

Université de Sherbrooke

La double face de la protéine SOCS1 dans la carcinogenèse colorectale

Par
William Sam Tobelaim
Département d'anatomie et de 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, Canada
Avril, 2013

Membres du jury d'évaluation
Pre. Caroline Saucier, programme de biologie cellulaire
Pre. Julie Carrier, programme de biologie cellulaire
Pr. Pedro-Miguel Geraldès, département d'endocrinologie, Université de Sherbrooke

© Tobelaim, 2014

RÉSUMÉ

La double face de la protéine SOCS1 dans la carcinogenèse colorectale

Par

William Sam Tobelaim

Département d'anatomie et de biologie cellulaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme 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

Historiquement, SOCS1 a été décrite comme une protéine capable de réguler négativement la signalisation induite par les cytokines. Dès lors, un vif engouement s'est porté sur cette protéine quant à un probable rôle de suppresseur de tumeur, notamment grâce à ses fonctions anti-inflammatoires. De surcroît, son expression est fréquemment perdue dans de nombreux cancers des suites de phénomènes épigénétiques. Récemment, il a même été démontré que SOCS1 pouvait rentrer en complexe protéique avec le suppresseur de tumeur P53, et était requis pour son activité transcriptionnelle. Finalement, notre laboratoire a participé à démontrer que SOCS1 inhibait la signalisation et les fonctions du récepteur MET dans les hépatocytes. Étant donné l'influence bien connue de l'inflammation, de l'épigénétique, de P53 et de MET dans le cancer colorectal (CCR), nous avons émis l'hypothèse que SOCS1 agirait en tant que suppresseur de tumeur dans le CCR.

Dans la présente étude, nous avons modulé l'expression de SOCS1 dans un modèle cellulaire de progression tumorale colique, soit les cellules CT36 et CT26. Puis, les caractéristiques biologiques dites cancéreuses de ces lignées ont été évaluées *in-cellulo* et *in-vivo*. Contre toute attente, nos résultats révèlent une action pro-tumorale menée par SOCS1 dans le CCR. La surexpression de SOCS1 dans les cellules CT26 provoque une augmentation de la croissance cellulaire, de la survie sans ancrage à la matrice extracellulaire et de la capacité à former des tumeurs *in vivo*. Et à l'inverse, sa diminution, par ARN interférent, provoque chez les cellules CT36 une baisse de ces mêmes fonctions cancéreuses. Au niveau moléculaire, nous avons validé que SOCS1 conservait bien son aptitude à inhiber les voies de signalisation des cytokines et du récepteur MET ainsi qu'à promouvoir l'activité de p53. Nous avons aussi identifié que SOCS1 diminue l'expression des protéines STAT1, P21cip/kip, et de la protéine adaptatrice P66SHC.

En conclusion, ce travail de recherche révèle, pour la première fois, que l'expression de SOCS1 favoriserait le développement de certains CCR. Les protéines STAT1, P21 cip/kip et P66SHC étant connues pour être impliquées dans des processus antiprolifératifs et pro-apoptotiques, leurs régulations négatives par SOCS1 pourraient en être les raisons.

Mots clés : SOCS1, CCR, MET, STAT1, P53, P21, P66SHC, inflammation

« *Je me souviens* »

TABLE DES MATIERES

Résumé	iii
Table des matières	iv
Liste des figures	vii
Liste des tableaux	viii
Liste des abréviations	ix
Introduction	1
1. <i>Famille protéique SOCS et signalisation des cytokines</i>	1
1.1 Découverte des protéines SOCS	1
1.2 Transduction du signal induit par les cytokines : La signalisation JAK/STAT	2
1.3 Structure protéique détaillée de SOCS1	5
2. <i>SOCS1: Un suppresseur de tumeur</i>	7
2.1 SOCS1 inhibe la signalisation des cytokines et régule l'inflammation	7
2.2 SOCS1 promeut l'activation du suppresseur de tumeur p53	9
2.3 Implication de SOCS1 dans la régulation négative des récepteurs tyrosine kinase	11
2.4 L'expression de SOCS1 est fréquemment diminuée dans les cancers	16
3. <i>La cancérogenèse colorectale</i>	18
3.1 Généralités	18
3.2 SOCS1 et la carcinogenèse colorectale	20
<i>Hypothèse et objectifs de recherche</i>	21
Matériel et méthodes	22
1. <i>Vecteurs et ADN</i>	22
2. <i>Culture cellulaire</i>	22
2.1 Génération des lignées cellulaire CT26 exprimant pLPCX ou Flag-SOCS1 et des lignées cellulaire CT36 exprimant un Sh contrôle ou ciblant SOCS1	23
3. <i>Analyse de l'ARNm</i>	24
3.1 Extraction de l'ARN et réaction de transcription inverse	24

3.2 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	25
4. <i>Analyse protéique</i>	25
4.1 Transfection transitoire	25
4.2 Réalisation des lysats cellulaires	25
4.3 Immunobuvardages	26
4.4 Production des protéines de fusion GST-SOCS1 et essai d'interaction protéique in vitro	27
5. <i>Tests biologiques in cellulo</i>	28
5.1 Essai de croissance cellulaire	28
5.2 Croissance en agar mou	28
5.3 Survie en suspension	29
6. <i>Essais de tumorigenèse in vivo</i>	30
7. <i>Analyse statistique</i>	30
Résultats	31
1. <i>Mise en place d'un modèle expérimentale pour l'étude de SOCS1 dans le CCR</i>	31
1.1 Expression différentielle de SOCS1 dans le modèle cellulaire CCR CT26/CT36	31
1.2 Validation de la modulation de l'expression de SOCS1 dans le modèle cellulaire CT26/CT36	32
2. <i>Caractérisation in cellulo et in vivo des propriétés cancéreuses des lignées CT26 Flag-SOCS1 et CT36 sh-SOCS1</i>	34
2.1 La modulation de l'expression de SOCS1 n'affecte pas la morphologie cellulaire du modèle CT26/CT36	34
2.2 SOCS1 augmente la croissance cellulaire des cellules CT26 et CT36	35
2.3 SOCS1 augmente la capacité des cellules CT26 à croître en indépendance d'ancrage	36
2.4 SOCS1 augmente la capacité de CT26 et des CT36 à résister à l'anoïkose	39
2.5 SOCS1 augmente la capacité des CT26 à former des tumeurs in vivo	40
3. <i>Caractérisation de l'influence de SOCS1 sur la signalisation intracellulaire des CT26</i>	43
3.1 SOCS1 régule négativement la signalisation des cytokines induite par l'IFNg	43
3.2 SOCS1 inhibe l'expression du récepteur Met dans les CT26	44
3.3 SOCS1 favorise l'activation de p53 suite à un dommage à l'ADN mais réprime l'expression de P21 cip/kip	49
Discussion	51
1. <i>SOCS1 amplifie les caractéristiques cancéreuses des lignées CCR CT26/CT36</i>	51

1.1 Limites expérimentales et perspectives	52
2. <i>Rôle de SOCS1 dans le cancer : la controverse prend de l'ampleur</i>	53
3. <i>Évidences moléculaires de l'activité pro-tumorale de SOCS1 dans les cellules de CCR</i>	54
3.1 SOCS1 régule la signalisation antiproliférative JAK1/STAT1	54
3.2 SOCS1 inhibe l'expression du récepteur Met, mais paradoxalement conserve une action pro-tumorale dans la lignée CT26	56
3.3 SOCS1 régule négativement l'expression du suppresseur de tumeur p66SHC	57
3.4 SOCS1 régule négativement l'expression du suppresseur de tumeur p21	59
4. <i>Modèle moléculaire proposé pour le rôle pro-tumoral de SOCS1 dans le CCR</i>	60
5. <i>La double face de SOCS1 dans le CCR</i>	61
Conclusion	63
Références	65

LISTE DES FIGURES

Introduction

Figure 1. Structure protéique de la famille SOCS	2
Figure 2. Signalisation JAK/STAT et son rétrocontrôle par les protéines SOCS	4
Figure 3. Structure protéique de la protéine SOCS1	6
Figure 4. Mécanismes de l'inhibition de la signalisation JAK/STAT par SOCS1	8
Figure 5. Complexe protéique nucléaire composé de SOCS1, l'ATM/ATR et p53	10
Figure 6. Principales voies de signalisations induites par le récepteur Met suite à son activation par son ligand HGF	13

Résultats

Figure 7. Expression différentielle de l'ARNm endogène de SOCS1 dans le modèle cellulaire CCR CT26/CT36	32
Figure 8. Modulation de l'expression de SOCS1 dans le modèle cellulaire CT26/CT36	33
Figure 9. La modulation de l'expression de SOCS1 n'affecte pas la morphologie cellulaire du modèle CT26/CT36	35
Figure 10. SOCS1 augmente la croissance cellulaire du modèle CT26/CT36	36
Figure 11. L'expression de SOCS1 n'a pas d'incidence sur la capacité des CT26 à former des colonies en agar mou, mais augmente leurs capacités à croître en indépendance d'ancrage	38
Figure 12. SOCS1 augmente la survie des cellules CT26/CT36 en suspension	40
Figure 13. SOCS1 augmente la capacité des CT26 à former des tumeurs sous-cutanées dans les souris BALB/c et les NOD scid gamma.	42
Figure 14. SOCS1 régule négativement l'activation du facteur STAT1 induite par l'IFN γ dans la lignée cellulaire CT26.	44
Figure 15. SOCS1 régule négativement l'expression du récepteur Met ainsi que son activation suite à l'induction à l'HGF dans la lignée cellulaire CT26.	45
Figure 16. SOCS1 interagit et régule négativement l'expression exogène de P66SHC dans les cellules HEK 293.	47
Figure 17. SOCS1 régule négativement l'expression de P66SHC dans la lignée cellulaire CT26.	48
Figure 18. SOCS1 induit l'expression et l'activation de P53, mais paradoxalement réprime l'expression de P21 une de ses cibles transcriptionnelle.	50

Discussion

Figure 19. Modèle proposé illustrant l'implication moléculaire de SOCS1 responsable de son action pro-tumoral	60
Figure 20. Modèle représentant la double face de SOCS1 dans le CCR	62

LISTE DES TABLEAUX

Introduction

Tableau 1. La protéine SOCS1 dans le rétrocontrôle de la voie JAK/STAT.	7
Tableau 2. Cancers impliquant une dérégulation du couple HGF/MET.	14
Tableau 3. Compilation des études cliniques rapportant une fonction supposée de suppresseur de tumeur ou d'oncogène pour SOCS1 dans les cancers Humains.	17
Tableau 4. Cancers présentant une hyperméthylation du promoteur du gène socs1.	18

Matériel et méthodes

Tableau 5. Liste des anticorps primaires utilisés pour les immunobuvardages.	27
---	----

Discussion

Tableau 6. Rôle pro-tumoral joué par SOCS1 dans le modèle cellulaire CCR CT26/36	52
---	----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATR	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3 related</i>
CCR	Cancer colorectal
CH1	<i>Collagen-Homology-1</i>
CH2	<i>Collagen-Homology-2</i>
CIN	<i>Chromosomal Instability</i>
CIMP	<i>CpG Island Methylator Phenotype</i>
CIS	<i>Cytokine-Inducible SH2-containing</i>
CpG	<i>Cytosines Preceding a Guanine</i>
CSF	<i>Colony-Stimulating Factor</i>
DMEM	<i>Dulbecco 's modified Eagle's medium</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
FBS	<i>Fetal bovin serum</i>
Gab1	<i>Grb2-associated Binder 1</i>
Grb2	<i>Growth-factor receptor binding 2</i>
GST	<i>Glutathione S-transferase</i>
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HA	Hémagglutinine
HEK 293	<i>Human Embryonic Kidney 293 cells</i>
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
IB	Immunobuvardage
IEC-6	<i>rat Intestinal Epithelial Cells-6</i>
INFg	<i>Interferon gamma</i>
IFNGR	<i>Interferon gamma receptor</i>
IP	Immunoprécipitation
IPTG	Isopropyl-b-D-thiogalactopyranoside
JAK	Janus Kinase
kDa	Kilodalton
KIR	<i>Kinase Inhibitory Region</i>
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MEC	Matrice extracellulaire
NLS	<i>Nuclear Localization Signal</i>
MEF	<i>Mouse embryonic fibroblasts</i>
MSI	<i>Microsatellite Instability</i>
O/N	<i>Overnight</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PDGFR	<i>Platelet-derived growth factor receptor</i>
PH	<i>Pleckstrin Homology Domain</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinases</i>
PTB	<i>Phosphotyrosine binding domain</i>
pTyr	Phosphotyrosine
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>

RAS	<i>Rat sarcoma</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RTK	<i>Receptor tyrosine kinase</i>
SD	<i>Standard deviation</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SH	<i>Small hairpin</i>
SH2	<i>Src-Homology-2</i>
SH3	<i>Src-Homology-3</i>
SHC	<i>Src Homology 2 domain containing transforming protein</i>
SOCS	<i>Suppressor Of Cytokine Signaling</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
TEM	<i>Transition épithéliale-mésenchymateuse</i>
Tyr	<i>Tyrosine</i>
UV	<i>Ultraviolet</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
WT	<i>Wild type</i>

INTRODUCTION

La première partie de ce mémoire sera dédiée aux grandes généralités de la famille protéique SOCS (*Suppressor Of Cytokine Signaling*), et plus précisément à la protéine SOCS1 sur laquelle s'est concentré mon travail de recherche. Originellement décrite comme une protéine régulant la transduction du signal en aval des cytokines, l'inhibition de la voie JAK/STAT par SOCS1 sera donc particulièrement traitée. Dans une deuxième partie, le rôle de suppresseur de tumeur joué par SOCS1 dans les cancers sera développé. Nous verrons son impact dans le contrôle de l'inflammation ainsi que dans la régulation du suppresseur de tumeur p53 et des voies de signalisations de certains récepteurs tyrosine kinase (RTK). Enfin la troisième partie sera consacrée à la cancérogénèse colorectale. Cette partie aura pour objet de présenter les évidences qui nous ont amenées à faire le lien entre la progression du cancer colorectal CCR et la protéine SOCS1. Ce sera au terme de cette introduction que l'hypothèse ainsi que les objectifs de recherche seront développés.

1. Famille protéique SOCS et signalisation des cytokines

1.1 Découverte des protéines SOCS

La famille protéique SOCS comporte huit membres qui correspondent aux protéines SOCS1, SOCS2, SOCS3, SOCS4, SOCS5, SOCS6, SOCS7 et CIS (*Cytokine-Inducible SH2-containing*). Les membres de cette famille partagent une structure commune, incluant une région N-terminale de taille variable, un domaine SH2 (*Src-homolgy-2*) et un domaine SOCS BOX en position C-terminale (**Figure 1**). La protéine CIS fut la première à avoir été découverte en 1995 par l'équipe du Pr Yoshimura lors d'un criblage visant à identifier des gènes induits par les cytokines (Yoshimura et al., 1995). Puis, en 1997, quatre équipes ont indépendamment cloné et caractérisé la protéine SOCS1 selon des approches différentes. Par un essai double hybride, l'équipe de Endo l'a identifié comme une protéine interagissant avec la kinase JAK « Janus Kinase » et la nomma JAB pour « JAK Binding Protein » (Endo TA, 1997). Naka et ses collaborateurs ont remarqué une homologie de

séquence avec le facteur STAT3, et l'ont appelée SSI1, pour « STAT-Induced STAT Inhibitor 1 » (Naka et al., 1997). L'équipe d'Ohya, l'a nommée TIP3 pour « Tec Interacting Protein3 » suite à une expérience double hybride (Ohya et al., 1997). Enfin, l'équipe de Starr, lors d'un criblage dirigé contre des protéines capables d'inhiber la signalisation induite par l'IL-6, l'a nommée SOCS1 (Starr et al., 1997). Parmi ces quatre différents noms proposés en 1997, la nomenclature SOCS s'est aujourd'hui imposée dans la littérature.

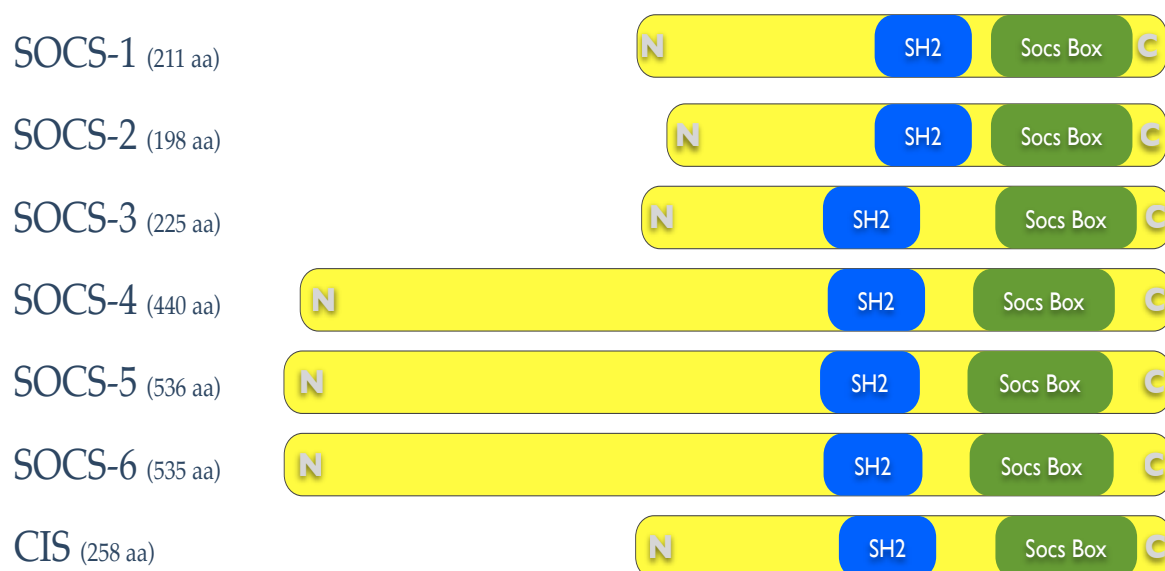


Figure 1. Structure protéique de la famille SOCS

Les protéines de la famille SOCS présentent un domaine N-terminal de taille variable, un domaine SH2 « Src Homology 2 » qui permet l'association avec des phosphotyrosines (pTyr), et un domaine Socs Box permettant le recrutement d'un complexe ubiquitine-ligase E3 associé avec la dégradation protéasomale.

1.2 Transduction du signal induit par les cytokines : La signalisation JAK/STAT

Les cytokines forment une large famille de glycoprotéines sécrétées par de nombreux types cellulaires. Elles sont à l'origine d'une grande pléiotropie, qui va, entre autre, depuis l'hématopoïèse à l'immunité en passant par le développement du système nerveux ou encore les processus de cicatrisation (Krebs and Hilton, 2001). La signalisation débute par la liaison d'une cytokine à son récepteur membranaire spécifique (**Figure 2**). Les récepteurs aux cytokines sont dépourvus d'activité kinase intrinsèque, mais lient

séquence avec le facteur STAT3, et l'ont appelée SSI1, pour « STAT-Induced STAT Inhibitor 1 » (Naka et al., 1997). L'équipe d'Ohya, l'a nomma TIP3 pour « Tec Interacting Protein3 » suite à une expérience double hybride (Ohya et al., 1997). Enfin, l'équipe de Starr, lors d'un criblage dirigé contre des protéines capables d'inhiber la signalisation induite par l'IL-6, l'a nommée SOCS1 (Starr et al., 1997). Parmi ces quatre différents noms proposés en 1997, la nomenclature SOCS s'est aujourd'hui imposée dans la littérature.

