-1 est reconnue pour être impliquée dans la survie d'un grand nombre de types cellulaires (Engelman, 2009; Matheny et Adamo, 2009). Il a déjà été démontré que p110 α et p110 β jouent un rôle crucial dans le développement embryonnaire puisque la délétion totale du gène p110 α ou p110 β chez la souris est létale au stade embryonnaire (Hawkins et al., 2006). Nous voulions savoir si les isoformes PI3-K contribuaient de façon similaire, ou non, à la survie des cellules épithéliales intestinales humaines selon l'état de différenciation.

Nous avons utilisé des inhibiteurs pharmacologiques qui inhibent sélectivement l'activité kinase de p110 α (Pik-75) et p110 β (TGX221). Nos résultats démontrent que dans les cellules épithéliales intestinales indifférenciées (HIEC et Caco-2/15 -2 jours PC), l'isoforme PI3-K catalytique p110 α est important pour la survie, mais pas p110 β . Par contre, dans cellules Caco-2/15 différenciées, les deux isoformes étudiées, soit p110 α et p110 β , sont importantes pour la survie. En considérant que les cellules épithéliales intestinales indifférenciées n'expriment pas ou peu de p110 β , nous nous attendions à ce que son inhibition n'induisse pas d'apoptose. Outre leur activité kinase, il a été suggéré que les sous-unités catalytiques pouvaient avoir un rôle de protéine d'échafaudage. Si la souris dont p110 β a été invalidé meurt au stade embryonnaire, celle qui exprime un p110 β muté qui n'a aucune activité kinase est viable et atteint l'âge adulte (Ciraolo et al., 2008; Hirsch et al., 2009). C'est donc que le rôle de p110 β dépasse son activité kinase mais ceci reste à être pleinement démontré et étudié.

5. Rôles des isoformes p110 α et p110 β dans l'activation de p57^{Akt-1} selon l'état de différenciation

Trois isoformes d'Akt ont été caractérisées dans les cellules humaines, soit Akt-1, Akt-2 et Akt-3. L'étude de l'expression de ces isoformes a montré que Akt-1 et Akt-2 étaient exprimés de façon ubiquitaire alors que Akt-3 était retrouvé plus particulièrement dans le cerveau, le cœur et les reins (Matheny et Adamo, 2009). Il a déjà été démontré que seule l'activation d'Akt-1 était requise pour la survie des cellules épithéliales intestinales (Dufour et al., 2004; Harnois et al., 2004). De plus, dans les cellules épithéliales intestinales, l'activation de p57^{Akt-1} est PI3-K-dépendant alors que l'activation d'Akt-2 est PI3-K-indépendant (Dufour et al., 2004).

Dans cette étude, nous avons établi que l'isoforme catalytique p110 α de PI3-K est responsable de l'activation de p57^{Akt-1} dans les cellules épithéliales intestinales indifférenciées. Par contre, les isoformes p110 α et β sont responsables de l'activation de p57^{Akt-1} dans les cellules les cellules différenciées. Encore une fois, ce résultat concorde avec les patrons d'expression protéique des isoformes, c'est à dire la faible expression de p110 β dans les cellules indifférenciées, et des niveaux d'expression équivalents pour les isoformes p110 α et p110 β dans les cellules différenciées. Cependant, l'inhibition de p110 α induit un taux d'apoptose presque trois fois supérieur à l'inhibition de p110 β dans les cellules différenciées. Ces résultats suggèrent une certaine redondance dans les rôles accomplis par ces deux isoformes au niveau de la survie, comme c'est le cas pour la signalisation PI3-K induite par l'insuline chez plusieurs types cellulaires (Chaussade et al., 2007). Dans cette optique, il serait intéressant de vérifier si un tel phénomène existe en utilisant les deux inhibiteurs en même temps, et d'analyser le taux d'apoptose et les niveaux relatifs d'activation de p57^{Akt-1} résultants, à savoir s'ils sont ou non plus élevés que la somme de l'effet de chacun séparément.

V- CONCLUSIONS

En conclusion, la présente étude suggère que des complexes isoformes de la PI3-K sont impliqués de façon distincte dans la survie entérocytaire humaine, selon l'état de différenciation. Tout d'abord, les cellules épithéliales intestinales exhibent des profils d'expression distincts selon l'état de différenciation et il existe des complexes isoformes prédominants distincts selon l'état de différenciation. Ensuite, ces complexes isoformes différents sont engagés de façon distincte par la signalisation intégrines $\beta 1$ /Fak/Src selon l'état de différenciation et aussi, des isoformes distincts sont impliqués dans la survie et dans l'activation de $p57^{Akt-1}$ selon l'état de différenciation. Jusqu'à récemment, l'étude des isoformes PI3-K était limitée par la disponibilité et l'efficacité d'anticorps spécifiques. Toutes les expériences visant la détection des protéines, des complexes protéiques ou même des degrés d'activation des protéines, étaient très ardues ou même impossibles. Le perfectionnement et la standardisation des méthodes de fabrication des anticorps ainsi que la disponibilité et l'accessibilité de ceux-ci ont grandement amélioré et contribué aux études concernant les isoformes PI3-K.