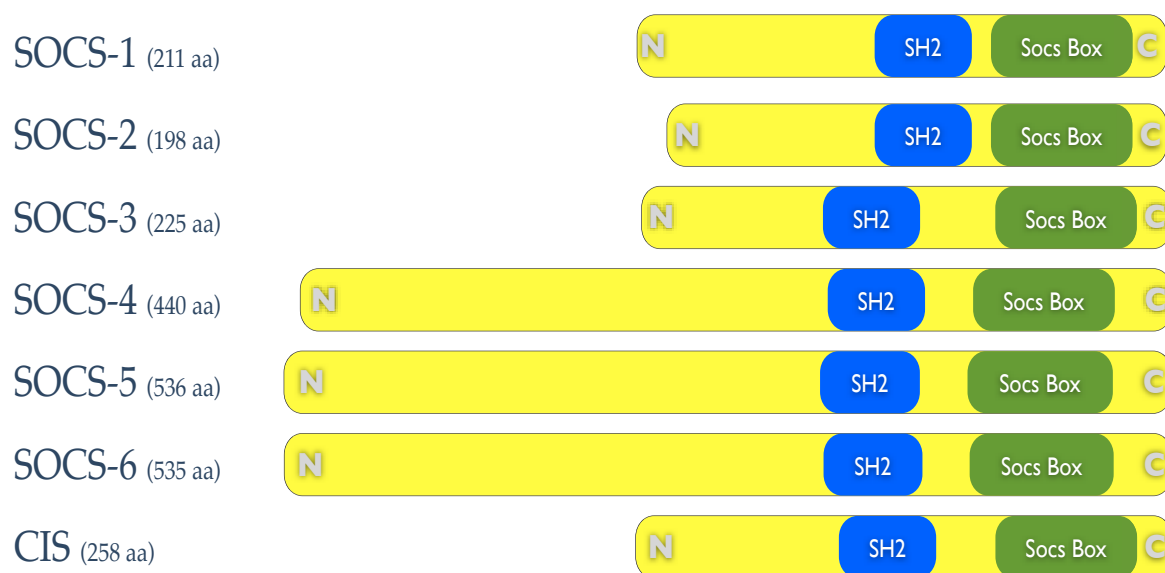


Figure 1. Structure protéique de la famille SOCS

Les protéines de la famille SOCS présentent un domaine N-terminal de taille variable, un domaine SH2 « Src Homology 2 » qui permet l'association avec des phosphotyrosines (pTyr), et un domaine Socs Box permettant le recrutement d'un complexe ubiquitine-ligase E3 associé avec la dégradation protéasomale.

1.2 Transduction du signal induit par les cytokines : La signalisation JAK/STAT

Les cytokines forment une large famille de glycoprotéines sécrétées par de nombreux types cellulaires. Elles sont à l'origine d'une grande pléiotropie, qui va, entre autre, depuis l'hématopoïèse à l'immunité en passant par le développement du système nerveux ou encore les processus de cicatrisation (Krebs and Hilton, 2001). La signalisation débute par la liaison d'une cytokine à son récepteur membranaire spécifique (**Figure 2**). Les récepteurs aux cytokines sont dépourvus d'activité kinase intrinsèque, mais lient

constitutivement les protéines de la famille des tyrosines kinases de type JAK (Janus Kinase). La liaison d'une cytokine au récepteur provoque le rapprochement des JAK, ce qui enclenche leur activation par trans-autophosphorylation (Hanada and Yoshimura, 2002). Une fois actives, elles peuvent phosphoryler des résidus tyrosine de la queue cytoplasmique du récepteur, ce qui va favoriser le recrutement des facteurs de transcription STAT. À leurs tours, les STAT vont être phosphorylées par les kinases JAK, ce qui induit leur dissociation du récepteur et leur dimérisation. Cette nouvelle conformation confère aux STAT la capacité de transloquer au noyau et d'agir en tant que facteurs de transcription et ainsi être à l'origine des effets biologiques présentés plus haut.

Parmi les cibles transcriptionnelles des facteurs STAT, on retrouve entre autres les gènes codants pour les protéines SOCS. Ces dernières agissent en tant que régulateur négatif de la signalisation JAK/STAT. On parle donc, d'une boucle de rétrocontrôle négatif visant à réguler finement cette signalisation, qui dérégulée, est connue pour favoriser des pathologies d'ordre allergiques, inflammatoires ou cancéreuses (Yoshimura, 2009).

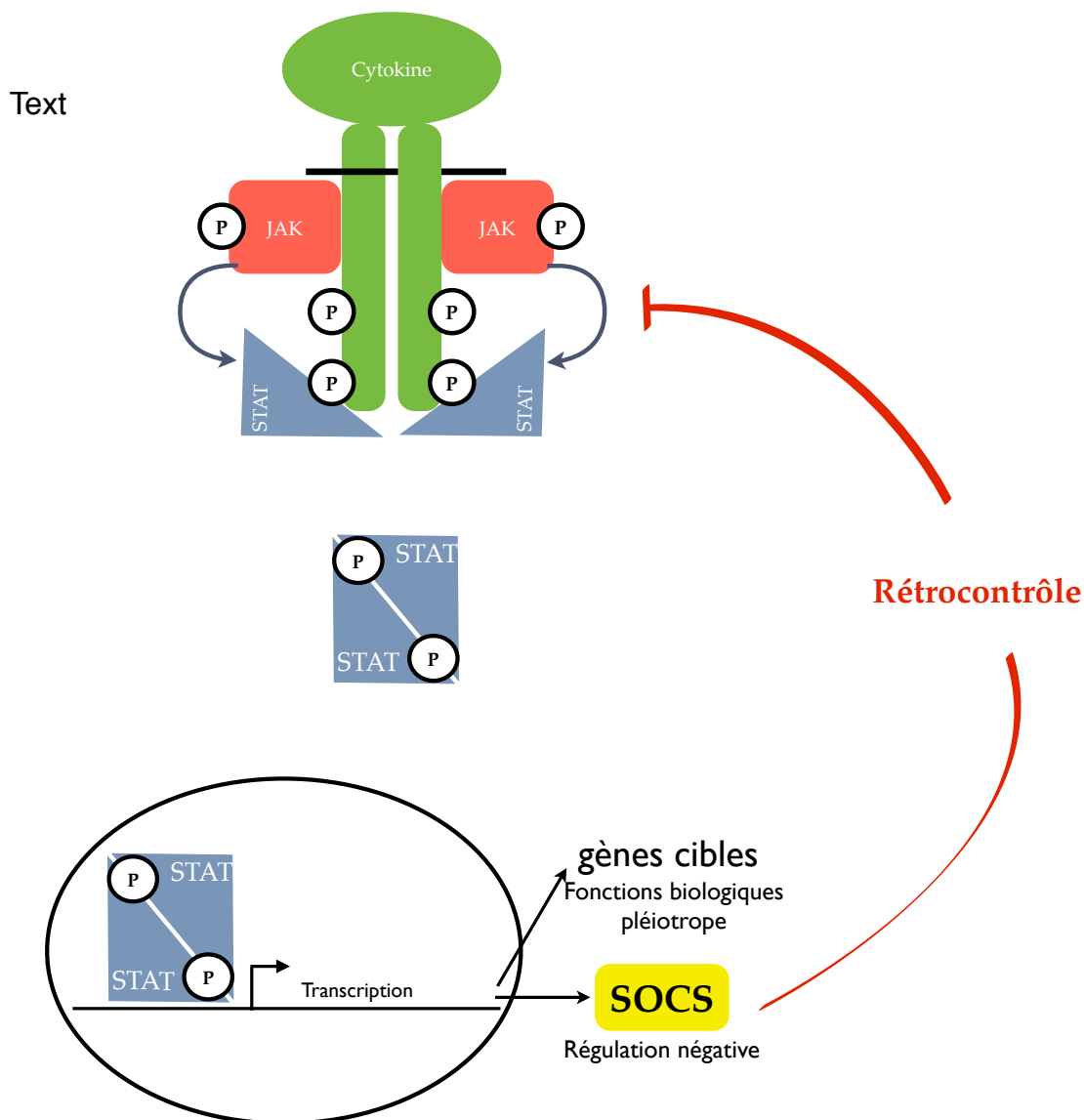


Figure 2. Signalisation JAK/STAT et son rétrocontrôle par les protéines SOCS

Suite à la fixation d'une cytokine à son récepteur spécifique, les kinases JAK vont s'activer et favoriser le recrutement des facteurs STAT. Ces derniers vont, à leurs tours, s'activer, et induire la transcription de nombreux gènes cibles. Parmi eux, les gènes *socs* sont impliqués dans une boucle de rétrocontrôle visant à réguler négativement la signalisation JAK/STAT.

1.3 Structure protéique détaillée de SOCS1

Le gène *SOCS1* de souris et de rat encode pour une protéine de 212 acides aminés, alors que le gène humain encode pour une protéine de 211 acides aminés. Bien que la protéine SOCS1 ne soit pas exprimée chez les bactéries, elle est très conservée chez les mammifères. Les protéines humaine, de rat et de souris partagent une homologie en acide aminé de 95 à 99% (Starr et al., 1997).

La structure protéique détaillée de SOCS1 est la suivante (**Figure 3**). Elle comprend **un domaine PEST** en position N-terminale (Ohya et al., 1997). Ce domaine consiste en une séquence peptidique riche en acides aminés, proline (P), acide glutamique (E), serine (S), et thréonine (T). Les protéines contenant cette séquence ont été décrites comme ayant un temps de demi vie court, de moins de deux heures (Rogers et al., 1986). Le domaine PEST d'une protéine pourrait donc agir comme un signal peptidique visant à promouvoir la protéolyse via le protéasome (Reverte et al., 2001) ou par la protéase Calpain (Shumway et al., 1999).

Deux **motifs di-prolines**, de classe1 (PxxPxR) et de classe2 (RPxPxxP), se retrouvent dans la partie N-terminale de SOCS1. Ces motifs permettent une liaison de haute affinité avec les domaines SH3 (*Src Homology 3*) (Pawson, 1995). A ce sujet, il a été montré que la protéine adaptatrice GRB2 pouvait se lier à SOCS1 grâce à ses domaines SH3 (De Sepulveda et al., 1999).

Le **domaine KIR** (Kinase Inhibitory Region) de SOCS1 permet l'inhibition de l'activité enzymatique des kinases JAK. Il a été proposé que le domaine KIR, via sa ressemblance avec la boucle d'activation des JAK, pouvait agir en tant pseudo-substrat (Yasukawa et al., 1999). De cette manière SOCS1 empêcherait la phosphorylation des substrats légitimes pour JAK tels que les STATS.

Un **domaine SH2 (Src Homology 2 domain)** se retrouve en position centrale. Ce domaine protéique est connu pour interagir spécifiquement avec des pTyr. Il permet notamment à SOCS1 de se fixer directement à la pTyr (Y1007) de la boucle d'activation kinasique de la protéine JAK2 (Yasukawa et al., 1999). Cependant, de manière intéressante, le domaine SH2 de SOCS1 est considéré comme atypique, car il a été décrit pour permettre une

interaction pTyr-indépendante avec la protéine VAV (De Sepulveda et al., 2000). Par ailleurs, le domaine ESS pour « Extended SH2 Subdomain) » a été décrit pour être nécessaire à la complète fonctionnalité du domaine SH2 (Sasaki et al., 1999).

Une **séquence NLS (Nuclear Localization Signal)** a récemment été identifiée dans la protéine SOCS1, ce qui permet sa translocation nucléaire (Baetz et al., 2008). Sa localisation intracellulaire, nucléaire ou cytoplasmique, jouerait un rôle crucial dans la fonctionnalité de SOCS1 (Koelsche et al., 2009).

Un **domaine SOCS box**, de 40 acides aminés dans la partie C-terminale de SOCS1, permet le recrutement des protéines élongines B et C, ce qui forme un complexe protéique de type ubiquitine (Ub) ligase E3 (Zhang et al., 1999). Ce dernier est connu pour induire l'ubiquitination ainsi que la dégradation protéasomale subséquente des protéines cibles auxquelles il se fixe (Kile and Alexander, 2001). La kinase JAK2, a été la première cible de SOCS1 à avoir été décrite (Frantsve et al., 2001).



Figure 3. Structure protéique de la protéine SOCS1

Domaines protéiques principaux composant la protéine SOCS1. Un domaine PEST impliqué dans les processus protéolytiques. Deux motifs di-prolines, de classe1 et de classe2 caractérisés pour permettre les interactions avec les domaines protéiques SH3. Un domaine KIR pour l'inhibition de l'activité kinasique des JAK. Un domaine SH2 permettant les interactions protéine-protéine avec des tyrosines phosphorylés. Une séquence NLS permettant la translocation nucléaire de SOCS1. Enfin un domaine SocsBOX permettant une activité Ub-ligase.

2. SOCS1: Un suppresseur de tumeur

2.1 SOCS1 inhibe la signalisation des cytokines et régule l'inflammation

Les protéines SOCS sont généralement exprimées à de faibles niveaux, voire indétectables, dans les cellules. Rapidement induites par un large éventail de cytokines, les protéines SOCS, en retour, contrôlent la durée ainsi que l'intensité de la réponse de la cellule à la stimulation induite cytokines. Toutefois, de nombreuses évidences indiquent une spécificité parmi les protéines SOCS à réguler les différentes signalisations engendrées par les nombreuses cytokines (Fujimoto and Naka, 2010). En ce qui concerne SOCS1, son implication dans le rétrocontrôle de la voie de signalisation JAK/STAT induite par les cytokines est résumée dans le **Tableau 1**.

Cytokines inductrices de SOCS1	Facteurs de transcriptions STAT inducteurs de SOCS1	Principales signalisations inhibées par SOCS1
Epo, GH, PRL, LIF, G-CSF, GM-CSF, CNTF, IFN α/β , IFN γ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-13	STAT1, STAT3, STAT6	IFN γ , IL-2, IL-4

Tableau 1. La protéine SOCS1 dans le rétrocontrôle de la voie JAK/STAT

Basés sur les études de (Alexander, 2002; Croker et al., 2008; Naka et al., 1997; Saito et al., 2000)

Actuellement, on retrouve dans la littérature trois mécanismes moléculaires sous-jacents à l'inhibition des voies JAK/STAT par SOCS1 (**Figure 4**). Le premier consiste en l'inhibition de l'activité catalytique des kinases JAK par SOCS1. Le domaine SH2 permet une interaction directe avec les tyrosines phosphorylées de la poche catalytique des JAK, comme par exemple avec la pTyr1007 de JAK2 (Narazaki et al., 1998; Yasukawa et al., 1999). Le domaine KIR, en plus d'augmenter l'affinité de cette interaction, a été décrit comme agissant en tant que pseudo-substrat et ainsi empêcher la transduction du signal en aval (Yasukawa et al., 1999). Le deuxième propose que SOCS1 pourrait interagir avec des pTyr dans la partie cytoplasmique des récepteurs aux cytokines, comme c'est le cas pour la

pTyr441 du récepteur à l'interféron gamma 1 (IFNGR) (Qing et al., 2005). Cette interaction empêche le recrutement des facteurs de transcription STAT au récepteur et donc leurs activations. On parle d'inhibition de la transduction du signal par compétition. Enfin le domaine SOCS box, de par sa capacité à recruter un complexe protéique E3-Ub ligase, va promouvoir l'ubiquitination ainsi que la dégradation protéasomale de la kinase JAK (Kamizono et al., 2001).

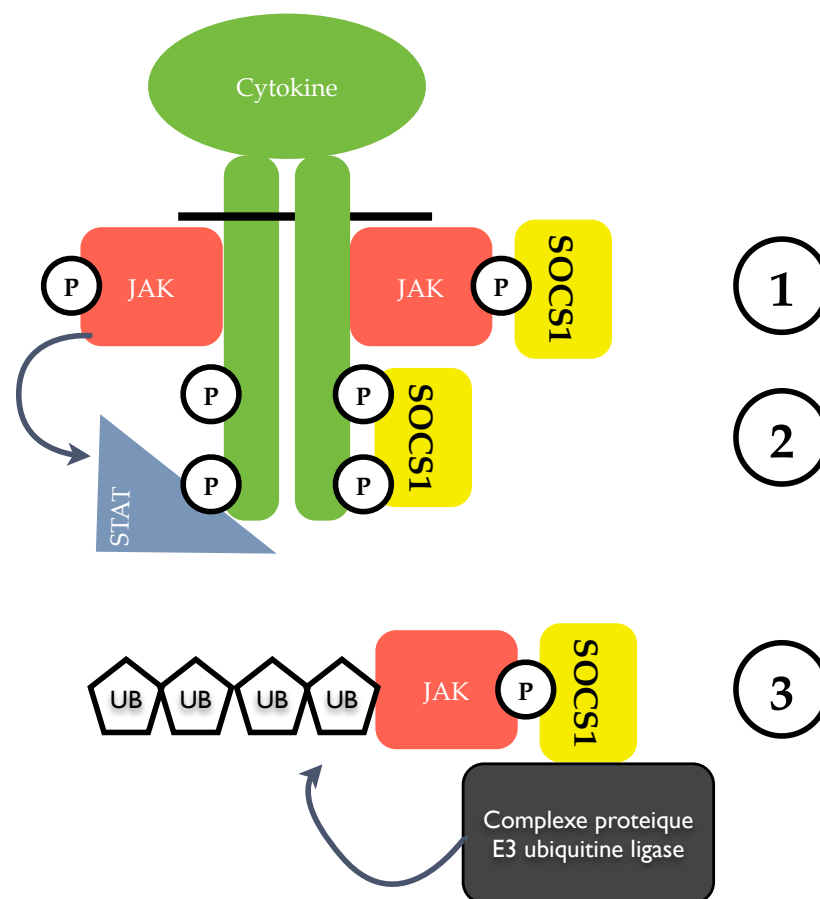


Figure 4. Mécanismes de l'inhibition de la signalisation JAK/STAT par SOCS1

① SOCS1 interagit directement avec la kinase JAK et agit en tant que pseudo-substrat. ② SOCS1 peut lier les résidus tyrosines phosphorylés du récepteur et ainsi compétitionner avec les facteurs STAT pour accéder au récepteur. ③ Grâce au recrutement d'un complexe Ub-ligase E3, SOCS1 promeut l'ubiquitination, ainsi que la dégradation protéasomale de la kinase JAK.

L'action des cytokines sur la signalisation JAK/STAT est largement décrite dans la littérature pour son implication dans les fonctions cellulaires telles que la différenciation, la prolifération ou encore l'apoptose. À ce titre, la voie JAK/STAT joue un rôle majeur dans l'initiation et le développement des cancers. Une activation constitutive de la voie JAK/STAT, par la protéine de fusion TEL/JAK2, induit une transformation des cellules hématopoïétiques via une activation incontrôlée des facteurs de transcription STAT (Schwaller et al., 1998). La surexpression de SOCS1 inhibe les caractéristiques cancéreuses de ces cellules transformées, notamment en abolissant l'activation des STAT. Plusieurs équipes ont montré que SOCS1 induisait l'ubiquitination et la dégradation de l'oncoprotéine TEL/JAK2 (Frantsve et al., 2001; Kamizono et al., 2001).

La corrélation entre l'inflammation et le cancer est aujourd'hui évidente. En plus d'offrir un cadre favorable à l'émergence du cancer, l'inflammation est source d'altérations génétiques (Grivennikov, 2013). Les souris invalidées pour le gène *socs1* ont la caractéristique de présenter une mortalité néonatale à quelques semaines, notamment des suites d'une inflammation aberrante (Marine et al., 1999). La cause de ce phénotype observé a été grandement attribuée à une réponse incontrôlée à l'INFg, car les souris *socs1*^{-/-} traitées à la naissance avec des anticorps anti-IFNg ont une espérance de vie accrue (Alexander et al., 1999). En 2006, Hanada et collaborateurs, ont caractérisé le modèle murin *socs1*^{-/-}*TG*, dans lequel l'expression de SOCS1 est restaurée conditionnellement dans les lignées lymphocytaires B et T, et qui a la particularité d'avoir une espérance de vie d'environ un an. Ils ont remarqué une très forte inflammation du colon ainsi que l'apparition de tumeurs spontanées précoces à 6 mois (Hanada et al., 2006). D'une manière intéressante, ils ont constaté que la formation de ces tumeurs spontanées était dépendante de l'IFNg, dans la mesure où les souris traitées avec des anticorps anti-IFNg en étaient épargnées. Les auteurs ont donc proposé que SOCS1 pouvait empêcher l'apparition des CCR d'origine inflammatoire via son action répressive de la signalisation de l'INFg (Hanada et al., 2006).

2.2 SOCS1 promeut l'activation du suppresseur de tumeur p53

En 2009, un nouvel aspect des fonctions anti-tumorales de SOCS1 a été décrit (Calabrese et al., 2009). L'équipe du professeur Ferbeyre a découvert un mécanisme

d'activation du suppresseur de tumeur p53 par SOCS1 dans un contexte où STAT5 est activé constitutivement. En reliant la signalisation JAK/STAT, à celle de p53, SOCS1 permettrait à la cellule de se prémunir d'une activation aberrante des cytokines en promouvant la sénescence. Le mécanisme moléculaire proposé est que SOCS1 peut interagir directement avec p53 via son domaine SH2 et avec les sérine/thréonine kinases ATM et ATR via son domaine SOCS Box (Figure 5). L'ATM/ATR engendre la phosphorylation de p53 sur sa sérine 15, ce qui est considérée comme un événement majeur dans sa stabilisation et son activation (Meek and Anderson, 2009). Ces données supportent donc un modèle dans lequel SOCS1 formerait un complexe protéique avec p53 et l'ATM/ATR, ce qui favoriserait l'activité transcriptionnelle de p53 aboutissant à la sénescence. Le complexe protéique formé par p53 et l'ATM/ATR étant nucléaire, SOCS1 transloquerait au noyau grâce à sa séquence NLS, et favoriserait la rencontre entre p53 et l'ATM/ATR au noyau.

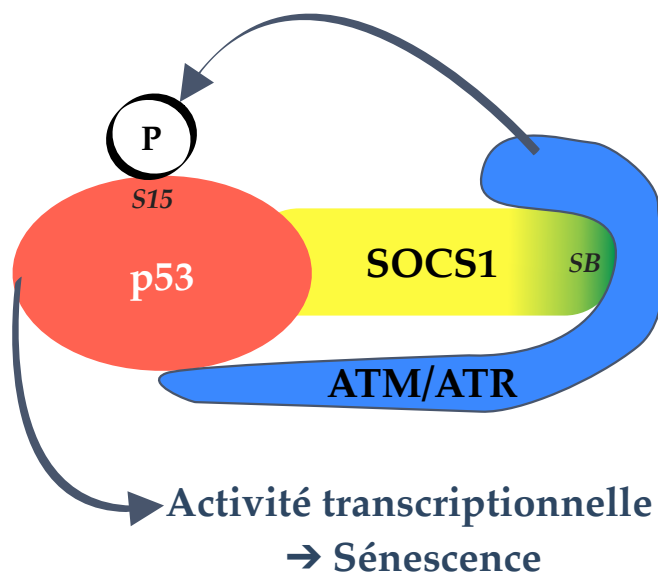


Figure 5. Complexe protéique nucléaire composé de SOCS1, l'ATM/ATR et p53

Ce complexe protéique a pour conséquence l'activation de p53 via sa phosphorylation sur sa sérine 15, ce qui favorise son activité transcriptionnelle aboutissant à la sénescence (Calabrese et al., 2009).

2.3 Implication de SOCS1 dans la régulation négative des récepteurs tyrosine kinase

Depuis leurs découvertes il y a 25 ans, les récepteurs tyrosine kinase (RTK) ont été décrits comme des acteurs prépondérants dans les processus cellulaires tels que la prolifération, la différenciation, la survie cellulaire, la migration ou encore le métabolisme (Lemmon and Schlessinger, 2010). Il existe 58 RTK connus chez l'humain et sont subdivisés en 20 sous familles. Tous les RTK ont une architecture moléculaire similaire qui comprend un domaine extracellulaire de liaison au ligand, une hélice transmembranaire, et une région cytoplasmique qui contient le domaine kinasique et une région impliquée dans le recrutement de protéines de signalisations. Ces dernières sont recrutées suite à l'activation du RTK et initient la transduction du signal intracellulaire en vue d'induire la transcription de gènes cibles au noyau.

L'activation aberrante des RTK et de leurs voies de signalisations est responsable d'un grand nombre de pathologies, dont les cancers. Aujourd'hui, la compréhension des mécanismes moléculaires permettant l'inhibition de l'activité des RTK représente un enjeu majeur pour la recherche médicale contre le cancer. La protéine SOCS1 est de plus en plus décrite pour sa capacité à interférer dans la signalisation de certains RTK dont les récepteurs c-KIT, FGFR, EGFR, IGF1R et Met (Ben-Zvi et al., 2006; De Sepulveda et al., 1999; Dey et al., 1998; Gui et al., 2011; Ling Xia, 2002). À ce jour, seules les caractéristiques fonctionnelles cancéreuses induites par les RTK c-KIT et Met ont été rapportées pour être inhibées par SOCS1.

SOCS1 inhibe l'activité pro-tumorale induite par le récepteur cKIT

Le RTK c-KIT est une protéine transmembranaire de 145 kDa, qui peut se présenter sous 4 isoformes différentes. Son ligand SCF (Stem Cell Factor) a été rapporté pour induire *in vitro* la prolifération de lignées cellulaires cancéreuses d'origines leucémiques, pancréatiques ou encore coliques (Esposito et al., 2002; Hassan and Freund, 1995; Sekido et al., 1993). C'est la fixation du ligand SCF qui va provoquer la dimérisation du récepteur c-KIT et ainsi induire son activité kinasique permettant la transduction d'un signal oncogénique. Une boucle d'activation autocrine entre c-Kit et SCF a d'ailleurs été rapportée dans les cancers colorectaux (Sammarco et al., 2004). Aussi, les études cliniques

rapportent une augmentation de l'activité du récepteur c-KIT que ce soit dans les cancers hématologiques ou même dans les tumeurs solides (Hassan, 2009). Les patients atteints de cancers présentant un c-KIT surexprimé ou muté, sont significativement associés à un mauvais pronostic, une espérance de survie abaissée, et présentent une résistance à la chimiothérapie (Hassan, 2009). Le RTK c-KIT est considéré comme une cible thérapeutique d'intérêt puisque qu'il est ciblé par l'agent antinéoplasique STI571, aussi connu sous le nom Imatinib ou encore Glivec, actuellement utilisé en clinique pour le traitement des leucémies myéloïdes chroniques (Buchdunger et al., 2000).

Des travaux réalisés dans des cellules hématopoïétiques ont démontré que SOCS1 avait la capacité de réguler négativement le signal en aval du récepteur c-KIT actif (Rottapel et al., 2002). Bien que la protéine SOCS1 puisse interagir directement avec c-KIT via son domaine SH2, l'activité catalytique de ce récepteur n'en est pas pour autant affectée (De Sepulveda et al., 1999). L'inhibition du signal provient de l'habilité de SOCS1 à interagir avec des intermédiaires de la signalisation de c-KIT, tels que les protéines VAV ou encore GRB2. L'interaction à VAV se fait via le domaine SH2 de SOCS1, alors que l'interaction avec GRB2 est dépendante des motifs riches en proline (De Sepulveda et al., 2000). De surcroît, cette régulation négative a été également observée dans un contexte cancéreux induit par un récepteur c-KIT muté (KIT²⁷) qui le rend constitutif actif (Rottapel et al., 2002). SOCS1 a la capacité d'inhiber la prolifération ainsi que la croissance au-delà de la confluence des cellules hématopoïétiques BA/F3 transformées par l'oncoprotéine KIT²⁷.

SOCS1 inhibe l'activité pro-tumorale induite par le récepteur Met

Le récepteur Met est un hétérodimer composé d'une chaîne α extracellulaire et d'une chaîne β transmembranaire qui sont liées par des liens disulfure. La liaison de son unique ligand connu, la cytokine HGF (Hepatocyte Growth Factor), va induire la trans-autophosphorylation des tyrosines 1230, 1234 et 1235 situées dans le domaine kinasique du récepteur Met, et permettant ainsi son activité catalytique. Va s'en suivre la phosphorylation des tyrosines 1349 et 1346 qui vont servir de sites de recrutement pour des protéines de signalisation qui contiennent des domaines SH2 ou PTB (phosphotyrosine-binding domain). Parmi ces protéines recrutées, on retrouve les protéines adaptatrices SHC

ou GRB2 ainsi que la protéine dite d'échafaudage de plus haut poids moléculaire GAB1. Bien que ne possédant pas d'activité enzymatique, ces protéines favorisent les interactions protéines/protéines et contribuent à l'assemblage de complexes protéiques en aval d'un RTK actif. Ces complexes ont pour vocation l'amplification et l'intégration des signaux intracellulaires tels que, dans le cas du RTK Met, la voie mitogénique des MAPK et la voie de survie PI3K/Akt (**Figure 6**) (Lemmon and Schlessinger, 2010).

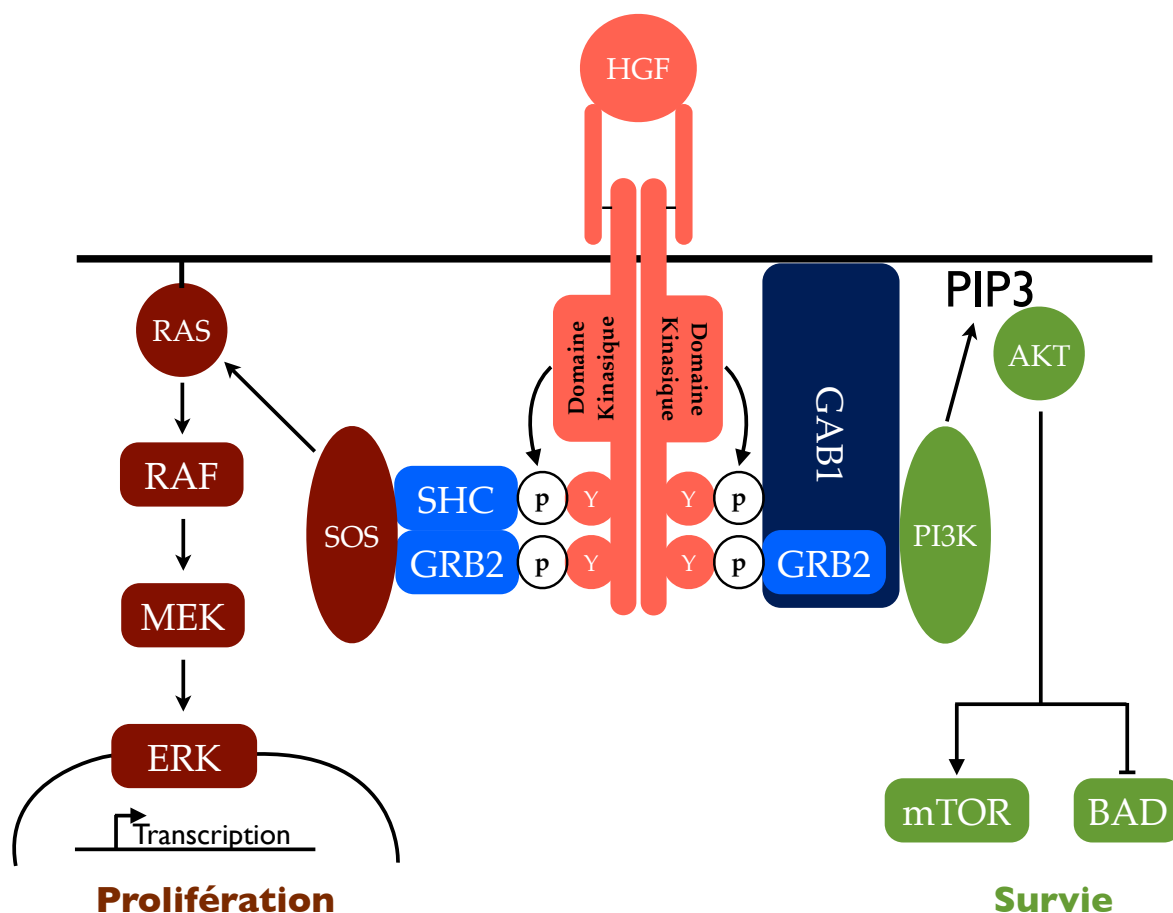


Figure 6. Principales voies de signalisations induites par le récepteur Met suite à son activation par son ligand HGF

Complexe protéique recruté au récepteur Met actif, qui engage un réseau de signalisation qui régule des fonctions biologiques tels que la prolifération, la mobilité ou encore la survie cellulaire.

Ces signalisations étant largement décrites comme impliquées dans les processus tumorigéniques et métastatiques, une activation aberrante du récepteur Met favorise la progression tumorale. D'ailleurs, nombreuses sont les évidences cliniques qui font état d'une dérégulation fréquente de HGF/Met dans les cancers (Tableau 2).

		Surexpression		Mutations Activatrices De Met		Réarrangement Protéique (Tpr-Met)
		HGF	Met	Tumeur	Métastase	Tumeur
Carcinome	Vessie	X	X			
	Sein	X	X	X		
	Cervical		X			
	Colorectal	X	X			
	Gastrique	X	X	X	X	X
	Tête et cou	X	X	X	X	
	Rein	X	X	X		
	Foie	X	X	X		
	Poumon	X	X	X		
	Œsophage		X			
	Oropharynx	X	X	X	X	
	Ovaire		X	X		
	Pancréas	X	X			
	Prostate	X	X			
	Thyroïde	X	X			
Sarcome	musculaires	X	X			
	synovial	X	X			
	de Kaposi	X	X			
	Osseux	X	X			
Hématopoïétique	Myélome multiple	X	X			
	Lymphome	X	X			
	Leucémie (cellules T)		X			
	Leucémie myéloïde	X				
Autres	Gliome/Astrocytome	X	X	X		
	Mésothélium	X	X			
	Tumeur de Wilms	X	X			

Tableau 2. Cancers impliquant une dérégulation du couple HGF/MET

Basé sur (Birchmeier et al., 2003)

Comme présenté dans le tableau 2, les dérégulations des partenaires HGF/MET observées dans les études cliniques, peuvent être causées par les événements moléculaires suivant:

La surexpression du récepteur Met ou de son ligand HGF, notamment due à des boucles d'activation autocrine. Ces activations ont lieu lorsque les cellules cancéreuses expriment excessivement à la fois le ligand HGF et le récepteur MET (Birchmeier et al., 2003). Aussi, la surexpression du récepteur Met peut être le fruit d'une amplification génique causé par translocation génétique, ou encore d'une augmentation de sa transcription induite par d'autres oncogènes tel que RAS (Birchmeier et al., 2003).

La présence de certaines mutations au sein du gène *c-met* ont pour effet d'augmenter l'activité tyrosine kinase du récepteur Met, augmentant ainsi sa capacité à induire des signaux oncogéniques. Généralement ces mutations ont lieu dans le domaine kinasique (Danilkovitch-Miagkova and Zbar, 2002).

Un réarrangement chromosomique aboutissant à une forme oncogénique du récepteur Met. L'oncoprotéine Tpr-Met, résulte en la fusion du domaine de dimérisation de la protéine TPR avec la portion intracellulaire du récepteur Met incluant son domaine kinasique. Historiquement, c'est son identification en 1987 qui a permis d'identifier indirectement le récepteur Met (Dean et al., 1987). La conformation de Tpr-Met se présente sous la forme d'un dimère permise par les motifs leucines zippers du domaine TPR, ce qui implique une activité kinasique constitutive du domaine MET et conférant ainsi des caractéristiques cancéreuses agressives aux cellules exprimant Tpr-MET (Fixman et al., 1995; Peschard and Park, 2007). Cependant, l'existence de cette protéine dans les cancers reste controversée. En effet, deux groupes se contredisent quant à son expression dans les cancers gastriques (Heideman et al., 2001; Soman et al., 1991).

En association avec notre laboratoire, l'équipe du professeur Ilangumaran a récemment mis en évidence un rôle probable de suppresseur de tumeur de SOCS1 dans les cancers hépatiques via son action répressive du récepteur Met (Gui et al., 2011). L'équipe a tout d'abord constaté que suite à une hépatectomie partielle, les souris invalidées pour le gène *SOCS1* présentaient une régénération hépatique plus rapide en comparaison avec les souris contrôles. Cette observation allait de paire avec une augmentation de l'expression et de

l'activation du récepteur Met. Pour confirmer l'action de SOCS1 sur MET, les auteurs ont surexprimé SOCS1 dans des lignées hépatiques cancéreuses humaines hep3B. Il en résulte que SOCS1 atténue l'expression et l'activation du récepteur Met, et diminue significativement les fonctions tumorigéniques et métastatiques induites par l'HGF, tels que la prolifération et la migration cellulaire (Gui et al., 2011). Finalement, Gui et collaborateurs proposent un modèle dans lequel SOCS1 interagirait directement avec le récepteur Met en vue d'inhiber son action. Une seconde étude des mêmes auteurs suggère une probable dégradation protéasomale du récepteur Met induite par SOCS1 via l'activité Ub-ligase de son domaine Socs Box (Gui et al, résultats non-publiés).

2.4 L'expression de SOCS1 est fréquemment diminuée dans les cancers

La littérature regorge d'études cliniques rapportant la baisse d'expression de SOCS1 dans de nombreux cancers. Ces évidences cliniques sont en faveur d'un rôle suppresseur de tumeur dans le cancer. Cependant il est à noter qu'il existe une controverse concernant les cancers du sein et les mélanomes, dans lesquels certaines études proposent un rôle pro-tumoral pour SOCS1. Ces études cliniques sont compilées dans le Tableau 3.

Type de cancer	Nb. de cas	Fonction supposée	Référence
Sein	17	Oncogène	(Raccurt et al., 2003)
Sein	127	Suppresseur de tumeur	(Sasi et al., 2010)
Mélanome	67	Oncogène	(Li et al., 2004)
Mélanome	40	Suppresseur de tumeur	(Huang et al., 2008)
Prostate	8	Suppresseur de tumeur	(Neuwirt et al., 2009)
Larynx	24	Suppresseur de tumeur	(Starska et al., 2009)
Pancréas	14	Suppresseur de tumeur	(Komazaki et al., 2004)
Foie	46	Suppresseur de tumeur	(Chu et al., 2010)
Myelome multiple	35	Suppresseur de tumeur	(Galm et al., 2003)
Leucémie aigue myéloïde	90	Suppresseur de tumeur	(Watanabe et al., 2004)

Tableau 3. Compilation des études cliniques rapportant une fonction supposée de suppresseur de tumeur ou d'oncogène pour SOCS1 dans les cancers

Le promoteur de socs1 est fréquemment hyperméthylé dans les cancers

Le mécanisme largement avancé pour expliquer la perte de l'expression de la protéine SOCS1 dans les cancers, est l'hyperméthylation de son ADN. La méthylation de l'ADN est une modification épigénétique, qui consiste en l'ajout d'un groupement méthyle à une cytosine de type CpG (Cytosines Preceding a Guanine). Lorsque regroupées entre elles, les CpG forment ce que l'on appelle des « ilots ». Ces ilots pouvant se retrouver dans les régions promotrices de certains gènes, la méthylation de leurs CpG est associée avec une inhibition de l'expression génique (Herman and Baylin, 2003). C'est la modification locale de la structure de la chromatine qui permet de réprimer la transcription des gènes cibles (Esteller et al., 2001). Ce mécanisme est bien connu pour promouvoir le développement des cancers en inactivant des gènes suppresseurs de tumeurs comme par exemples *rb1*, *vhl*, *mlh1*, *cdk2na*, *cdk2nb*, *apc* ou encore *h-cadherine* (Esteller et al., 2001; Horii, 1998). Le promoteur du gène *socs1* est lui aussi de plus en plus décrit pour être hyperméthylé dans de nombreux cancers (**Tableau 4**).