Afin de poursuivre l'étude des rôles distincts des complexes isoformes, une étude impliquant des essais de surexpression d'isoformes de type sauvage ou mutés (constitutif actif et dominant négatif), sera effectuée. Il sera donc possible de vérifier l'impact d'un complexe isoforme en particulier sur la résistance à l'anoïkose et l'activation de $p57^{Akt-1}$. Afin de valider les expériences impliquant les inhibiteurs pharmacologiques, nous pourrions aussi utiliser la technique des shARN pour éliminer sélectivement l'expression du transcrite des isoformes et ainsi de la protéine correspondante. Puisqu'il n'existe pas d'inhibiteurs pharmacologiques ciblant les sous-unités régulatrices, cette approche nous donnerait des informations précieuses sur les rôles des isoformes PI3-K. Il sera alors intéressant d'étudier les différents impacts de la surexpression ou la délétion d'une isoforme ou d'une autre, sur la résistance à l'anoïkose, sur l'activation de $p57^{Akt-1}$ ou même au niveau de la tumorigénèse intestinale, dans un modèle murin. Aussi, en utilisant

des isoformes p110 mutées (non-kinases), il serait intéressant de voir si elles ont un rôle de protéine d'échafaudage dans notre contexte d'étude.

Malgré les avancements de la science et la médecine, les traitements conventionnels de chimiothérapie et de radiothérapie sont souvent insuffisants. De nombreuses recherches ont montré qu'il est prometteur de cibler les isoformes PI3-K pour traiter divers cancers (Carvalho et Schmitt, 2010; Mazzoletti et Brogini, 2010). En effet, on sait que la voie PI3-K joue un rôle important dans la résistance aux traitements classiques contre le cancer (Kim et al., 2005; Huang et Hung, 2009). Aussi, les isoformes PI3-K sont fréquemment mutées et/ou la signalisation est très souvent altérée chez les cellules cancéreuses (Samuels et al., 2004; Vogt et al., 2010). Plusieurs stratégies sont présentement à l'étude afin d'augmenter l'efficacité des traitements anti-cancéreux. Par exemple, des anticorps spécifiques aux isoformes ou bien des inhibiteurs pharmacologiques qui inhibent sélectivement une isoforme. Ce qui semble le plus efficace à l'heure actuelle est un traitement qui combine des agents chimiothérapeutiques classiques à des drogues qui ciblent la voie PI3-K/Akt (Cleary et Shapiro, 2010; Maira et al., 2010).

Cette étude a permis d'en connaître un peu plus sur les rôles des isoformes PI3-K dans le contexte de survie entérocytaire humaine. L'étude des isoformes nous apporte une connaissance plus approfondie des mécanismes entourant cette voie de signalisation si cruciale dans l'avenir de la biologie cellulaire.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr. Pierre H. Vachon, mon directeur de recherche, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour m'avoir permis de travailler sur un projet aussi intéressant et pour m'avoir aidé et soutenu pendant ces dernières années. Je remercie également les membres passés et présents du laboratoire, soit les assistantes de recherche : Marie-Josée Demers et Mélina Arguin, les étudiants : Vincent Laquerre, David Lepage, Alexandre Tremblay et Sonya Thibodeau, ainsi que tous les membres du département d'anatomie et biologie cellulaire. Je remercie aussi particulièrement le Dr. Dominique Jean, pour son aide technique et ses conseils précieux.

BIBLIOGRAPHIE

- Abram, C.L., Courtneidge, S.A. (2000) Src family tyrosine kinases and growth factor signalling. *Exp. Cell. Res.* 10; 254 (1):1-13.
- Adams, J.M., Cory, S. (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 28; 281 (5381):1322-6.
- Adams, J.M., Cory, S. (2001) Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem. Sci.* 26 (1): 61-6.
- Adams, J.M., Cory, S. (2007) Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Curr Opin Immunol.* 19 (5): 488-96.
- Ali, K. et al. (2004) Essential role for the p110 δ phosphoinositide 3-kinase in the allergic response. *Nature* 431: 1007–1011.
- Ameriks, M.K., Venable, J.D. (2009) Small molecule inhibitors of phosphoinositide 3-kinase (PI3K) delta and gamma. *Curr. Top. Med. Chem.* 9 (8): 738-53.
- Ameisen, J.C. (2005) Anoikis. *Med Sci (Paris)* 21: 117.
- Asano, T., Kanda, A., Katagiri, H., Nawano, M., Ogihara, T., Inukai, K., Anai, M., Fukushima, Y., Yazaki, Y., Kikuchi, M., Hooshmand-Rad, R., Heldin, C.H., Oka, Y., Funaki, M. (2000) p110 β is up-regulated during differentiation of 3T3-L1 cells and contributes to the highly insulin-responsive glucose transport activity. *J. Biol. Chem.* 275: 17671–676.
- Barczyk, M., Carracedo, S., Gullberg, D. (2010) Integrins. *Cell. Tissue Res.* 339 (1):269-80.
- Basson, M.D., Sanders, M.A., Gomez, R., Hatfield, J., Vanderheide, R., Thamilselvan, V., Zhang, J., Walsh, M.F. (2006) Focal adhesion kinase protein levels in gut epithelial motility. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 291: G491-G499.
- Basson, M.D. (2008) An intracellular signal pathway that regulates cancer cell adhesion in response to extracellular forces. *Cancer Res.* 68: (1) 2-4.
- Beaulieu, J.-F., Quaroni, A. (1991) Clonal analysis of sucraseisomaltase expression in the human colon adenocarcinoma cells Caco-2. *Biochem. J.* 280: 599–608.
- Beaulieu, J.-F. (1999) Integrins and human intestinal cell functions. *Front Biosci.* 15 (4): D310-21.

Bénistant, C., Chapuis, H., Roche, S. (2000) A specific function for phosphatidylinositol 3-kinase alpha (p85alpha-p110alpha) in cell survival and for phosphatidylinositol 3-kinase beta (p85alpha-p110beta) in de novo DNA synthesis of human colon carcinoma cells. *Oncogene*, 19: 5083-90.

Bi, L., Okabe, I., Bernard, D.J., Wynshaw-Boris, A., Nussbaum, R.L. (1999) Proliferative defect and embryonic lethality in mice homozygous for a deletion in the p110 α subunit of phosphoinositide 3-kinase. *J. Biol. Chem.* 274: 10963–10968.

Billottet, C., Grandage, V.L., Gale, R.E., Quattropani, A., Rommel, C., Vanhaesebroeck, B., Khwaja, A. (2006) A selective inhibitor of the p110delta isoform of PI 3-kinase inhibits AML cell proliferation and survival and increases the cytotoxic effects of VP16. *Oncogene*, 26-25 (50): 6648-59.

Bouchard, V., Demers, M-J., Thibodeau, S., Laquerre, V., Fujita, N., Tsuruo, T., Beaulieu, J-F., Gauthier, R., Vézina, A., Villeneuve, L., Vachon, P.H. (2007) Fak/Src signaling in human intestinal epithelial cell survival and anoikis: differentiation state-specific uncoupling with the PI3-K/Akt-1 and MEK/Erk pathways. *J. Cell. Physiol.* 212 (3): 717-28.

Bouchard, V., Harnois, C., Demers, M-J., Thibodeau, S., Laquerre, V., Gauthier, R., Vézina, A., Noël, D., Fujita, N., Tsuruo, T., Arguin, M., Vachon, P.H., (2008) B1 integrin/Fak/Src signaling in intestinal epithelial crypt cell survival: integration of complex regulatory mechanisms. *Apoptosis* 13 (4): 531-42.

Boudreau NJ, Jones PL. Extracellular matrix and integrin signaling : the shape of things to come. *Biochem J* 1999 (339): 481-8.

Bunney, T.D., Katan, M. (2010) Phosphoinositide signalling in cancer: beyond PI3K and PTEN. *Nat. Rev. Cancer.* 10 (5): 342-52.

Cantley,L.C. (2002) The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science.* 296(5573):1655-7.

Chaussade, C., Rewcastle, G.W., Kendall, J.D., Denny, W.A., Cho, K., Grønning, L.M., Chong, M.L., Anagnostou, S.H., Jackson, S.P., Daniele, N., Shepherd, P.R.. (2007) Evidence for functional redundancy of class IA PI3K isoforms in insulin signalling. *Biochem J.* 15;404(3):449-58.

Carvalho, S., Schmitt, F. (2010) Potential role of PI3K inhibitors in the treatment of breast cancer, *Future Oncol.* 6(8): 1251-1263.

Casanova, JE. (2007) Regulation of Arf activation: the Sec7 family of guanine nucleotide exchange factors. *Traffic*, 8(11): 1476-1485.

Castellano, E., Downward, G. (2010) Role of RAS in the regulation of PI 3-kinase. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 346: 143-69.