Type de cancer	Pourcentage d'hyperméthylation
Hépatoblastomes	40%
Carcinomes hépatocellulaires	39-60%
Cancers pancréatiques	50%
Mélanomes	75%
AML	60%
Cancers ovariens	23%
Myélomes multiples	63,9-74,5%
Gastriques	44%

Tableau 4. Cancers présentant une hyperméthylation du promoteur du gène *socs1*

Donnés tirées de (Zhang et al., 2012)

3. La cancérogenèse colorectale

3.1 Généralités

À l'image des autres types de cancers, l'apparition du CCR est la conséquence d'une série d'évènements moléculaires se produisant dans une cellule saine, typiquement une cellule de l'épithélium intestinal, la transformant en cellule tumorale. Au moins trois mécanismes moléculaires distincts ont été identifiés dans la cancérogenèse colorectale: l'instabilité chromosomique, l'instabilité des microsatellites et l'hyperméthylation de l'ADN.

L'**instabilité chromosomique**, dont le phénotype causé est nommé CIN pour « *Chromosomal Instability* », est l'évènement le plus fréquent puisqu'il concerne près de 80% des CCR. Il est caractérisé par des remaniements chromosomiques principalement sur les bras courts des chromosomes 8 et 17, et sur le bras long des chromosomes 5, 18 et 22. La mutation perte de fonction du gène *apc*, évènement précoce dans de nombreux CCR sporadiques ou familiaux, pourrait expliquer l'apparition du phénotype CIN en causant une mauvaise ségrégation chromosomique (Alberici and Fodde, 2006).

L'**instabilité des microsatellites**, dont le phénotype associé est nommé MSI pour « *Microsatellite Instability* », concerne jusqu'à 15% des tumeurs colorectales. Ce phénotype est caractérisé par une altération du système de réparation des mésappariement de l'ADN (*DNA mismatch repair MMR*) provoquant une instabilité des locus contenant des microsatellites. L'altération du système de réparation MMR, a pour effet l'accumulation de mutations spontanées dans des séquences nucléotidiques répétées (microsatellite) pouvant être présentes dans les séquences régulatrices ou même codantes de certains gènes. Dans le cas du syndrome familial de Lynch, dont les patients présentent une susceptibilité augmentée au développement du CCR, on note la présence des mutations inactivatrices des gènes *hms6*, *pms2*, *hms2* et *hml1* qui sont tous liés à un défaut du système de réparation MMR (Soreide et al., 2006).

L'**hyperméthylation** des ilots CpG présents dans les promoteurs de certains gènes suppresseurs de tumeurs est associée à un phénotype communément appelé CIMP pour « *CpG Island Methylator Phenotype* ». Pour définir les CCR de type CIMP, les études cliniques évaluent le profil de méthylation de plusieurs gènes censés être révélateur de ce phénotype, dont entre autres les gènes *cacna1g*, *igf2*, *neurog1*, *runx3* et *socs1* (Weisenberger et al., 2006; Worthley et al., 2010). Comme évoqué précédemment, une méthylation aberrante d'ilôts CpG situés dans les promoteurs de certains gènes a pour conséquence d'inactiver leur transcription. Les protéines ADN méthyltransférases (DNMT) qui sont responsables de ce phénomène moléculaire, ont d'ailleurs été retrouvées à des taux élevés dans des cellules cancéreuses colorectales (el-Deiry et al., 1991). De plus, il a été mis en évidence que l'expression exogène de la DNMT dans des fibroblastes était suffisante pour provoquer la transformation cellulaire (Wu et al., 1993).

Bien que différents sur le plan moléculaire, ces événements ont tous pour même conséquence, l'accumulation d'altérations génétiques menant à l'activation d'oncoprotéines et à la répression de protéines dites suppresseurs de tumeurs. Parmi elles, on retrouve SOCS1 et d'autres protéines régulées par SOCS1.

3.2 *SOCS1 et la carcinogenèse colorectale*

Comme présenté dans le tableau 4 et dans la partie 3.1, l'expression du gène *socs1* est fréquemment abolie suite à l'hyperméthylation de son promoteur dans de nombreux cancers, et a été choisie dans les études cliniques pour définir les CCR de type CIMP. Une méthylation aberrante a notamment été remarquée chez des jeunes patients atteints de CCR (Fujitake et al., 2004). De surcroît, certaines lignées CCR, comme les SW480 et les SW1083 ont aussi été décrites pour présenter une répression de la transcription du gène *socs1* causé par ce phénomène de méthylation. Il faut toutefois tempérer cette observation, car la lignée Col3Jck ne présente pas une telle méthylation, et exprime le transcrite de SOCS1 (Fujitake et al., 2004).

En ce qui concerne les oncogènes activés dans le CCR, on retrouve le récepteur Met qui a été décrit dans la partie 2.3.2 comme étant régulé par SOCS1. Une étude en 1992, a démontré que 70% des CCR expriment jusqu'à quatre fois plus du transcrite du gène *c-met* que le tissu sain adjacent (Liu et al., 1992). Depuis, nombreuses sont les publications qui ont confirmé la surexpression du récepteur MET et de son ligand HGF à tous les stades du CCR, tant au niveau de l'ARNm qu'au niveau protéique (Fujita and Sugano, 1997; Hiscox et al., 1997). Aujourd'hui, l'activation aberrante de MET est considérée dans le CCR comme un marqueur de progression et de mauvais pronostic (Takeuchi et al., 2003). Notre laboratoire, a notamment démontré qu'une activation oncogénique du récepteur MET était suffisante pour induire la transformation des cellules épithéliales intestinales normales de rat, les IEC6 (Bernier et al., 2011). Étant donné son implication évidente dans la progression tumorale colique, le récepteur MET est aujourd'hui considéré comme une cible thérapeutique des plus prometteuse dans le CCR (Gao et al., 2013).

Parmi les suppresseurs de tumeurs réprimés dans le CCR, on retrouve le facteur de transcription p53 décrit au chapitre 2.2 comme pouvant être activé par SOCS1. Situé sur le bras court du chromosome 17, le gène *p53* est inactivé à la fois à cause de pertes alléliques ou de mutations ponctuelles dans 60 à 80% des CCR de type CIN (Fearon, 2011). Aussi, dans les CCR associés aux pathologies inflammatoires, comme la colite ulcéreuse ou la maladie de Crohn, le rôle prépondérant de P53 a été également démontré (Terzic et al., 2010). En effet, la perte fonctionnelle de P53 est reconnue pour être un évènement précoce dans la progression tumorale initiée par la colite ulcéreuse (Brentnall et al., 1994). Dans

une étude chez le modèle murin *socs1*^{-/-TG} (décrit au chapitre 2.1), les auteurs ont notamment remarqué que l'apparition de CCR spontanés, était accompagnée par une forte inflammation et une accumulation de mutations sur le gène *p53* (Hanada et al., 2006).

Hypothèse et objectifs de recherche

Nous avons vu précédemment, que la protéine SOCS1 régula négativement la signalisation JAK/STAT induite par les cytokines, et avait donc par extension, des propriétés anti-inflammatoires. Aussi que SOCS1, dans un contexte cancéreux, était requis pour induire l'activité transcriptionnelle du suppresseur de tumeur P53. Enfin que SOCS1 pouvait inhiber la signalisation ainsi que les fonctions du récepteur MET. Étant donné l'influence bien reconnue de l'épigénétique, de P53 et de MET dans le CCR, SOCS1 est présumé d'agir en tant que suppresseur de tumeur dans la carcinogénèse colorectale. Néanmoins, son rôle dans le CCR demeure peu caractérisé. À ce jour, une seule étude s'est penchée sur la caractérisation de SOCS1 dans les lignées cellulaires CCR. Cette dernière ne porte que sur le statut de méthylation du gène *socs1* dans les lignées SW480, SW1083 et Col3Jck (Fujitake et al., 2004). Rien n'est donc connu sur l'implication moléculaire de la protéine SOCS1 dans l'émergence des caractéristiques fonctionnelles et morphologiques menant au développement des CCR.

Nous proposons donc comme **hypothèse** de recherche, que la protéine SOCS1 agirait en tant que suppresseur de tumeur dans le CCR, via son influence sur l'inflammation et sur les voies de signalisation de P53 et du récepteur MET. Afin de répondre à cette hypothèse, nous avons fixé trois **objectifs** :

- 1) Définir et valider un modèle cellulaire de CCR dans lequel nous modulerons l'expression de SOCS1.
- 2) Évaluer *in cellulo* et *in vivo*, l'impact de la modulation de l'expression de SOCS1 sur les caractéristiques cancéreuses dans ce modèle cellulaire de CCR.
- 3) Caractériser biochimiquement l'impact de la modulation de l'expression de SOCS1 sur la signalisation intracellulaire dans modèle cellulaire de CCR.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Vecteurs et ADN

Le plasmide d'expression rétrovirale pLPCX contenant la séquence codante pour SOCS1 précédée en N-terminal de trois épitopes Flag (Flag-SOCS1), provient du Dr. Ferbeyre (Université de Montréal, Qc, Canada). Les plasmides d'expression lentivirale pLKO, contenant une séquence aléatoire ShARN non ciblant (Sh-contrôle) et ShARN dirigée contre l'ARNm codant pour SOCS1 (pLKO Sh-SOCS1), sont de Sigma Aldrich (Oakville, Canada). Le plasmide d'expression transitoire pCDNA3 contenant la séquence codante pour SOCS1 précédée en N-terminal de six épitopes Myc (pCDNA3 Myc-SOCS1), proviennent du laboratoire du Dr. Ilangumaran (Université de Sherbrooke, Qc, Canada). Le plasmide d'expression de pLPCX HAp66Shc, contenant la séquence codante de p66Shc précédée en N-terminal, de l'épitope HA nous a été gracieusement offert par le Dr. Yoshikuni Nagamine (Friedrich Miescher Institute for Biomedical Research, Basel, Suisse), alors que le vecteur d'expression pGEX4T3 est un don du Dr. Brendan Bell (Université de Sherbrooke, Qc, Canada).

2. Culture cellulaire

Les cellules sont maintenues dans du milieu dont la composition consiste en du DMEM contenant 4.5 g/L de glucose, L-glutamine et 110 mg/L de sodium pyruvate (Dulbecco's modified Eagle's medium) additionné de 10 % de sérum (Fetal Bovine Serum; FBS) et 50 µg/mL de gentamicine (WISSENT, St-Bruno, Qc, Canada), dans une atmosphère humidifiée de 5 % de CO₂ à 37 °C. Le milieu de culture est remplacé tous les deux jours et les passages sont effectués lorsque les cellules atteignent environ 75 % de la confluence. Le détachement des cellules est effectué par un traitement à la trypsine 0.25 % contenant 0.1 % EDTA (WISSENT) et les cellules sont réensemencées dans un ratio de 1 : 10.

2.1 Génération des lignées cellulaires CT26 exprimant pLPCX ou Flag-SOCS1 et des lignées cellulaires CT36 exprimant un Sh contrôle ou ciblant SOCS1

Les lignées cellulaires CT26 et CT36 ont été établies à partir de tumeurs coliques induites chimiquement dans des souris BALB/c (Brattain et al., 1980). Ces cellules ont la particularité de posséder des caractéristiques tumorigéniques et métastatiques distinctes. La lignée CT36 est faiblement tumorigénique et non métastatique, avec une morphologie cellulaire s'apparentant à celle des cellules épithéliales. Elle représente de ce fait les stades précoces des adénocarcinomes colorectaux. Quant à la lignée CT26, elle est hautement tumorigénique et métastatique, avec une morphologie cellulaire transformée de type fibroblastique. Elle représente donc les stades tardifs des adénocarcinomes colorectaux. Ces lignées constituent donc un modèle cellulaire bien établi pour l'étude des différents stades de la séquence adénocarcinome colorectale (Brattain et al., 1980). Elles nous ont été gracieusement données par la Dre. Nicole Beauchemin (Université McGill, Montréal, Qc, Canada).

Production des particules virales

Les cellules HEK 293T (Human Embryonic Kidney) qui sont des cellules embryonnaire de rein humain ont été utilisées pour produire les particules virales contenant les vecteurs d'expressions (pLPCX et Flag-SOCS1 pour les CT26 ; pLKO Sh-contrôle et pLKO Sh-SOCS1 pour les CT36). D'abord les cellules sontensemencées dans du milieu normal à la densité de 400 000 cellules par pétris de 10 cm. Le lendemain, 5 µg des vecteurs d'intérêt sont co-transfectés avec 1 µg du vecteur pVPack-VSV-G (codant pour une protéine d'enveloppe virale) et 1 µg du vecteur pVPack-GP (codant pour les protéines virales Gag et Pol), en présence du réactif de transfection FuGENE® (Roche, Bâle, Suisse) dans un ratio de 3 µL pour 1 µg d'ADN et selon le protocole de compagnie. Le lendemain, le milieu de culture est remplacé par du milieu frais puis les cellules sont incubées 48 h dans des conditions normales. Par la suite, le milieu de culture est remplacé par du DMEM supplémenté avec 10 % de sérum FBS ayant subi l'inactivation du complément à la chaleur (30 min à 65 °C) et les cellules sont incubées encore 48 h dans des conditions normales pour permettre la production des particules virales. Le milieu de culture contenant les particules virales est finalement filtré à l'aide d'un filtre de PVDF ayant des pores de 0,45

µm (Millipore, Ireland) afin d'en éliminer les débris cellulaires et ensuite conservé en aliquotes à -80 °C.

Infections virales

Les cellules CT26 et CT36 sontensemencées à une densité de 50 000 cellules/puits dans des plaques de culture de 6 puits, en présence de milieu normal. Le lendemain, le milieu de culture est retiré et les cellules sont rincées avec du DMEM afin d'en éliminer le sérum. Des quantités de 500, 300 ou 150 µL de suspension virale (ce qui sera à l'origine, respectivement, des populations A, B et C) contenant 4 µg/mL de polybrène (Sigma Aldrich), sont déposées sur les cellules et incubées pendant 4 h dans des conditions de culture normales. Par la suite, les puits sont complétés avec 4 mL de DMEM contenant 10 % de FBS inactivé à la chaleur. La sélection débute 48 h après l'infection, avec du milieu DMEM contenant 10 % de FBS et 2 µg/mL de puromycine (Wisent), et se poursuit pendant deux semaines, en changeant le milieu tous les deux jours. Par la suite, les cellules sont maintenues dans le même milieu de culture (DMEM contenant 10 % de FBS et 1 µg/mL de puromycine). La visualisation des cellules et la prise de photographies sont effectuées avec un microscope à contraste de phase.

3. Analyse de l'ARNm

3.1 Extraction de l'ARN et réaction de transcription inverse

Tout d'abord, l'extraction de l'ARN se fait par l'utilisation du TRIzol® et en accord avec les instructions du fabricant (Invitrogen). Ensuite, pour dégrader toute contamination d'ADN, un traitement à la DNase (DNase1 Invitrogen) est réalisé. Finalement la réaction de transcription inverse est réalisée par l'utilisation de l'enzyme commerciale Omniscript Reverse Transcriptase® et d'oligo dT, en accord avec les recommandation du fabricant (Qiagen, Venlo, Hollande). Le produit de cette réaction représente donc l'ADN complémentaire.

3.2 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Les réactions de PCR sont réalisées sur les ADNc obtenus lors des réactions de transcription inverse. La polymérisation en chaîne est permise grâce à l'utilisation de l'enzyme Taq DNA polymerase (Qiagen), et des amorces nucléotidiques spécifiques de gènes cibles (*socs1* : 5'-CACGCACTTCCGCACATTCC-3' et 3'-TCCAGCAGCTCGAAGAGGCA-5'). Le produit de cette amplification est séparé par électrophorèse en gel d'agarose et visualisé grâce à l'usage de bromure d'éthidium sous exposition aux ultraviolets.

4. Analyse protéique

4.1 Transfection transitoire

Les cellules HEK293 sontensemencées à une densité de $1,25 \times 10^6$ cellules / pétris de 10 cm, dans du milieu normal. Le lendemain, 2,5 µg de chaque ADN à co-transfecter est mis en contact avec le réactif de transfection FuGENE® (Roche) dans un ratio de 3 µL pour 1 µg d'ADN, dans un total de 200 µL de DMEM, selon le protocole de compagnie. Le mélange d'ADN et de FuGENE® est ajouté à du milieu frais dans chaque pétris et les cellules sont incubées 48 h dans des conditions de culture normales, en changeant de milieu après 24 h.

4.2 Réalisation des lysats cellulaires

Que ce soit pour les populations de CT26/36 infectées ou pour les cellules HEK293 transfectées transitoirement, les lysats protéiques sont obtenus selon le même protocole. Les cellules sont lysées en présence du tampon Triton (50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 10 % Glycérol, 0.5 % Triton X-100, 2 mM EDTA pH 8.0, 1.5 mM MgCl₂) additionné de différents inhibiteurs de protéases et de phosphatases juste avant son utilisation (10 µg/ml d'aprotinine et de leupeptine, 1 mM de PMSF ([phenylmethylsulfonyl fluoride], Roche) et de Na₃VO₄ (sodium vanadate, Fisher, Waltham, Ma, USA). La suspension cellulaire récoltée est incubée 15 min sur glace et centrifugée 15 min à 13 000 rpm à 4 °C. Le surnageant contenant les protéines est récupéré et conservé à -80 °C. Les dosages protéiques sont effectués selon le protocole de réaction colorimétrique Bradford

(Bradford, 1976) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Les courbes standard sont générées avec la protéine BSA (Bovine Serum Albumine Fraction V; Roche).

4.3 Immunobuvardages

Lors de l'immunobuvardage des lysats cellulaires totaux (LCT), de 30 à 50 µg d'extraits protéiques, sont solubilisés dans un tampon de chargement Laemmli à une concentration finale de 1 X (0.25 M Tris pH 6.8, 8 % SDS [sodium dodécyl sulfate], 30 % glycérol, 0,02 % bleu de bromophénol) contenant 0,1 M de DTT (dithiothreitol, Roche) comme agent réducteur. Ensuite, les extraits protéiques sont bouillis pendant 3 min et sont déposés sur gel de polyacrylamide 10 % et séparés par SDS-PAGE (PolyAcrylamide Gel Electrophoresis). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose (GE Healthcare, Fairfield, Co, USA). Le blocage de la membrane est effectué avec une solution protéique de 5 % de lait en poudre dans une solution 1 X de TBS (Tris Buffer Saline ; 200 mM Tris, 137 mM NaCl, 0,5 M EDTA, pH 8.0) à pH 7.6, contenant 0,1 % de Tween-20 (TBST). La membrane est ensuite mise en contact avec l'anticorps primaire spécifique à la protéine d'intérêt, dilué dans le même tampon (TBST). La source, les concentrations d'anticorps ainsi que le temps et la température d'incubation sont indiqués dans le Tableau 5. Suite à l'incubation avec l'anticorps primaire, les membranes sont rincées trois fois pendant 5 min avec le tampon TBST et incubées 1 h à la température de la pièce (TP) avec l'anticorps secondaire spécifique (anti-souris, IgG provenant du mouton ou anti-lapin, protéine A de *Staphylococcus aureus*) couplé à l'enzyme HRP (Horseradish Reactive Peroxydase), dilué 1/10 000 dans le TBST. Cette incubation est également suivie de trois lavages de 5 min avec le tampon TBST et les protéines sont révélées avec le réactif ECL (Enhanced Chemiluminescence) sur des films Hyperfilm™ ECL (GE Healthcare).