Ciraolo, E., Iezzi, M., Marone, R., Marengo, S., Curcio, C., Costa, C., Azzolino, O., Gonella, C., Rubinetto, C., Wu, H., Dastrù, W., Martin, E.L., Silengo, L., Altruda, F., Turco, E., Lanzetti, L., Musiani, P., Rückle, T., Rommel, C., Backer, J.M., Forni, G., Wymann, M.P., Hirsch, E., (2008) Phosphoinositide 3-kinase p110b activity: key role in metabolism and mammary gland cancer but not development. *Sci. Signal.* 1 (36): ra3.

Clayton, E. et al. (2002) A crucial role for the p110 δ subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in B cell development and activation. *J. Exp. Med.* 196: 753–763.

Cleary, J.M., Shapiro, G.I. (2010) Development of phosphoinositide-3 kinase pathway inhibitors for advanced cancer. *Curr. Oncol. Rep.* 12 (2): 87-94.

Cornillion, J., Campos, L., Guyotat, D. (2003) Focal adhesion kinase (FAK), une protéine aux fonctions multiples. *Med. Sci.* 19: 743-52.

Cory, S., Huang, D.C.S., Adams, J.M. (2003) The Bcl-2 family : roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 22: 8590-7.

Datta, S.R., Brunet, A., Greenberg, M.E., (1999) Cellular survival: A play in three Akts. *Genes Dev.* 13: 2905–2927.

Desgrosellier, J.S., Cheresch, D.A. (2010) Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Cancer* 10 (1): 9-22.

Ducluzeau, P.H., Perretti, N., Laville, M., Andreelli, F., Vega, N., Riou, J.-P., Vidal, H., (2001) Regulation by insulin of gene expression in human skeletal muscle and adipose tissue. Evidence for specific defects in type 2 diabetes. *Diabetes* 50: 1134–1142

Dufour, G., Demers, M.-J., Gagné, D., Dydesborg, A.B., Teller, I.C., Bouchard, V., Degongre, I., Beaulieu, J.-F., Cheng, J.Q., Fujita, N., Tsuruo, T., Vallé, K., Vachon, P.H., (2004) Human intestinal epithelial cell survival and anoikis: differentiation state-distinct regulation and roles of protein kinase B/Akt isoforms. *J. Biol. Chem.* 279: 44113-44122.

Edinger, A.L., Thompson, C.B. (2004) Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16: 663-9.

Engelman, J.A., Luo, J., Cantley, L.C., (2006) The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat. Rev. Genet.* 7: 606–619.

Engelman, J.A., (2009) Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat. Rev. Cancer.* 9 (8): 550-62.

Fayard, E., Xue, G., Parcellier, A., Bozulich, L., Hemmings, B.A., (2010) Protein kinase B (PKB/Akt), a key mediator of the PI3K signalling pathway. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 346:31-56.

Finkelstein, L.D., Schwartzberg, P.L. (2004) Tec kinases: shaping T-cell activation through actin. *Trends Cell. Biol.* 14(8): 443-51.

Foukas, L.C., Claret, M., Pearce, W., Okkenhaug, K., Meek, S., Peskett, E., Sancho, S., Smith, A.J., Withers, D.J., Vanhaesebroeck, B. (2006) Critical role for the p110 α phosphoinositide-3-OH kinase in growth and metabolic regulation. *Nature* 441: 366–370.

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

Frisch, S.M., Screaton, R.A. (2001) Anoikis mechanisms. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13: 555-62.

Fruman, D. A. et al. (1999) Impaired B cell development and proliferation in absence of phosphoinositide 3-kinase p85 α . *Science* 283: 393–397.

Fruman, D.A., Mauvais-Jarvis, F., Pollard, D.A., Yballe, C.M., Brazil, D., Bronson, R.T., Kahn, C.R., Cantley, L.C. (2000) Hypoglycaemia, liver necrosis and perinatal death in mice lacking all isoforms of phosphoinositide 3-kinase p85 α . *Nat. Genet.* 26: 379–382.

Fry, M.J., Waterfield, M.D., (1993) Structure and function of phosphatidylinositol 3-kinase: a potential second messenger system involved in growth control. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 340 (1293): 337-44.

Funderburk SF, Wang QJ, Yue Z. (2010) The Beclin 1-VPS34 complex--at the crossroads of autophagy and beyond. *Trends Cell Biol.* ;20 (6): 355-62.

Gauthier, R., Harnois, C., Drolet, J.-F., Reed, J.C., Vézina, A., Vachon, P.H., (2001a) Human intestinal epithelial cell survival: differentiation state-specific control mechanisms. *Am. J. Physiol.* 280: C1540-C1554.

Gauthier, R., Laprise, P., Cardin, É., Harnois, C., Plourde, A., Reed, J.C., Vézina, A., Vachon, P.H., (2001b) Differential sensitivity to apoptosis between the human small and large intestinal mucosae: linkage with segment-specific regulation of Bcl-2 homologs and involvement of signalling pathways. *J. Cell. Biochem.* 82: 339-355.

Giancotti, F.G. (1997) Integrin signaling : specificity and control of cell survival and cell cycle progression. *Curr. Opin. Cell Biol* 9: 691-700.

Giancotti, F.G., Ruoslahti, E. (1999a) Integrin signaling. *Science* 285: 1028-32.

- Giancotti, F.G. (1999b) Complexity and specificity of integrin signaling. *Nat. Cell Biol.* 2: E13-4.
- Grossmann, J. (2002) Molecular mechanisms of «detachment-induced apoptosis-anoikis» *Apoptosis* 7: 247-260.
- Guan, J.L. (2010) Integrin signaling through FAK in the regulation of mammary stem cells and breast cancer. *IUBMB Life.* 62 (4): 268-76.
- Guerreiro, A.S., Fattet, S., Fischer, B., Shalaby, T., Jackson, S.P., Schoenwaelder, S.M., Grotzer, M.A., Delattre, O., Arcaro, A.. (2008) Targeting the PI3K p110alpha isoform inhibits medulloblastoma proliferation, chemoresistance, and migration. *Clin. Cancer Res.* 14 (21): 6761-9.
- Guo, H., Samarakoon, A., Vanhaesebroeck, B., Malarkannan, S. (2008) The p110 δ of PI3K plays a critical role in NK cell terminal maturation and cytokine/ chemokine generation. *J. Exp. Med.* 205: 2419–2435.
- Harnois, C., Demers, M.-J., Bouchard, V., Vallée, K., Gagné, D., Fujita, N., Tsuruo, T., Vézina, A., Beaulieu, J.-F., Côté, A., Vachon, P.H. (2004) Human intestinal epithelial crypt cell survival and death: Complex modulations of Bcl-2 homologs by Fak, PI3-K/Akt-1, MEK/Erk, and p38 signaling pathways, *J. Cell. Physiol.* 198 (2): 209-22.
- Hao, H.F., Naomoto, Y., Bao, X.H., Watanabe, N., Sakurama, K., Noma, K., Tomono, Y., Fukazawa, T., Shirakawa, Y., Yamatsuji, T., Matsuoka, J., Takaoka, M. (2009) Progress in researches about focal adhesion kinase in gastrointestinal tract. *World J. Gastroenterol.* 15 (47): 5916-23.
- Hawkins, P.T., Anderson, K.E., Davidson, K., Stephens, L.R. (2006) Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells, *Biochem. Soc. Trans.* Volume 34, Part 5.
- Hayakawa, M., Kaizawa, H., Moritomo, H. (2006) Synthesis and biological evaluation of 4-morpholino-2-phenylquinazolines and related derivatives as novel PI3 kinase p110alpha inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 14: 6847–6858.
- Hirsch, E., Braccini, M., Ciruolo, E., Morello, F., Perino, A. (2009) Twice upon a time: PI3K's secret double life exposed. *Trends Biochem. Sci.* 34 (5): 244-8.
- Huang, WC., Hung, MC. (2009) Induction of Akt activity by chemotherapy confers acquired resistance. *J. Formos. Med. Assoc.* 108(3): 180-194.
- Ihle, N.T., Powis, G. (2010) Inhibitors of phosphatidylinositol-3-kinase in cancer therapy. *Mol Aspects Med.* 31 (2): 135-44.

Inukai, K., Funaki, M., Ogihara, T., Katagiri, H., Kanda, A., Anai, M., Fukushima, Y., Hosaka, T., Suzuki, M., Shin, B.C., Takata, K., Yazaki, Y., Kikuchi, M., Oka, Y., Asano, T. (1997) p85alpha gene generates three isoforms of regulatory subunit for phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-Kinase), p50alpha, p55alpha, and p85alpha, with different PI 3-kinase activity elevating responses to insulin. *J. Biol. Chem.* 272 (12): 7873-82.

Inukai, K., Funaki, M., Nawano, M., Katagiri, H., Togihara, T., Anai, M., Onishi, Y., Sakoda, H., Ono, H., Fukushima, Y., Kikuchi, M., Oka, Y., Asano, T. (2000) The N-terminal 34 residues of the 55 kDa regulatory subunits of phosphoinositide 3-kinase interact with tubulin. *Biochem. J.* 346: 483-489.

Jaiswal, B.S., Janakiraman, V., Kljavin, N.M., Chaudhuri, S., Stern, H.M., Wang, W., Kan, Z., Dbouk, H.A., Peters, B.A., Waring, P., Dela, Vega, T., Kenski, D.M., Bowman, K.K., Lorenzo, M., Li, H., Wu, J., Modrusan, Z., Stinson, J., Eby, M., Yue, P., Kaminker, J.S., de Sauvage, F.J., Backer, J.M., Seshagiri, S. (2009) Somatic mutations in p85alpha promote tumorigenesis through class IA PI3K activation. *Cancer Cell.* 16 (6): 463-74.