Anticorps	Source	Dilution Dans le TBST	Temps et température d'incubation	Fournisseur
pTyr-100	Souris	1/2000	2 h TP	Cell Signaling
Met 148	Lapin	1/1000	O/N 4 °C	Morag Park, Université McGill
p-Met (Tyr1234/1235)	Lapin	1/1000	O/N 4 °C	Cell Signaling
Shc	Lapin	1/2000	O/N 4 °C	Santa Cruz
Flag	Souris	1/1000	O/N 4 °C	Sigma
STAT1	Souris	1/1000	O/N 4 °C	Santa Cruz
phospho-STAT1 (Tyr701)	Lapin	1/1000	O/N 4 °C	Cell Signaling
p53	Souris	1/1000	O/N 4 °C	Cell Signaling
p-p53	Lapin	1/1000	O/N 4 °C	Cell Signaling
P21	Souris	1/500	O/N 4 °C	Santa Cruz
GST (B-14)	souris	1/1000	O/N 4 °C	Santa Cruz
c-MYC (9E10)	Souris	1/1000	O/N 4 °C	Santa Cruz
HA.11	Souris	1/1000	O/N 4 °C	Convance
Beta Actine	Souris	1/10 000	30 min TP	Sigma
IgG (anti souris)	Mouton	1/10 000	1h TP	GE Healthcare
Proteine A	S. Aureus	1/10 000	1h TP	GE Healthcare

Tableau 5. Liste des anticorps utilisés pour les immunobuvarges

4.4 Production des protéines de fusion GST-SOCS1 et essai d'interaction protéique in vitro

Tout d'abord, le gène *socs1* a été sous-cloné dans le vecteur d'expression pGEX4T3 en 3' de la séquence codante pour la protéine GST en respectant son cadre de lecture. Le plasmide ainsi généré a été nommé pGEX4T3 GST-SOCS1. Par la suite, des bactéries BL21 sont transformées avec les vecteurs pGEX4T3 ou pGEX4T3 GST-SOCS1, puis mis en culture dans 100 ml de milieu de culture LB (Lysogeny broth) jusqu'à entrer en phase

exponentielle de croissance (1 h de culture). Elles sont ensuite stimulées à 0,1 mM d'IPTG (isopropyl-b-D-thiogalactopyranoside) pendant 4 h, dans le but d'induire la synthèse des protéines GST ou GST-SOCS1 qui sont sous contrôle de l'opéron lactose. Finalement les bactéries sont lysées par l'utilisation d'un tampon à base de Sarkozyl de la manière décrite dans (Frangioni and Neel, 1993). L'estimation de la concentration des protéines générées est réalisée par un dosage colorimétrique sur gel de polyacrylamide au bleu de coomassie, en référence à un étalonnage de concentrations connues de protéines BSA.

Approximativement 3 μ g de protéines de fusion GST-SOCS1 ou GST sont mis en présence de 50 μ l de billes de glutathione-Sepharose (Gelifescience) suspendues à 50 % dans du PBS pendant 1 h à 4 °C sous agitation. Les billes sont ensuite lavées trois fois avec du PBS glacé, puis mises en présence avec 200 μ g de protéines provenant de LCT des cellules HEK293 surexprimant ou non la protéine HA-p66SHC, pendant 3 h à 4 °C sous agitation. Les billes sont à nouveau lavées trois fois avec du PBS glacé, puis mises en présence de 50 μ l d'un tampon de chargement Laemmli contenant 0,1 M de DTT. La suite de ce protocole consiste à réaliser un immunobuvardage dont le protocole est décrit précédemment à la partie 3.3

5. Tests biologiques *in cellulo*

5.1 Essai de croissance cellulaire

Les cellules sont ensemencées en triplicata dans des plaques de culture de 6 puits à une densité de 25 000 cellules / puits. Quotidiennement, les cellules sont détachées à l'aide de la trypsine/EDTA, mises en suspension et comptées avec le compteur automatique "Countess" (Invitrogen). Le milieu de culture n'est jamais changé pendant toute la durée de l'essai. Les résultats sont compilés et analysés avec le programme GraphPad Prism v5.

5.2 Croissance en agar mou

Les puits d'une plaque de 6 puits sont enduits d'une couche de 0,6 % d'agar Noble (Becton and Dickinson Company, USA) contenant du DMEM 2 X et 10 % de FBS. Cette couche est solidifiée pendant 1 h. Les cellules sont ensemencées à une densité de 5 000

cellules / 2 mL d'agar 0,3 % contenant du DMEM 2 X, directement sur la couche d'agar 0,6 %. Après une semaine d'incubation à 37 °C en conditions normales, les colonies formées sont photographiées à l'aide d'un microscope à contraste de phase. Par la suite, la coloration des cellules vivantes est effectuée pendant 3 h à 37 °C avec une solution de 1 mg/mL de MTT [(3-4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium Bromide ; Calbiochem, Gibbstown, NJ, USA]. L'activité mitochondriale des cellules vivantes entraîne une réduction chimique du MTT qui se traduit par l'apparition d'un composé insoluble bleu. Les puits sont photographiés et le décompte des colonies est ensuite effectué à partir des images avec le programme ImageJ (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) et les données sont analysées avec le programme GraphPad Prism v5.

5.3 Survie en suspension

Tout d'abord, les puits d'une plaque de culture 24 puits sont recouverts d'une couche de PolyHema ([2-hydroxyethylmethacrylate], Sigma) à une concentration de 10 mg/mL dans l'éthanol 100 %. Deux couches de 200 µL sont appliquées dans chaque puits, et un temps de séchage de 2 h sous les UV est alloué après l'application de chaque couche. Les puits sont rincés avec du PBS 1 X stérile avant l'ensemencement des cellules à une densité de 1.25×10^5 cellules puits dans un volume de 500 µL de DMEM sans rouge de phénol (Wisent). Les cellules sont ensemencées en triplicata dans une plaque contenant du polyHema et dans une plaque sans polyHema, qui sera le contrôle de survie des cellules. Suite à l'incubation de 10 h dans des conditions de culture normales, 500 µL de solution de réaction contenant 0.5 mg/mL de XTT (Invitrogen) et 3.75 µg/mL de PMS (Sigma) dans du PBS est ajouté dans tous les puits, avec ou sans polyHema. Une réaction mitochondriale métabolise le XTT [2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide] en un composé orange soluble, en présence de l'accepteur d'électron PMS [Phenazine methosulfate], ce qui permet la détection des cellules vivantes. La réaction colorimétrique est dosée à une longueur d'onde de 490 nm après 30 min d'incubation à 37 °C et les données sont analysées avec le programme GraphPad Prism v5.

6. Essais de tumorigenèse *in vivo*

Les essais de tumorigenèse expérimentale sont réalisés selon un protocole de manipulation des animaux approuvé par le comité de la santé animale de l'Université de Sherbrooke, et en accord avec le Guide Canadien pour les soins et l'utilisation des animaux de laboratoire. De façon sous-cutanée, 10^5 cellules sont injectées dans 100 μL de DMEM dans des souris (BALB/c ou NOD scid gamma). Pour chaque type cellulaire, trois souris sont injectées du côté droit et du côté gauche, pour un total de 6 injections. La taille des tumeurs est mesurée quotidiennement et le volume des tumeurs est calculé en utilisant la formule du volume d'un ellipsoïde [$V = 4/3 \times (l/2 \times L/2 \times L/2) \times \pi$, où l est la longueur et L , la largeur]. Les souris sont euthanasiées avant que le volume des tumeurs n'atteigne 1 cm^3 ou au moindre signe d'ulcération des tumeurs. Les données sont analysées avec le programme GraphPad Prism v5.

7. Analyse statistique

À moins d'indications contraires, tous les tests statistiques de comparaisons sont effectués par analyse de la variance (one-way ou two-way ANOVA) suivi du test de comparaison « Tukey's Multiple Comparison Test », et avec le programme GraphPad Prism v5. Les barres d'erreurs sont générées en calculant soit l'écart-type (Standard Deviation, SD) ou soit l'écart-type de la moyenne (Standard Error of the Mean, SEM). Les seuils de significativité proviennent des critères de Carcinogenesis, Oxford Journal et sont établis comme cela : * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

RÉSULTATS

1. Mise en place d'un modèle expérimentale pour l'étude de SOCS1 dans le CCR

Rien n'étant connu sur l'implication de SOCS1 dans le potentiel tumorigénique et métastatique des cellules de CCR, nous avons décidé de mettre en place un modèle cellulaire expérimentale dans lequel l'expression de SOCS1 serait modulée afin d'en évaluer les conséquences biologiques et moléculaires. En d'autres termes, il est question ici d'un modèle cellulaire de CCR permettant le gain et la perte de fonction de SOCS1.

Le couple cellulaire CT26/CT36 constituant un modèle cellulaire bien établi pour représenter les différents stades d'adénocarcinomes colorectales, nous avons donc tout d'abord évalué l'expression endogène de SOCS1 dans les lignées cellulaires CT26 et CT36.

1.1 Expression différentielle de SOCS1 dans le modèle cellulaire CCR CT26/CT36

Pour définir l'expression de SOCS1 dans les lignées CT26/CT36, les niveaux de l'ARNm codant de *socs1* ont été évalués. Il est courant d'observer une très faible, voir même une absence du transcrit de SOCS1 dans les cellules non-induites aux cytokines (Krebs and Hilton, 2001). Une stimulation à l'INF γ a donc été réalisée étant donné qu'elle est la cytokine la mieux décrite dans la littérature pour induire l'expression de SOCS1 (Sakamoto et al., 1998). Comme attendu, notre analyse PCR semi-quantitative révèle que dans les deux lignées cellulaires, l'ARNm codant pour la protéine SOCS1 est rapidement augmenté suite à une stimulation à l'INF γ (**Figure 7**). Cependant, nous constatons une réduction marquée du niveau d'expression de SOCS1 dans les cellules CT26 comparé à celui des cellules CT36, que ce soit avec ou sans stimulation à l'INF γ .

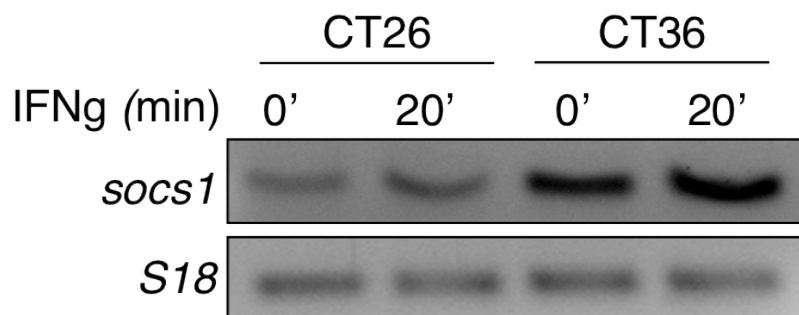


Figure 7. Expression différentielle de l'ARNm endogène de *SOCS1* dans le modèle cellulaire CCR CT26/CT36.

PCR semi-quantitative évaluant l'expression en ARNm de *socs1* et du gène de référence *S18* dans les cellules CT26 et CT36 en condition basale ou suite à une stimulation de 20 minutes à l'IFN γ à une concentration de 20 ng/ml.

1.2 Validation de la modulation de l'expression de SOCS1 dans le modèle cellulaire CT26/CT36

Cette expression différentielle en ARNm de SOCS1 dans le modèle cellulaire CT26/CT36, est en accord avec notre hypothèse qui propose un rôle de suppresseur de tumeur pour SOCS1 dans le CCR. En effet, les CT26, qui présentent des caractéristiques de cellules cancéreuses très agressives, expriment moins le transcrite de SOCS1 en comparaison avec les CT36, cellules cancéreuses faiblement tumorigénique et non métastatique.

Dans le but d'évaluer l'implication de SOCS1 dans la carcinogenèse colorectale, nous avons donc, en cohérence avec nos résultats (**Figure 7**), opté pour la surexpression de SOCS1 dans les cellules CT26 et pour la diminution de son expression dans les cellules CT36. Trois populations indépendantes de cellules CT26 surexprimant SOCS1 ont été générées par infection rétrovirales. Elles ont été nommées CT26 Flag-SOCS1 A, B et C. À noter que la séquence codante du gène *socs1* est précédée en 5' par l'étiquette Flag. Simultanément, trois autres populations de CT26 exprimant le plasmide vide ont été générées. Elles ont été nommées CT26 pLPCX A, B et C, et servent de contrôle. La

surexpression de SOCS1, en comparaison avec les cellules contrôles, a été validée par immunobuvardage (IB) avec un anticorps dirigé contre l'étiquette Flag (**Figure 8A**).

Des populations de cellules CT36, dont l'expression de SOCS1 a été diminuée par une approche d'ARN interférence ont été générées. Le shARN dirigé contre l'ARNm de SOCS1 a été introduit par infection lentivirale dans des CT36 nommée sh-SOCS1. Parallèlement, un shARN dirigé contre une séquence aléatoire et non-codante a été introduit dans les cellules CT 36 qui serviront de contrôle (CT36 sh-CTRL). La baisse d'expression de SOCS1 dans la lignée CT36 sh-SOCS1 par rapport à la lignée CT36 Sh-CTRL a été validée par PCR semi-quantitative de l'ARNm de SOCS1 (**Figure 8B**).

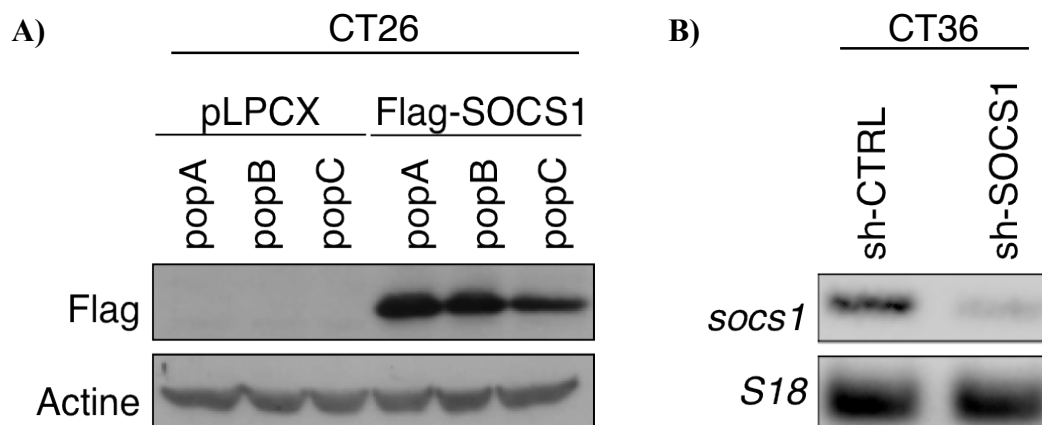


Figure 8. Modulation de l'expression de SOCS1 dans le modèle cellulaire CT26/CT36.

A) Expression de protéine Flag-SOCS1 dans les cellules CT26. Un IB dirigé contre l'étiquette Flag permettant la détection de la protéine SOCS1 exogène a été réalisé avec des lysats cellulaires totaux provenant de populations indépendantes de cellules CT26 Flag-SOCS1 et CT26 pLPCX. **B)** Expression de l'ARNm de SOCS1 dans les cellules CT36. Une analyse PCR semi-quantitative de l'ARNm de SOCS1 a été réalisée chez une population CT36 sh-SOCS1 en comparaison avec la population contrôle CT36 sh-CTRL.

La population CT26 Flag-SOCS1 A étant celle des trois qui présente un niveau de SOCS1 exogène le plus élevé, c'est cette dernière qui a été choisie pour le reste de l'étude. L'annotation « CT26 Flag-SOCS1 » fera dès à présent référence à la population CT26 Flag-SOCS1 A. Bien que d'autres populations de CT36 sh-SOCS1 ont été générées, seule

une a été validée pour présenter une baisse drastique de l'expression de SOCS1 par rapport au CT36 sh-CTRL.

2. Caractérisation *in cellulo* et *in vivo* des propriétés cancéreuses des lignées CT26 Flag-SOCS1 et CT36 sh-SOCS1

La modulation de l'expression de SOCS1 étant validée dans les lignées CT26/CT36, nous avons procédé à l'étude de son influence sur les caractéristiques, dites cancéreuses, de ce modèle CCR. Les caractéristiques telles que, la transformation morphologique, la croissance cellulaire, la croissance sans ancrage à la matrice, la résistance à l'anoïkose ou encore la croissance tumorale *in vivo* ont été évaluées.

2.1 La modulation de l'expression de SOCS1 n'affecte pas la morphologie cellulaire du modèle CT26/CT36

La transformation maligne d'une cellule normale en une cellule tumorale s'accompagne généralement d'un bouleversement morphologique qui indique une réorganisation du cytosquelette. La morphologie transformée d'une cellule reflète donc souvent ses capacités tumorigéniques et métastatiques. En effet, une cellule dite « transformée » aura une morphologie de type fibroblastique, plus allongée, un noyau plus volumineux et est plus réfringente à l'examen microscopique (Lacave. et al., 2005). Pour évaluer des éventuels changements morphologiques causés par une modulation de l'expression de SOCS1 dans les CT26/CT36, une évaluation microscopique à contraste de phase a été réalisée.

Les cellules CT26 qui surexpriment SOCS1 conservent une morphologie de type transformée, semblable aux cellules CT26 pLPCX contrôles. Filiformes, ne faisant pas de contact cellule-cellule, les cellules CT26 qui surexpriment SOCS1 semblent conserver des attributs hautement transformés (**Figure 9A**). Pour ce qui est de la baisse d'expression de SOCS1 dans les cellules CT36, il n'y a aussi pas de différences morphologiques majeures visibles avec celles qui expriment un sh contrôle. Les cellules CT36 sh-SOCS1 conservent

une morphologie de type épithéliale, faisant des contacts cellule-cellule, révélatrice de leur faible potentiel tumorigénique (**Figure 9B**).

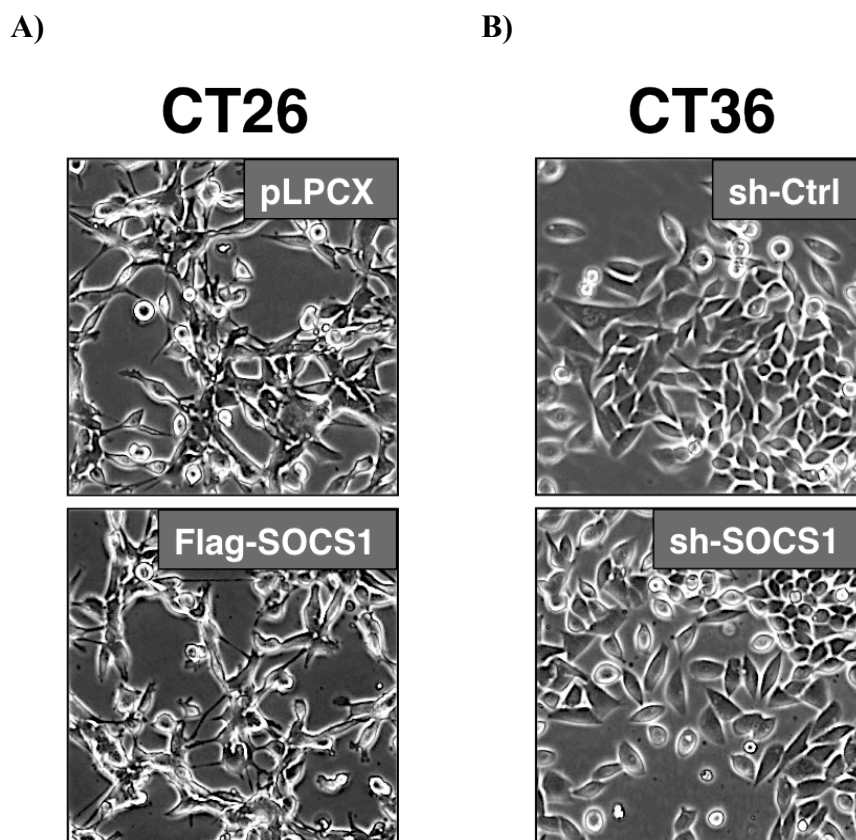


Figure 9. La modulation de l'expression de SOCS1 n'affecte pas la morphologie cellulaire du modèle CT26/CT36

A) Observation microscopique à contraste de phase des cellules CT26 Flag-SOCS1 et pLPCX contrôles. **B)** Observation microscopique à contraste de phase des cellules CT36 sh-SOCS1 et sh-CTRL contrôles.

2.2 SOCS1 augmente la croissance cellulaire des cellules CT26 et CT36

Des décomptes cellulaires journaliers ont été réalisés afin d'évaluer l'implication de SOCS1 dans croissance cellulaire des lignées CT26/CT36. Nos résultats suggèrent que la surexpression de SOCS1 favorise la croissance cellulaire des cellules CT26, alors que sa baisse d'expression dans les cellules CT36 abaisse la croissance cellulaire.