Jimenez, C., Jones, D.R., Rodríguez-Viciano, P., Gonzalez-García, A., Leonardo, E., Wennström, S., von Kobbe, C., Toran, J.L., R-Borlado, L., Calvo, V., Copin, S.G., Albar, J.P., Gaspar, M.L., Diez, E., Marcos, M.A., Downward, J., Martinez-A, C., Mérida, I., Carrera, A.C. (1998) Identification and characterization of a new oncogene derived from the regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase. *EMBO* 17(3): 743-53.

Jou, S. T. et al. (2002) Essential, nonredundant role for the phosphoinositide 3-kinase p110 δ in signaling by the B-cell receptor complex. *Mol. Cell Biol.* 22: 8580–8591.

Keely, P.J., Parise, L.V. (1996) The alpha2beta1 integrin is a necessary co-receptor for collagen-induced activation of Syk and the subsequent phosphorylation of phospholipase Cgamma2 in platelets. *J. Biol. Chem.* 271 (43): 26668-76.

Kim, D., Dan, H.C., Park, S., Yang, L., Liu, Q., Kaneko, S., Ning, J., He, L., Yang, H., Sun, M., Nicosia, S.V., Cheng, J.Q. (2005) AKT/PKB signalling mechanisms in cancer and chemoresistance. *Front. Biosci.* 10: 975- 987.

Kim, N., Saudemont, A., Webb, L., Camps, M., Ruckle, T., Hirsch, E., Turner, M., Colucci, F. (2007) The p110 δ catalytic isoform of PI3K is a key player in NK-cell development and cytokine secretion. *Blood* 110: 3202–3208.

Kok, K., Geering, B., Vanhaesebroeck, B. (2008) Regulation of phosphoinositide 3-kinase expression in health and disease. *Trends in Biochem. Sc.* 34 (3): 115-27.

Laprise, P., Poirier, E.M., Vézina, A., Rivard, N., Vachon, P.H. (2002) Merosin-integrin promotion of skeletal myofiber cell survival: Differentiation state-distinct involvement of

p60Fyn tyrosine kinase and p38alpha stress-activated MAP kinase. *J. Cell. Physiol.* 191 (1): 69-81.

Laprise, P., Vallée, K., Demers, M.-J., Bouchard, V., Poirier, E.M., Vézina, A., Reed, J.C., Rivard, N., Vachon, P.H. (2003) Merosin (laminin-2/4)-driven survival signaling: complex modulations of Bcl-2 homologs. *J. Cell. Biochem.* 89 (6): 1115-25.

Levy, O.A., Malagelada, C., Greene, L.A. (2009) Cell death pathways in Parkinson's disease: proximal triggers, distal effectors, and final steps. *Apoptosis.* 14 (4): 478-500.

Liu, P., Cheng, H., Roberts, T.M., Zhao, J.J. (2009) Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* 8 (8): 627-44.

Jiang, K., Zhong, B., Gilvary, D.L., Corliss, B.C., Hong-Geller, E., Wei, S., Djeu, J.Y. (2000) Pivotal role of phosphoinositide-3 kinase in regulation of cytotoxicity in natural killer cells. *Nat. Immunol.* 1 (5): 419-25.

Maira, SM., Finan, P., Garcia-Echeverria, C. (2010) From the bench to the bed side: PI3K pathway inhibitors in clinical development. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 347: 209-239.

Martin, S.S., Vuori, K. (2004) Regulation of Bcl-2 proteins during anoikis and amorphosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1692: 145-7.

Matheny, R.W. Jr, Adamo, M.L. (2009) Current perspectives on Akt activation and Akt-ions. *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 234 (11): 1264-70.

Mazzoletti, M., Brogгинi, M. (2010) PI3K/AKT/mTOR inhibitors in ovarian cancer, *Curr. Med. Chem.* 17(36): 4433-4447.

Ménard, D., Beaulieu, J.-F., Boudreau, F., Perreault, N., Rivard, N., Vachon, P.H. (2005) Gastrointestinal tract (GI tract). In : Unsicker K, Krieglstein K, eds. *Cell signaling and growth factors in development.* Verlag : Wiley-VCH 755-90.

Minett, T.W., Tighe, B.J., Lydon, M.J., Rees, D.A. (1984) Requirements for cell spreading on polyHEMA coated culture substrates. *Cell Biol. Int. Rep.* 8 (2): 151-9.

Olanow, C.W. (2007) The pathogenesis of cell death in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 22 (Suppl 17): S335-42.

Okkenhaug, K. et al. (2002) Impaired B and T cell antigen receptor signalling in p110δ PI 3-kinase mutant mice. *Science* 297: 1031-1034.

- Pageot, L.P., Perreault, N., Basora, N., Francoeur, C., Magny, P., Beaulieu, J.-F. (2000) Human cell models to study small intestinal functions: recapitulation of the crypt-villus axis. *Microsc. Res. Tech.* 49 (4): 394-406.
- Pankow, S., Bamberger, C., Klippel, A., Werner, S. (2006) Regulation of epidermal homeostasis and repair by phosphoinositide 3-kinase. *J. Cell. Sci.* 119 (Pt 19): 4033-46.
- Paz-Ares L, Carnero A. (2010) Between bench and bed side: PI3K inhibitors. *Curr. Mol Pharmacol.* 3 (2): 79-90.
- Potten, C.S. (1997) Epithelial cell growth and differentiation. II. Intestinal apoptosis. *Am. J. Physiol.* 273 (2 Pt 1): G253-7.
- Redon, R., Muller, D., Caulee, K., Wanherdrick, K., Abecassis, J., du Manoir, S. (2001) A simple specific pattern of chromosomal aberrations at early stages of head and neck squamous cell carcinomas: PIK3CA but not p63 gene as a likely target of 3q26-qter gains. *Cancer Res.* 61 (10): 4122-9.
- Richardson, A., Shannon, J.D., Adams, R.B., Schaller, M.D., Parsons, J. (1997) Identification of integrin-stimulated sites of serine phosphorylation in FRNK, the separately expressed C-terminal domain of focal adhesion kinase: a potential role for protein kinase A. *Biochem. J.* 324 (Pt 1): 141-9.
- Perreault, N., Beaulieu, J.-F. (1996) Use of the dissociating enzyme thermolysin to generate viable human normal intestinal epithelial cell cultures. *Exp. Cell. Res.* 224 (2): 354-64.
- Peterson, G.L. (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83 (2): 346-56.
- Pinto, M., Robine-Leon, S., Appay, M.D., Kedinger, M., Triadou, N., Dussaulx, E., Lacroix, B., Simon-Assmann, P., Haffen, K., Fogh, J., Zweibaum, A. (1983) Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol. Cell.* 47: 323-330.
- Puri, K. D. et al. (2004) Mechanisms and implications of phosphoinositide 3-kinase delta in promoting neutrophil trafficking into inflamed tissue. *Blood* 103: 3448-3456.
- Rácz, A., Brass, N., Heckel, D., Pahl, S., Remberger, K., Meese, E. (1999) Expression analysis of genes at 3q26-q27 involved in frequent amplification in squamous cell lung carcinoma. *Eur. J. Cancer.* 35 (4): 641-6.
- Rathinam, R., Alahari, S.K. (2010) Important role of integrins in the cancer biology. *Cancer Metastasis Rev.* 29 (1): 223-37.

Roche, S., Downward, J., Raynal, P., Courtneidge, S.A. (1998) A function for phosphatidylinositol 3-kinase beta (p85alpha-p110beta) in fibroblasts during mitogenesis: requirement for insulin- and lysophosphatidic acid-mediated signal transduction. *Mol. Cell Biol.* 18(12): 7119-29.

Rousset, M., Chantret, I., Darmoul, D., Trugnan, G., Sapin, C., Green, F., Swallow, D., Zweibaum, A. (1989) Reversible forskolin-induced impairment of sucrase-isomaltase mRNA levels, biosynthesis, and transport to the brush border membrane in Caco-2 cells. *J. Cell. Physiol.* 141(3): 627-35.

Samuels, Y., Wang, Z., Bardelli, A., Silliman, N., Ptak, J., Szabo, S., Yan, H., Gazdar, A., Powell, S.M., Riggins, G.J., Willson, J.K., Markowitz, S., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Velculescu, V.E. (2004) High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* 304: 554.

Sanchez-Ramos, J., Song, S., Cao, C., Arendash, G. (2008) The potential of hematopoietic growth factors for treatment of Alzheimer's disease: a mini-review. *BMC Neurosci.* 9 (Suppl 2): S3.

Shayesteh L, Lu Y, Kuo WL, Baldocchi R, Godfrey T, Collins C, Pinkel D, Powell B, Mills GB, Gray JW. (1999) PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer. *Nat Genet.* 21(1): 99-102.

Shtilbans, V., Wu, M., Burstein, D.E. (2008) Current overview of the role of Akt in cancer studies via applied immunohistochemistry. *Ann. Diagn. Pathol.* 12(2): 153-60.