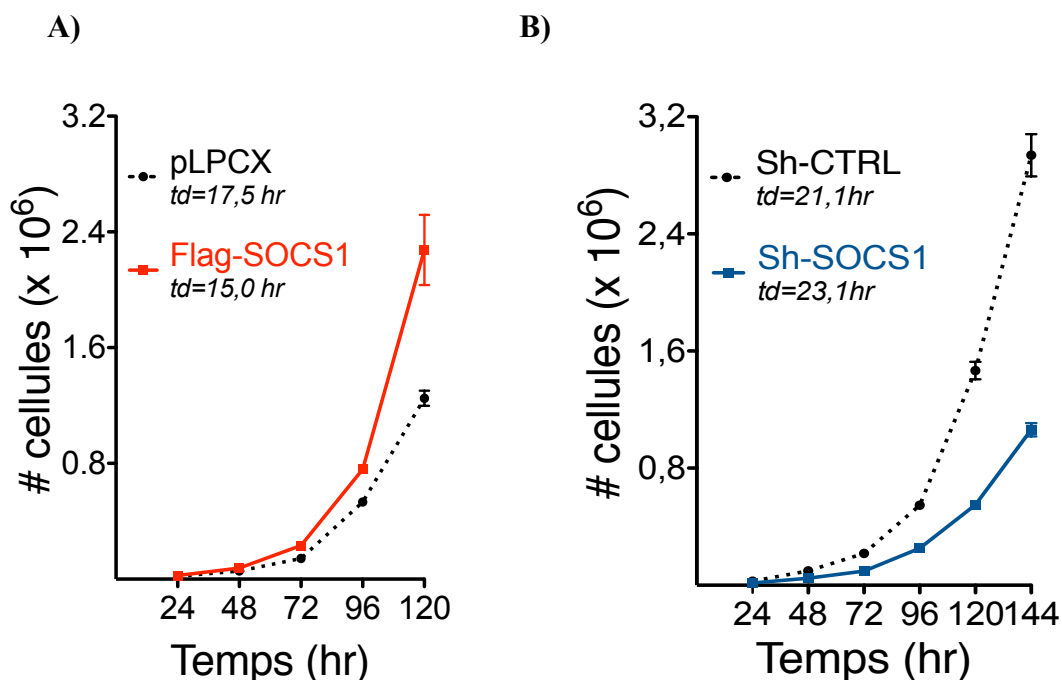


Figure 10. SOCS1 augmente la croissance cellulaire du modèle CT26/CT36

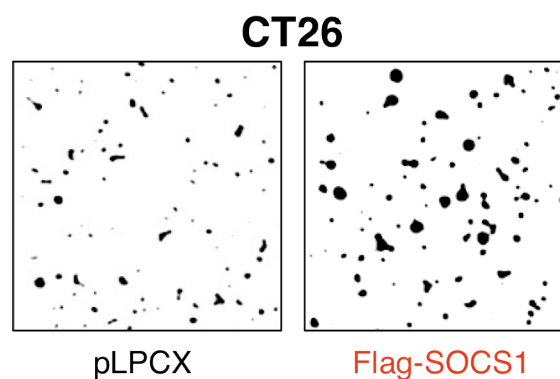
A) Croissance cellulaire des cellules CT26 Flag-SOCS1 et CT26 pLPCX. **B)** Croissance cellulaire des cellules CT36 sh-SOCS1 et CT36 sh-CTRL. La croissance cellulaire a été évaluée par décomptes cellulaires et représentée en graphique du nombre de cellules par rapport au nombre d'heures en culture. Les graphiques et les temps de doublements (td) sont représentatifs de trois expériences indépendantes réalisées chacune en triplicata. Les barres d'erreurs sont obtenues par le calcul de SEM. Un test statistique 2way ANOVA a démontré que les courbes en A) et B) sont significativement différentes ($p < 0,0001$).

2.3 SOCS1 augmente la capacité des cellules CT26 à croître en indépendance d'ancrage

La capacité des cellules à croître sans ancrage à la matrice extracellulaire (MEC) est une des caractéristiques typiques des cellules cancéreuses. Il est à noter que les cellules CT26 sont connues pour avoir la capacité de former des colonies dans l'agar mou, et à l'opposé, les CT36 ne possèdent pas cette capacité (Brattain et al., 1980). Nous avons donc évalué si la modulation de l'expression de SOCS1 dans le modèle CT26/CT36 pouvait avoir une incidence sur cette caractéristique cancéreuse. Pour cela nous avonsensemencé des cellules CT26 Flag-SOCS1 et CT36 sh-SOCS1 ainsi que celles contrôles dans de l'agar mou (**Figure 11**).

Nos résultats démontrent que le nombre de colonies formées par les cellules CT26 n'est pas influencé par la surexpression de SOCS1. Cependant, nous avons remarqué que les colonies formées par les cellules CT26 Flag-SOCS1 étaient significativement plus grosses en comparaison avec celles formées par les cellules CT26 pLPCX (**Figure 11A-B**). Bien qu'opposée à notre hypothèse de recherche, cette observation va dans le sens de notre observation que SOCS1 augmente la croissance cellulaire des CT26 (**Figure 10A**). Pour ce qui est des cellules CT36, la baisse d'expression de SOCS1 dans ces dernières ne leur confère pas une capacité à croître sans ancrage à la MEC (résultat non montré).

A)



B)

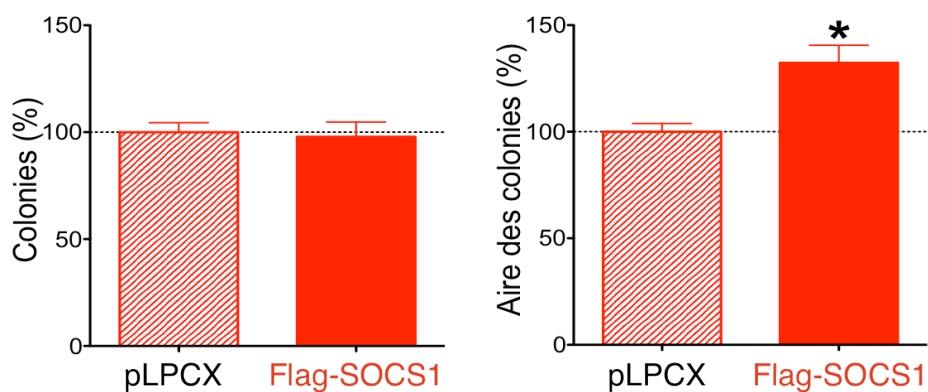


Figure 11. L'expression de SOCS1 dans les cellules CT26 n'a pas d'incidence sur leur capacité à former des colonies en agar mou, mais augmente leurs capacités à croître en indépendance d'ancrage.

Les cellules CT26 pLPCX et Flag-SOCS1 ont étéensemencées dans une couche d'agar mou (5000 cellules/puits dans une plaque de 6 puits) pendant 7 jours. Les colonies formées ont été visualisées grâce à une réaction de métabolisation du MTT, et par la suite photographiées. L'analyse des clichés a été réalisée via le logiciel Image J. **A)** Photographie représentative des colonies formées dans l'agar mou. **B)** Représentations graphiques du pourcentage (\pm SEM, $n = 3$ en triplicata) du nombre et de l'aire des colonies formées par les cellules CT26 Flag-SOCS1 en fonction de celles formées par les cellules CT26 pLPCX. Voir la légende des valeurs significatives (*) dans la section MATÉRIELS ET MÉTHODES.

2.4 SOCS1 augmente la capacité de CT26 et des CT36 à résister à l'anoïkose

Les résultats précédemment obtenus ne sont pas suffisants pour savoir si l'influence positive de SOCS1 sur la croissance en indépendance d'ancrage est due à l'augmentation de la capacité de ces cellules à survivre à l'anoïkose (apoptose induite suite à une perte d'interaction avec la MEC). En effet, en agar mou, les cellules peuvent synthétiser leurs propres MEC. Pour évaluer l'impact de SOCS1 sur la capacité des cellules CT26 et CT36 à résister à l'anoïkose, ces dernières ont étéensemencées dans des puits préalablement enduits de polyhema pour prévenir toute adhésion avec le pétri. Puis, la viabilité des cellules a été quantifiée par un essai mesurant la capacité des cellules à métaboliser le XTT (voir matériels et méthodes). Les cellules CT26 Flag-SOCS1 qui surexpriment SOCS1 présentent une résistance à l'anoïkose accrue, comparativement aux cellules CT26 pLPCX contrôles (**Figure 12A**). D'une manière cohérente, la diminution de l'expression de SOCS1 dans les CT36 abaisse significativement leur capacité à survivre en suspension (**Figure 12B**).

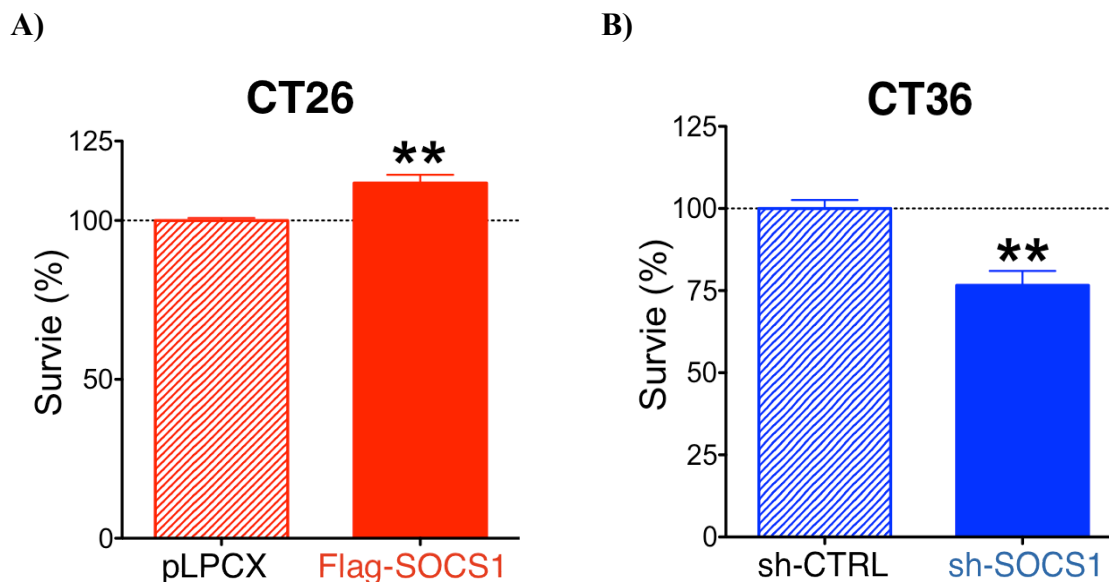


Figure 12. SOCS1 augmente la survie des cellules CT26/CT36 en suspension.

A) Représentation graphique du pourcentage (\pm SEM, n=3 en triplicata) de la viabilité des cellules CT26 Flag-SOCS1 en fonction des CT26 pLPCX. **B)** Représentation graphique du pourcentage de la viabilité des cellules CT36 sh-SOCS1 en fonction des CT36 sh-CTRL (\pm SD, n=2 en triplicata). Les cellules ont été mises en suspension dans un milieu sans sérum dans des plaques de 24 puits préalablement enduits de polyHema. Après 10 heures, la viabilité des cellules a été estimée grâce à un essai colorimétrique du métabolisme du XTT.

Le fait que l'expression de SOCS1 augmente l'aptitude des cellules CT26 et des CT36 à survivre en suspension va encore à l'encontre de notre hypothèse de recherche. Au terme de la caractérisation *in cellulo* de l'influence de SOCS1 sur les caractéristiques cancéreuses du modèle CT26/CT36, nos observations suggèrent un rôle pro-tumoral joué par SOCS1 dans le CCR.

2.5 SOCS1 augmente la capacité des CT26 à former des tumeurs in vivo

Dans l'optique de confirmer les observations faites *in cellulo* par une approche expérimentale *in vivo*, nous avons évalué le potentiel tumorigénique de SOCS1 dans un modèle murin. Les cellules CT26 surexprimant SOCS1 et leurs cellules contrôles, les CT26 pLPCX, ont été injectées de façons sous-cutanées dans des souris. Comme mentionné

précédemment, la lignée cellulaire CT26 provient originellement d'une souris BALB/c. Nous avons donc réalisé les injections dans des souris BALB/c qui ont un système immunitaire compétent. Sachant que SOCS1 joue un rôle dans le système immunitaire, nous avons aussi réalisé des injections dans des souris immunodéficientes NOD scid gamma (Alexander, 2002). En raison de caractéristiques cancéreuses de faible agressivité précédemment observées *in vitro*, la population CT36 sh-SOCS1 n'a pas fait l'objet d'une telle investigation *in vivo*. D'ailleurs, il est connu que l'inoculation sous-cutanée de cellules CT36 chez les souris BALB/c provoque que très rarement des tumeurs (Brattain et al., 1980).

Comme nous l'attendions, toutes les injections des cellules CT26 pLPCX ont abouti à la formation de tumeurs au site d'injection. En effet, il est connu que les CT26 ont un fort potentiel tumorigénique lors d'injection sous-cutanée dans les BALB/c (Brattain et al., 1980). Par la suite, la mesure du volume des tumeurs formées dans les BALB/c et dans les NOD scid gamma a été réalisée. Notre analyse révèle que les tumeurs formées par les cellules CT26 Flag-SOCS1 sont plus volumineuses comparativement à celles formées par les CT26 pLPCX, et ce quelque soit le type de souris (**Figure 13**).

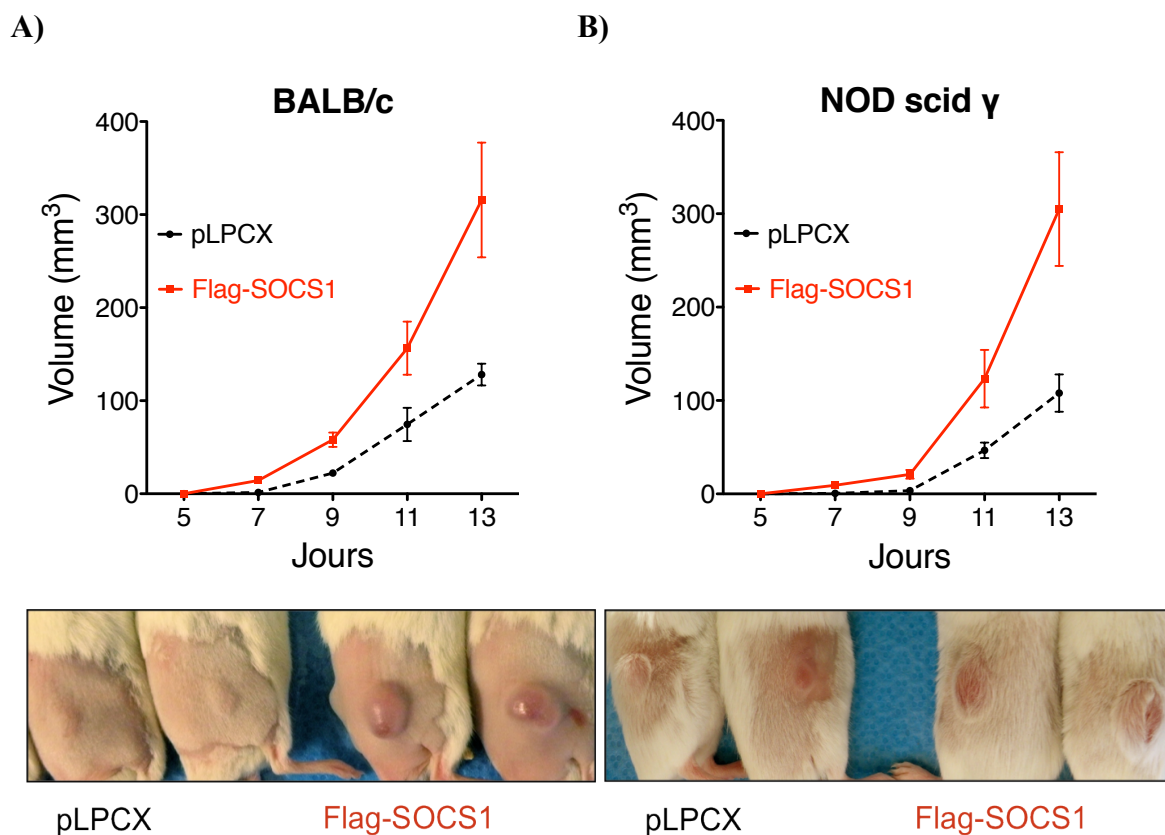


Figure 13. SOCS1 augmente la capacité des CT26 à former des tumeurs sous-cutanées dans les souris BALB/c et les NOD scid gamma.

Les cellules CT26 surexprimant SOCS1 ou le vecteur pLPCX (10^5), ont été injectées dans des souris BALB/c **A)** et NOD scid gamma **B)**. Pour chaque type cellulaire, trois souris ont été injectées de manière sous-cutanée au niveau des flancs droit et gauche, soit un total de six injections. Les graphiques représentent les volumes tumoraux selon le nombre de jours suite à l'injection des cellules dans les souris. Les photographies illustrent les souris le jour du sacrifice. Un test statistique 2way ANOVA démontre que les courbes (Flag-SOCS1 et pLPCX) sont significativement différentes ($p < 0,0001$) et ce dans les deux graphiques A) et B).

Ces résultats obtenus *in vivo* corroborent ceux obtenus *in cellulo* décrits précédemment. Toujours en opposition avec notre hypothèse initiale, ces évidences *in vivo* suggèrent un rôle pro-tumoral pour SOCS1 dans notre modèle CT26/CT36.

3. Caractérisation de l'influence de SOCS1 sur la signalisation intracellulaire des CT26

L'étude de l'implication de SOCS1 sur la signalisation intracellulaire des CT26 a été réalisée pour tenter de comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents aux fonctions cancéreuses induites par SOCS1 décrites précédemment. Pour cela, notre investigation a porté sur les trois voies de signalisation décrites pouvant être régulées par SOCS1 (Voir Introduction). D'abord, la signalisation des cytokines, puis la signalisation induite par le récepteur Met, et enfin celle du suppresseur de tumeur p53 ont été évaluées dans les cellules CT26.

3.1 SOCS1 régule négativement la signalisation des cytokines induite par l'IFNg

L'IFNg est la cytokine la mieux décrite pour induire la signalisation JAK1/STAT1 et un rétrocontrôle négatif par SOCS1 (Sakamoto et al., 1998). Une stimulation à l'IFNg a donc été réalisée dans les cellules CT26 qui surexpriment ou non SOCS1. Par la suite, l'activation de la signalisation JAK1/STAT1 a été estimée en évaluant l'état de phosphorylation du facteur STAT1 (pTyr 701). En accord avec ce qui est connu dans la littérature, et présenté dans la **partie 2.1**, les cellules qui surexpriment SOCS1 présentent une phosphorylation moindre de STAT1 en réponse à l'IFNg (**Figure 14**). De manière intéressante, ces cellules présentent aussi une baisse dans l'expression de STAT1 à l'état basal (sans stimulation à l'IFNg). Une telle observation avait déjà été faite dans le tissu colique du modèle murin *socs1*^{-/-TG}, dans lequel l'expression de SOCS1 est restaurée conditionnellement dans les lignées lymphocytaires B et T (Hanada et al., 2006).