Straub, A., Wendel, H.P., Dietz, K., Schiebold, D., Peter, K., Schoenwaelder, S.M., Ziemer, G. (2008) Selective inhibition of the platelet phosphoinositide 3-kinase p110beta as promising new strategy for platelet protection during extracorporeal circulation. *Thromb. Haemost.* 99(3): 609-15.

Stupack, D.G., Cheresch, D.A. (2002) Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *J. Cell. Sci.* 115: 3729-3738.

Sujobert, P., Bardet, V., Cornillet-Lefebvre, P., Hayflick, J.S., Prie, N., Verdier, F., Vanhaesebroeck, B., Muller, O., Pesce, F., Ifrah, N., Hunault-Berger, M., Berthou, C., Villemagne, B., Jourdan, E., Audhuy, B., Solary, E., Witz, B., Harousseau, J.L., Himmerlin, C., Lamy, T., Lioure, B., Cahn, J.Y., Dreyfus, F., Mayeux, P., Lacombe, C., Bouscary, D. (2005) Essential role for the p110delta isoform in phosphoinositide 3-kinase activation and cell proliferation in acute myeloid leukemia. *Blood.* 106(3): 1063-6.

Thomson AB, Drozdowski L, Iordache C, Thomson BK, Vermeire S, Clandinin MT, (2003) Small bowel review: Diseases of the small intestine. *Dig. Dis. Sci.* 48(8): 1582-99.

Tremblay, E., Auclair, J., Delvin, E., Levy, E., Ménard, D., Pshezhetsky, A.V., Rivard, N., Seidman, E.G., Sinnett, D., Vachon, P.H., Beaulieu, J.-F., (2006) Gene expression profiles of normal proliferating and differentiating human intestinal epithelial cells: a comparison with the Caco-2 cell model. *J. Cell. Biochem.* 99(4): 1175-86.

Ueki, K. et al. (2002) Increased insulin sensitivity in mice lacking p85 β subunit of phosphoinositide-3-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 419-424.

Vachon, P.H., 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., Perreault, N., Magny, P., Beaulieu, J.-F. (1996) Uncoordinated, transient mosaic patterns of intestinal hydrolase expression in differentiating human enterocytes. *J. Cell. Physiol.* 166(1): 198-207.

Vachon, P.H., Cardin, É., Harnois, C., et al. (2000) Early establishment of epithelial apoptosis in the developing human small intestine. *Int. J. Dev. Biol.* 44: 891-8.

Vachon, P.H., Cardin, E., Harnois, C., et al. (2001) Early acquisition of bowel segment-specific Bcl-2 expression profiles during the development of the human ileum and colon. *Histol. Histopathol.* 16: 497-510.

Vachon, P.H., Harnois, C., Grenier, A., Dufour, G., Bouchard, V., Han, J., Landry, J., Beaulieu, J.-F., Vézina, A., Dydensborg, A.B., Gauthier, R., Côté, A., Drolet, J.-F., Lareau, F. (2002) Differentiation state-selective roles of p38 isoforms in human intestinal epithelial cell anoikis. *Gastroenterology* 123(6): 1980-91.

Vachon, P.H. (2006) *Survie cellulaire: différences et différenciation.* *Med. Sc.* 22: 423-9.

Vanhaesebroeck, B., Leever, S.J., Ahmadi, K., Timms, J., Katso, R., Driscoll, P.C., Woscholski, R., Parker, P.J., Waterfield, M.D. (2001) Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu. Rev. Biochem.* 70: 535-602.

Vanhaesebroeck, B., Guillermet-Guibert, J., Graupera, M., Bilanges, B. (2010) The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling *Nature Reviews Molecular Cell Biol.* 11: 329-341.

Vivanco, I., Sawyers, C. L. (2002) The phosphatidylinositol 3-kinase AKT pathway in human cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2: 489-501.

Vogt, P.K., Hart, J.R., Gymnopoulos, M., Jiang, H., Kang, S., Bader, A.G., Zhao, L., Denley, A. (2010) Phosphatidylinositol 3-kinase : the oncoprotein. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 347:79-104.

Weiner, T.M., Liu, E.T., Craven, R.J., Cance, W.G. (1993) Expression of focal adhesion kinase gene and invasive cancer. *Lancet* 342(8878): 1024-5.

Wymann, M.P., Pirola, L. (1998) Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1436(1-2):127-50.

Zhang, S., Yu, D. (2010) PI(3)kinase apart PTEN's role in cancer. *Clin. Cancer Res.* 16(17): 4325-30.

Zhao, L., Vogt, P.K. (2008) Class I PI3K in oncogenic cellular transformation. *Oncogene* 27(41): 5486-96.

Zhao, J., Guan, J.L. (2009) Signal transduction by focal adhesion kinase in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 28(1-2): 35-49