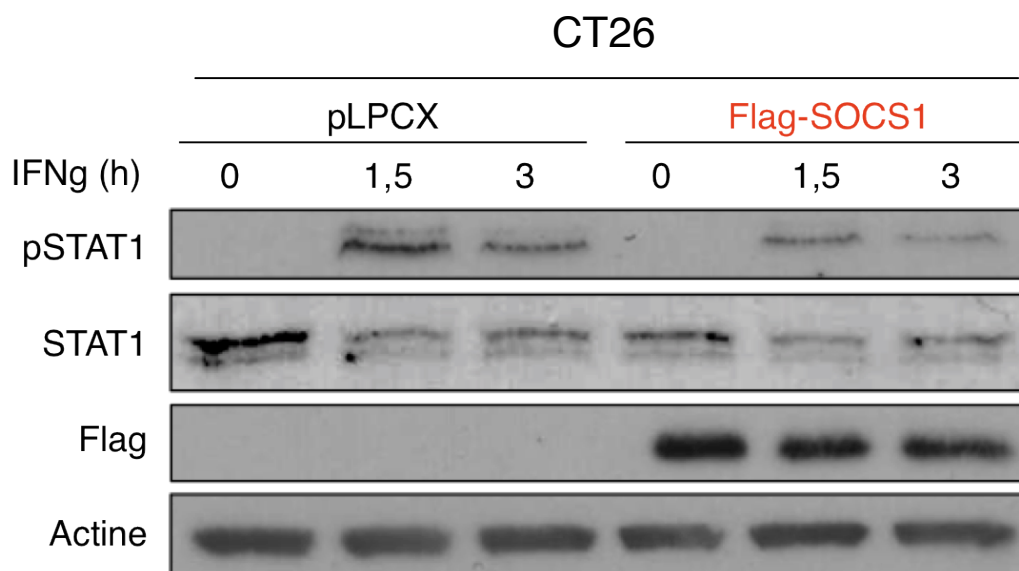


Figure 14. SOCS1 régule négativement l'activation du facteur STAT1 induite par l'IFN γ dans la lignée cellulaire CT26

Évaluation de l'expression et de la phosphorylation de STAT1 dans les cellules CT26 Flag-SOCS1 et pLPCX, plus ou moins stimulées à l'IFN γ (20ng/ml) réalisée par IB sur des lysats cellulaires totaux.

3.2 SOCS1 inhibe l'expression du récepteur Met dans les CT26

La protéine SOCS1 possède l'aptitude à réguler négativement l'expression du récepteur Met, ainsi que sa signalisation et les fonctions biologiques induites suite à une stimulation à l'HGF dans les hépatocytes (Gui et al., 2011). Il doit être précisé que la lignée cellulaire CT26 est bien décrite dans la littérature pour présenter des caractéristiques tumorigéniques et métastatiques en partie dépendantes de l'activité du récepteur Met (Kubota et al., 2004; Matsumura et al., 2013). Pour savoir si SOCS1 conserve cette faculté dans les cellules de CCR CT26, nous avons évalué l'expression, ainsi que l'état d'activation du récepteur Met dans les cellules CT26 qui surexpriment SOCS1. Nos résultats supportent une inhibition de l'expression de Met par SOCS1 dans les cellules CT26 (**Figure 15**). Cette observation va de pair avec une baisse de l'activation de Met, mis en évidence par sa phosphorylation réduite sur tyrosines suite à une stimulation à l'HGF.

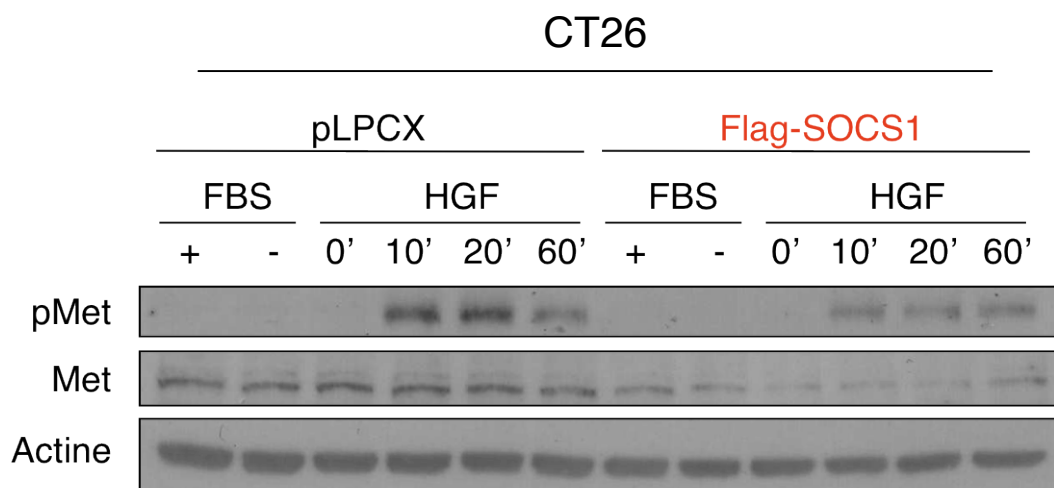


Figure 15. SOCS1 régule négativement l'expression du récepteur Met ainsi que son activation induite par l'HGF dans la lignée cellulaire CT26

Les cellules CT26 Flag-SOCS1 et pLPCX ont été maintenues dans du milieu contenant du FBS (10%), ou bien sujettes à une privation en sérum suivi ou non d'une stimulation à l'HGF (25ng/ml). Des IB visant à évaluer l'expression et la phosphorylation du récepteur Met ont été réalisés sur des lysats cellulaires totaux.

SOCS1 interagit et inhibe l'expression de p66SHC

Via l'utilisation de la spectrométrie de masse comme moyen de découvrir des nouveaux partenaires protéiques de SOCS1, une récente publication a rapportée une probable interaction entre SOCS1 et la protéine adaptatrice p66SHC (Malette et al., 2010). Les protéines Shc sont des protéines adaptatrices communément recrutées aux RTK actifs et impliquées dans la transduction du signal en aval. Il existe trois isoformes de la protéine Shc (p46, p52, et p66). L'isoforme p66SHC se distingue des autres isoformes notamment pour sa capacité à induire l'apoptose suite à un stress oxydatif, et à inhiber l'activation de la voie mitogénique des MAPK en aval des RTK (Galimov, 2010; Migliaccio et al., 1997). En cela, P66SHC est de plus en plus considéré comme un suppresseur de tumeur.

Pour confirmer l'interaction entre SOCS1 et P66SHC décrite par Malette et ses collaborateurs, une expérience d'interaction *in vitro* à l'aide d'une protéine de fusion GST-SOCS1 a été réalisée (**Figure 16A**). Effectivement, notre expérience suggère qu'il existe

bien une interaction protéique entre SOCS1 et p66SHC. Par ailleurs, SOCS1 étant connu pour induire la dégradation des protéines auxquelles elle s'associe, nous avons investigué une probable régulation négative de p66SHC par SOCS1 en condition transitoire dans les cellules HEK293 (**Figure 16B**). Pour cela, les séquences codantes pour SOCS1 et HA-p66SHC ont été co-transfectées dans les cellules épithéliales humaines de rein HEK293, puis l'expression de HA-p66SHC a été évaluée par IB et quantifiée par densitométrie. L'analyse basée sur trois expériences distinctes révèle que SOCS1 a la capacité d'inhiber l'expression de P66SHC (**Figure 16C**).

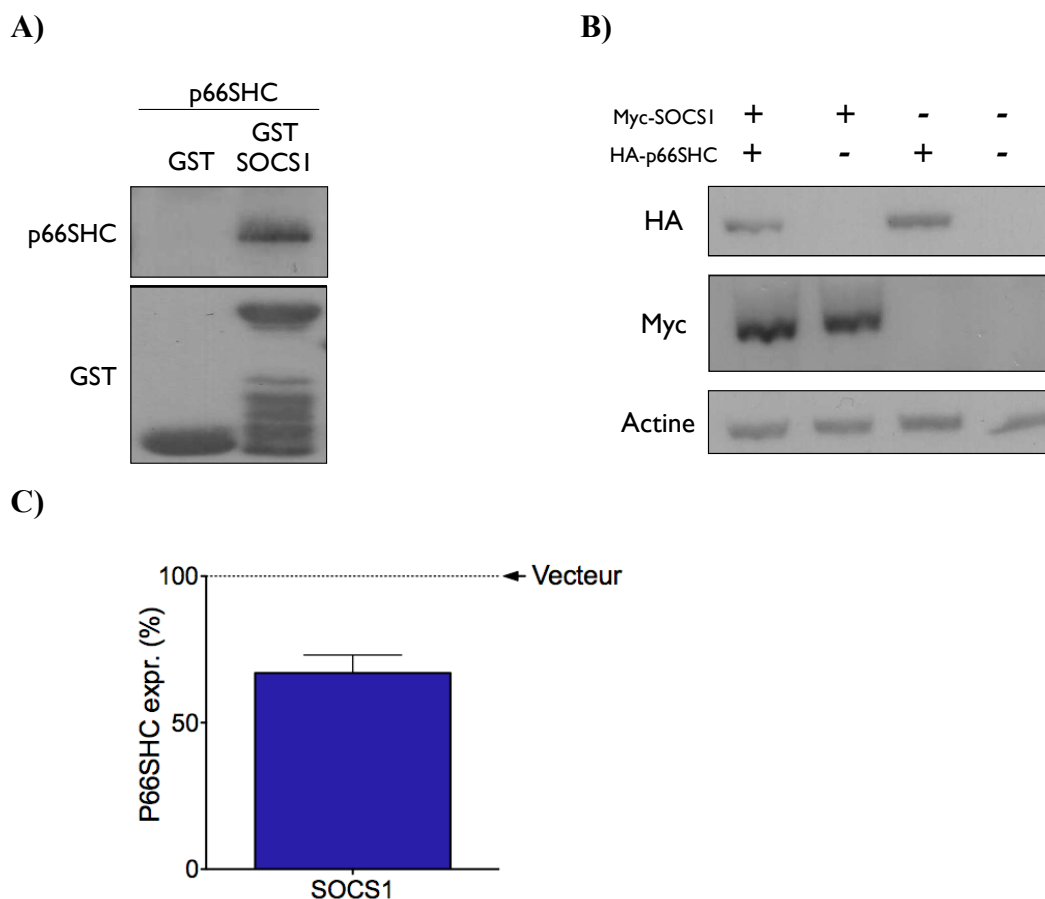


Figure 16. SOCS1 interagit et régule négativement l'expression exogène de P66SHC dans les cellules HEK 293

A) Validation de l'interaction entre SOCS1 et l'isoforme p66SHC. Les protéines Myc-SOCS1 et HA-p66SHC ont été exprimées transitoirement dans des HEK293. Les niveaux protéiques de SOCS1, de p66Shc et de l'actine ont été évalués par IB sur des lysats cellulaires totaux. **B)** Les quantifications sur trois expériences indépendantes ont été réalisées par densitométrie. La représentation graphique illustre le pourcentage d'expression de p66SHC en présence de SOCS1 par rapport à son expression en absence de SOCS1. Les barres d'erreurs sont obtenues par le calcul de SD. **C)** Expérience d'interaction protéique *in vitro* entre la protéine de fusion GST-SOCS1 et du lysat cellulaire total de HEK293 surexprimant la protéine p66SHC avec une étiquette HA.

SOCS1 ayant la capacité d'interagir et inhiber l'expression de p66SHC exogène en condition transitoire, le niveau d'expression de p66SHC endogène a été évalué dans les cellules CT26 (**Figure 17**). Les résultats révèlent que l'expression de p66SHC varie en fonction de l'expression de SOCS1. L'analyse quantitative de trois expériences indépendantes démontre une régulation négative marquée de l'isoforme P66SHC par SOCS1 dans les cellules CT26 Flag-SOCS1 et sh-SOCS1 dans lesquelles l'expression de SOCS1 est modulée (**Figure 17B**).

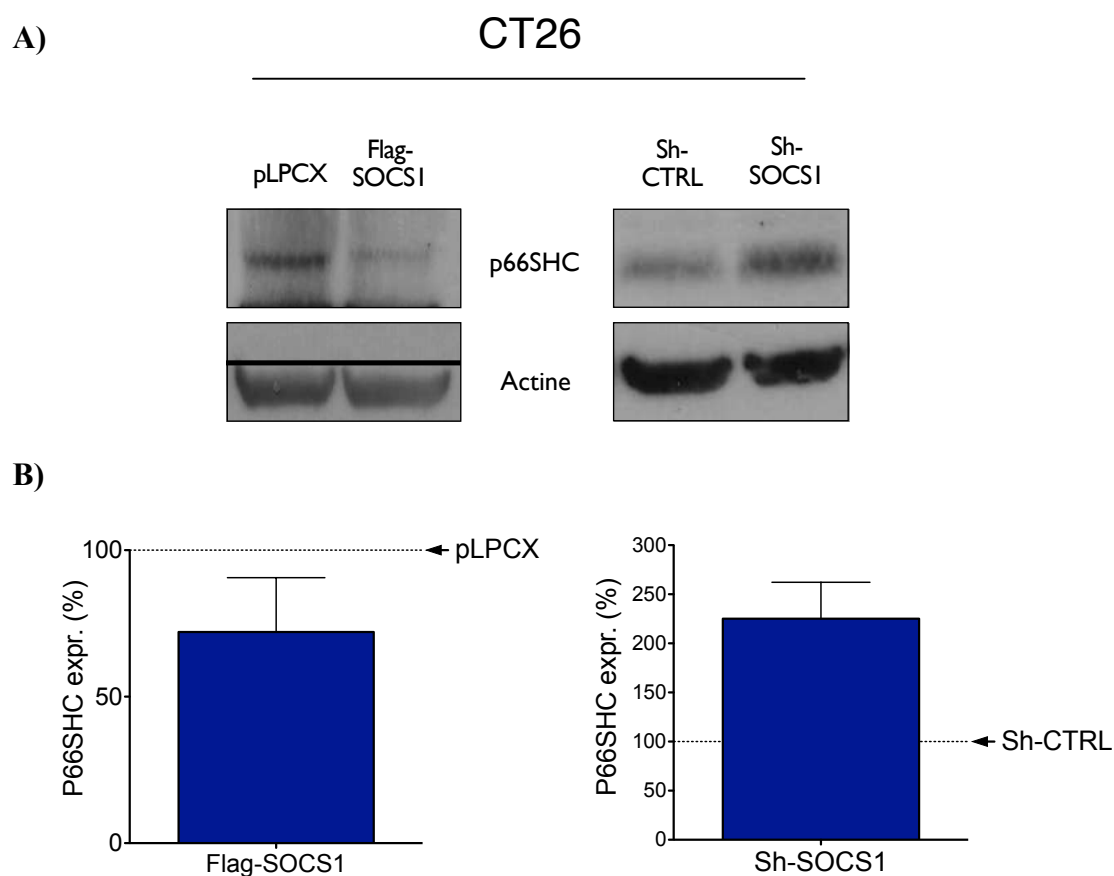


Figure 17. SOCS1 régule négativement l'expression de P66SHC dans la lignée cellulaire CT26

A) IB dirigé contre la protéine endogène p66SHC dans des LCT provenant des populations cellulaires CT26 Flag-SOCS1/pLPCX et CT26 Sh-SOCS1/Sh-CTRL. **B)** Densitométrie quantifiant les niveaux protéiques de p66Shc dans les contextes cellulaires CT26 Flag-SOCS1/pLPCX et CT26 Sh-SOCS1/Sh-CTRL. Les représentations graphiques sont basées sur 3 expériences indépendantes et les barres d'erreurs sont obtenues par le calcul de SD.

3.3 SOCS1 favorise l'activation de p53 suite à un dommage à l'ADN mais réprime l'expression de P21 cip/kip

En réponse à un stress cellulaire, comme par exemple un dommage à l'ADN, p53 va agir en tant que suppresseur de tumeur en activant la transcription de gènes impliqués dans des processus tels que la réparation de l'ADN, le contrôle du cycle cellulaire, la sénescence ou encore l'apoptose (Lowe et al., 2004). Suite à un stress, le niveau d'expression de p53 va rapidement augmenter et va s'accompagner de modifications post-traductionnelles. Ces dernières sont requises pour stabiliser son expression et pour promouvoir son activité transcriptionnelle. La phosphorylation de sa sérine en position 15 (18 dans la séquence murine) est une de ces modifications post-traductionnelles cruciales. En effet, elle est nécessaire à l'activité suppresseur de tumeur de p53 *in vivo* (Armata et al., 2007). Tel que précédemment abordé dans l'introduction (**Figure 5**), SOCS1 a la capacité de promouvoir cette phosphorylation sur la S15, augmentant l'activité transcriptionnelle de p53 et ainsi induire un programme de sénescence cellulaire (Calabrese et al., 2009).

Pour savoir si SOCS1 conserve cette faculté dans une lignée cellulaire de CCR, les cellules CT26 surexprimant SOCS1 ont été traitées avec du cisplatine dans le but d'induire un stress génotoxique et ainsi évaluer l'état d'activation de la signalisation de p53. Dans un premier temps, les niveaux d'expression et de phosphorylation de p53 ont été évalués par IB. Puis l'expression de p21, une cible transcriptionnelle bien connue de p53 a ensuite été évaluée. Notre analyse confirme que l'expression de SOCS1 favorise bien la stabilisation ainsi que la phosphorylation de p53 sur sa sérine 18 (**Figure 18**). On remarque notamment que cette phosphorylation est maintenue davantage dans le temps en présence de SOCS1. P21 étant une cible transcriptionnelle de P53, une augmentation de son expression était attendu dans les cellules CT26 qui surexpriment SOCS1. Paradoxalement nos résultats font état d'une baisse d'expression de P21 en présence SOCS1. D'une manière intéressante on remarque que cette baisse d'expression de P21 induite par SOCS1 est aussi visible à l'état basal, sans stimulation au cisplatine. Bien que ces résultats soient issus d'une expérience préliminaire (n=1), ils confirment ceux obtenus par Mehdi Yeganeh du laboratoire du Pr. Ilangumaran dans d'autres lignées cellulaires (Yeganeh et al, en préparation).

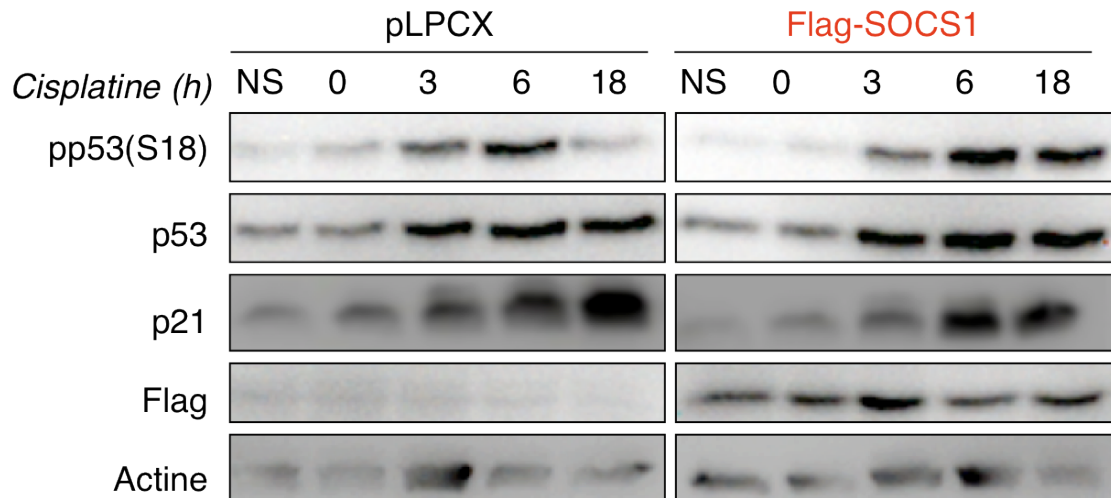


Figure 18. SOCS1 induit l'expression et l'activation de P53, mais paradoxalement réprime l'expression de P21 une de ses cibles transcriptionnelle

Les populations cellulaires CT26 Flag-SOCS1 et CT26 pLPCX ont été traitées avec 10 uM de Cisplatine pendant trois heures, puis les cellules ont été lavées avec du PBS. Des populations cellulaires contrôles n'ont pas été traitées et sont notées NS (Non Stimulées). Les lysats cellulaires ont été réalisés aux heures indiquées suivant le traitement. Des IB visant à évaluer l'activation de la signalisation de P53 ont été réalisés sur des lysats cellulaires totaux. Les IB présentés proviennent d'une seule et même membrane, et ont été divisés pour des raisons de clarté.

DISCUSSION

1. SOCS1 amplifie les caractéristiques cancéreuses des lignées CCR CT26/CT36

À l'origine de notre étude, nous avons émis comme hypothèse de recherche que SOCS1 agirait en tant que suppresseur de tumeur dans le CCR. Cependant, notre investigation *in vitro* et *in vivo* des caractéristiques cancéreuses des lignées CT26 et CT36 suite à une modulation de l'expression de SOCS1 suggère le contraire. En effet, nous avons mis en évidence que la surexpression de SOCS1 augmente les attributs cancéreux des CT26, tandis que sa baisse d'expression dans les CT36 les diminue. Les caractéristiques cancéreuses dont il est fait référence ici sont la croissance cellulaire, la croissance sans ancrage à la MEC, la résistance à l'anoïkose ainsi que la croissance de tumeurs expérimentales sous-cutanées chez la souris (**Figures 10-13**). Afin de confirmer ces observations, une approche expérimentale en miroir a été réalisée, soit, une baisse d'expression de SOCS1 dans les cellules CT26 et une surexpression de SOCS1 dans les cellules CT36 (résultats non montrés). De façon cohérente avec les précédents résultats, cette approche confirme l'action pro-tumorale menée par SOCS1 dans le modèle cellulaire CCR CT26/C36 (**Tableau 6**).

	CT26	CT36
Flag-SOCS1	<ul style="list-style-type: none"> ≠ Morphologie cellulaire ↑ Croissance cellulaire ↑ Croissance sans ancrage ↑ Résistance à l'anoïkose ↑ Croissance tumorale <i>in vivo</i> 	<ul style="list-style-type: none"> ≠ Morphologie cellulaire ↑ Croissance cellulaire ≠ Croissance sans ancrage ↑ Résistance à l'anoïkose
sh-SOCS1	<ul style="list-style-type: none"> ≠ Morphologie cellulaire ↓ Croissance cellulaire ↓ Croissance sans ancrage ↓ Résistance à l'anoïkose 	<ul style="list-style-type: none"> ≠ Morphologie cellulaire ↓ Croissance cellulaire ≠ Croissance sans ancrage ↓ Résistance à l'anoïkose

Tableau 6. Rôle pro-tumoral joué par SOCS1 dans le modèle cellulaire CCR CT26/36

Compilation des observations faites suite à la modulation de l'expression de SOCS1 dans les lignées cellulaires CT26/CT36.

1.1 Limites expérimentales et perspectives

Les essais de croissance cellulaire, de résistance à l'anoïkose ainsi que de croissance tumorale sous-cutanée précédemment présentés sont autant d'expériences visant à caractériser l'implication de SOCS1 dans les processus biologiques impliqués dans le CCR. Toutefois, cette caractérisation présente certaines limitations expérimentales et nécessitera que d'autres expériences complémentaires soient entreprises.

Par exemples, des essais d'incorporation de BrdU ou de thymidine tritiée devront être réalisés afin de compléter nos résultats démontrant une augmentation de la croissance cellulaire induite par SOCS1 (**Figure 10**). En effet, cette modulation de la croissance cellulaire, pourrait être expliquée par une action de SOCS1 sur la prolifération ou aussi par une inhibition de l'apoptose, ce que nos données actuelles ne nous permettent pas de distinguer.

Pour ce qui est de nos essais de survie en suspension, ils présentent la limite d'utiliser le XTT pour évaluer la viabilité (voir la section MATÉRIELS ET MÉTHODES). En étant métabolisé lors d'une réaction mitochondriale, le XTT agit de telle sorte que les différences de viabilité observées peuvent être confondues avec une simple différence dans les métabolismes cellulaires (**Figure 12**). Aussi, ces essais de survie en suspension visent à investiguer la capacité des cellules à résister à l'anoïkose qui consiste en un mécanisme de mort programmé survenant suite au détachement des cellules à la MEC. Au niveau moléculaire, l'anoïkose est considéré comme un processus apoptotique dit « caspase-dépendant », dans la mesure où il fait intervenir le clivage de la pro-Caspase 9 menant à l'activation des Caspases effectrices et ainsi à l'apoptose (Vachon, 2011). De ce fait, pour conclure sur l'implication de SOCS1 sur la résistance à l'anoïkose, il serait donc opportun d'évaluer le statut des Caspases dans notre modèle cellulaire.

Considéré comme étape limitant les processus métastatiques, la résistance à l'anoïkose permet aux cellules de survivre dans la circulation sanguine et ainsi permettre la dissémination des cellules cancéreuses à d'autres organes et de ce fait la formation de métastases. Pour évaluer l'implication de SOCS1 dans les processus métastatiques, il

conviendrait de réaliser des essais de métastases expérimentales dans lesquels des cellules sont injectées dans la rate (injections intra-spléniques) afin d'y analyser la capacité d'établissement des métastases dans le foie. D'ailleurs, le rôle joué par SOCS1 sur la migration et sur l'invasion cellulaire, qui sont des fonctions hautement impliquées dans la formation de métastases, devraient être évalué grâce à de nombreux types d'expérience prévus à cet effet, comme en évaluant la capacité des cellules à pénétrer dans du matrigel [résumé dans (Valster et al., 2005)].

2. Rôle de SOCS1 dans le cancer : la controverse prend de l'ampleur

Les fonctions exercées par SOCS1 dans les cancers sont aujourd'hui de plus en plus sujettes à controverses (Zhang et al., 2012). Pour ses capacités à réguler l'inflammation et à induire la dégradation des protéines kinases auxquelles elle s'associe, SOCS1 est majoritairement présentée comme une protéine suppresseur de tumeurs (Introduction 2). D'autant plus que son expression est souvent perdue dans certains cancers des suite de phénomènes épigénétiques (Sasi et al., 2010; Zhang et al., 2012). Aussi, SOCS1 est capable d'inhiber la signalisation de l'oncogène Met et favorise l'activation du suppresseur de tumeur p53 (Calabrese et al., 2009; Gui et al., 2011).

Néanmoins, certaines études cliniques révèlent une augmentation de son expression dans les cancers du sein et les mélanomes. Ces observations laissent supposer, au contraire, que SOCS1 favoriserait l'émergence de certains cancers (**Tableau 3**). Récemment, la lignée cellulaire B16F10 provenant d'un mélanome murin a été décrite pour exprimer constitutivement SOCS1, aussi bien au niveau de son transcrite qu'au niveau protéique (Scutti et al., 2011). La baisse de cette expression par interférence à l'ARN s'accompagne de la diminution des caractéristiques cancéreuses de ces cellules, telles que la prolifération, la mobilité, l'invasion, la résistance à l'anoïkose et même la formation tumorale *in vivo* (Scutti et al., 2011). Basés sur leurs résultats, les auteurs attribuent à SOCS1 une fonction d'oncoprotéine dans les mélanomes, et suggèrent que cibler SOCS1 pourrait représenter une avenue thérapeutique dans ces types de cancers. Cependant, aucun mécanisme moléculaire n'est proposé pour tenter d'expliquer ce renversement phénotypique observé suite à la perte de SOCS1 (Scutti et al., 2011).

À l'instar de cette étude, notre caractérisation *in cellulo* et *in vivo* démontre une influence positive de SOCS1 sur les caractéristiques tumorigénique et métastatique du modèle cellulaire CT26/CT36. Pour la première fois dans littérature, notre étude propose que SOCS1 pourrait exercer un rôle d'oncogène dans le CCR.

D'une manière intéressante, on remarque que les CCR et les mélanomes présentent une similarité relative pour ce qui est des événements moléculaires qui favorisent leurs émergences (Hodis et al., 2012). Les mutations sur les gènes RAS, RAF ou encore p53 sont considérés comme des étapes majeures dans la progression tumorale aussi bien des CCR que des mélanomes. Par ailleurs, ces deux types de carcinomes partagent certains marqueurs moléculaires servant à leurs diagnostics tels que le MAGEA (melanoma antigen family A) (Lee. et al., 2013). Notre étude portant sur l'influence de SOCS1 sur les voies de signalisations JAK/STAT, du RTK Met et de p53, nous a permis d'avancer des éléments de réponse quant aux raisons du rôle pro-tumoral joué par SOCS1 dans le CCR.

3. Évidences moléculaires de l'activité pro-tumorale de SOCS1 dans les cellules de CCR

Les données présentées ci-après sont relatives à la lignée CT26, car rien n'est connu pour ce qui est des altérations génétiques et moléculaires concernant la lignée CT36.

3.1 SOCS1 régule la signalisation antiproliférative JAK1/STAT1

Les cytokines ont la capacité d'induire chez une cellule, une vaste diversité d'effets biologiques (Krebs and Hilton, 2001). Cette diversité est permise grâce à l'hétérogénéité de la signalisation intracellulaire JAK/STAT qui va amplifier le signal et engager un programme génétique adapté (**Figure 1**). En effet, il existe quatre différentes kinases JAK (1, 2, 3 et TYK2) et sept différents facteurs de transcription STAT (1, 2, 3, 4, 5a, 5b et 6) (Aaronson and Horvath, 2002). Il y a donc une grande spécificité entre le type de signalisation JAK/STAT induite et le type de programme génétique mis en place. Par exemple les facteurs STAT1 et STAT3 vont induire des programmes génétiques différents et sont respectivement considérés comme suppresseur de tumeur et oncogène (Pensa. et al., 2009). Alors que STAT3 favorise la prolifération, la survie et la mobilité, STAT1 quant à

lui présente des caractéristiques proinflammatoires, antiprolifératives et proapoptiques (Pensa. et al., 2009). Parmi les différentes cytokines, l'IFN γ est connue pour particulièrement activer le facteur STAT1 via la kinase JAK1 et ainsi inhiber la prolifération cellulaire (Aaronson and Horvath, 2002). Il a d'ailleurs été montré qu'une activation constitutive de STAT1 dans les fibroblastes améliore spécifiquement l'effet antiprolifératif induit par l'IFN γ (Shuai et al., 1996). Aussi, l'IFN γ conserve ses facultés antiprolifératives et de suppresseur de tumeur dans les cellules CCR CT26 (Kawano et al., 2007).

Nous savons depuis longtemps que la signalisation JAK1/STAT1 induite par l'IFN γ est finement régulée par SOCS1 (Sakamoto et al., 1998) (**Figure 4**). SOCS1 est même reconnu pour être directement responsable de l'inhibition des effets antiprolifératifs induits par l'IFN γ sur la lignée cancéreuse Hela (Song and Shuai, 1998). Dans notre modèle cellulaire CCR CT26, nous avons validé que SOCS1 conservait cette faculté d'inhiber l'activation du facteur STAT1, notamment illustré par la baisse de sa phosphorylation lors d'une stimulation à l'IFN γ (**Figure 14**). D'une manière intéressante, on remarque aussi une baisse de l'expression de STAT1 en présence de SOCS1, et ce même en absence de stimulation à l'IFN γ (**Figure 14**). Pour ce qui est de STAT3, considérée à l'inverse de STAT1 comme un puissant oncogène, aucune modulation de son expression par SOCS1 n'a pu être constatée dans notre modèle cellulaire. La raison à cela provient du fait que la lignée CCR CT26 n'exprime pas, ou d'une manière imperceptible STAT3 (donnés non-montrées).

En s'appuyant sur nos résultats ainsi que sur les données de la littérature, nous suggérons que SOCS1 pourrait agir en tant qu'oncogène dans le CCR via son action répressive de la signalisation JAK1/STAT1 dans les cellules cancéreuses. Pour évaluer cette hypothèse, des tests de croissance ou de prolifération cellulaire sous stimulation à l'IFN γ devraient être réalisés.

3.2 SOCS1 inhibe l'expression du récepteur Met, mais paradoxalement conserve une action pro-tumorale dans la lignée CT26

La signalisation induite par le récepteur Met est bien caractérisée pour favoriser la mise en place d'un programme tumorigénique chez la cellule (Birchmeier et al., 2003). D'ailleurs, une dérégulation de l'expression des partenaires HGF/MET est fréquemment retrouvée dans la grande majorité des cancers (**Tableau 2**). Les travaux menés dans les hépatocytes révèlent que SOCS1 inhibe l'expression du récepteur Met ainsi que sa signalisation induite par son ligand HGF (Gui et al., 2011 ; Gui et al., soumis). De surcroît, la surexpression de SOCS1 dans les cellules d'hépatocarcinome murin, Hepa1-6, provoque la baisse du phénotype tumorigénique et métastatiques de ces cellules (Gui et al., 2013 résultats non-publiés).

La lignée cellulaire colique CT26 est reconnue pour présenter des attributs tumorigéniques et métastatiques en partie dépendant de l'activité du récepteur Met (Kubota et al., 2004; Matsumura et al., 2013). De ce fait, et en adéquation avec les résultats obtenus dans les cellules Hepa1-6, la surexpression de SOCS1 dans les CT26 devrait abaisser ses caractéristiques cancéreuses. À l'image des observations faites dans les hépatocytes, nos résultats révèlent que SOCS1 conserve bien son aptitude à inhiber l'expression du récepteur Met dans la lignée cancéreuse colique CT26 (**Figure 15**). Cette baisse d'expression est suffisante pour expliquer la baisse de la phosphorylation également observée. Cependant, les cellules CT26 qui surexpriment SOCS1 présentent des caractéristiques fonctionnelles cancéreuses plus agressives par rapport aux cellules CT26 contrôles (**Figure 10-13**). Le paradoxe de ces résultats pourrait résider dans le fait que la lignée cellulaire CT26 possède une mutation activatrice dans l'oncogène *k-ras* au niveau du codon 12 (Zhang et al., 2009). Ces mutations activatrices sont fréquentes, et représentent jusqu'à 40% des tumeurs CCR (Winder and Lenz, 2010). K-RAS est une protéine charnière dans l'activation de la voie mitogénique des MAPK induite par les RTK et donc par Met (**Figure 6**). Se situant en aval des RTK, une activation aberrante de K-RAS activerait le sentier de signalisation des MAPK indépendamment de l'activation des RTK. Cela s'illustre en clinique par le fait que les tumeurs CCR présentant une mutation activatrice pour K-RAS sont résistantes aux chimiothérapies utilisant le Cetuximab ciblant le RTK EGFR (Winder and Lenz, 2010).

Nous proposons donc que les hypothétiques effets biologiques dus à l'inhibition de l'expression de Met par SOCS1 dans les CT26, seraient masqués par l'activation aberrante de K-RAS. Pour tester cette hypothèse, l'usage de lignées cellulaires syngéniques pour RAS serait judicieux.

D'autre part, une étude a récemment mis en évidence, que SOCS1 pourrait être phosphorylée sur ses tyrosines 155 et 204 par la tyrosine kinase Bcr-Abl (Qiu et al., 2012). Cette dernière possède un fort potentiel tumorigénique dépendant de la signalisation JAK/STAT5. SOCS1 étant un puissant régulateur négatif de la signalisation JAK/STAT, il devrait agir en tant que suppresseur de tumeur dans un tel contexte. Cependant, ce n'est pas le cas, et les auteurs démontrent que la phosphorylation sur tyrosines de SOCS1 en serait la cause. La protéine SOCS1 phosphorylée perdrait sa capacité à recruter le complexe protéique elongines B/C requis pour induire la dégradation protéasomale des kinases JAK1 et 2 (Qiu et al., 2012). En association avec Yirui Gui, notre laboratoire a mis en évidence que le RTK Met avait la capacité de phosphoryler SOCS1 sur tyrosine (Gui et al., Oncogene 2013, résultats non-publiés). L'activation du récepteur Met dans la lignée CT26 pourrait donc phosphoryler SOCS1 sur tyrosine de sorte que son habilité à recruter le complexe E3 ubiquitine ligase en soit diminuer. Dans un contexte où le RTK Met est actif, la protéine SOCS1 serait donc fonctionnellement diminuée suite à sa phosphorylation. Cependant dans notre modèle cellulaire CT26, nos résultats ne nous permettent pas de savoir dans quelle mesure cette probable phosphorylation réduit les caractéristiques fonctionnelles de SOCS1. L'utilisation d'un mutant de SOCS1 comportant des substitutions pour ses tyrosines phosphorylées serait tout indiquée.

3.3 SOCS1 régule négativement l'expression du suppresseur de tumeur p66SHC

Les protéines Shc sont dites adaptatrices. Elles ont la capacité d'initier la formation de complexes protéiques aux abords des RTK et d'en moduler la signalisation induite (Figure-6). Parmi elles, p66Shc se distingue des autres isoformes de Shc (p46Shc et p52Shc) en étant considérée comme un très probable suppresseur de tumeur. D'abord, p66Shc est connu pour inhiber la signalisation mitogénique des MAPK en aval des RTK (Migliaccio et al., 1997). Selon les travaux menés par notre laboratoire, p66Shc a même la capacité d'abaisser certaines caractéristiques cancéreuses induites par le récepteur Met dans les

cellules épithéliales intestinales de rat (Landry et al. résultats non-publiés). Ensuite, p66Shc est impliquée dans la réponse apoptotique suite à un stress oxydatif (Galimov, 2010). L'invalidation spécifique de l'isoforme p66Shc dans des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF p66^{-/-}) a permis de montrer une résistance de ces cellules à rentrer en apoptose suite à un traitement au peroxyde d'oxygène (H₂O₂) (Migliaccio et al., 1999). D'ailleurs, les cellules MEF en condition de stress oxydatif induit par UV ou par H₂O₂, présentent une augmentation de l'expression de p66Shc ainsi que sa stabilisation, et ce uniquement dans un contexte où le suppresseur de tumeur p53 est fonctionnel (Trinei et al., 2002). De manière intéressante, nos résultats préliminaires confirment que le traitement par du H₂O₂ de la lignée CT26, dont p53 est de type sauvage, présente également l'augmentation et la stabilisation de p66Shc (résultat non montré). Cependant, la réponse biologique suite aux stress oxydatifs peut être très différente d'un type cellulaire à l'autre (Laurent et al., 2005). Par exemple, le traitement par une faible concentration d'H₂O₂ de la lignée fibroblastique non transformée NIH3T3 voit sa prolifération augmentée, alors qu'elle diminue dans la lignée colique CT26. De surcroît, le stress oxydatif présente des effets antitumoraux *in vivo* dans les cellules CT26, inhibant leur capacité à croître de façon sous-cutanée chez la souris (Laurent et al., 2005).

Une étude utilisant la spectrométrie de masse a récemment proposé que les protéines SOCS1 et p66Shc seraient susceptibles d'interagir (Mallette et al., 2010). Nos résultats ont tout d'abord permis de confirmer cette interaction (**Figure 16**). Puis, nous avons démontré que SOCS1 avait la capacité d'inhiber l'expression de p66Shc, que ce soit en condition transitoire, dans la lignée HEK293, ou en condition stable dans la lignée CCR CT26 (**Figure 16; Figure 17**).

En résumé, p66Shc est considéré comme étant un suppresseur de tumeur notamment grâce à son implication dans la réponse cellulaire suite aux stress oxydatifs. À l'image d'autres lignées cancéreuses, la lignée CT26 est sensible aux stress oxydatifs. Par conséquent, suite à un traitement au H₂O₂, les CT26 présentent une réduction de leurs caractéristiques cancéreuses et une augmentation de l'expression de p66Shc. Quant à nos résultats, ils confirment une interaction ainsi qu'une inhibition de l'expression de p66Shc par SOCS1.

En conséquence, nous proposons que l'intensification des caractéristiques cancéreuses observées dans les cellules CT26 qui surexpriment SOCS1 pourrait s'expliquer par une régulation négative du suppresseur de tumeur p66Shc. Pour tester cette hypothèse, il conviendrait d'utiliser une lignée CT26 déficiente pour l'isoforme p66Shc et évaluer si SOCS1 continue de se comporter en tant qu'oncogène.

3.4 SOCS1 régule négativement l'expression du suppresseur de tumeur p21

Comme présenté précédemment, SOCS1 a la capacité de promouvoir la sénescence cellulaire en induisant l'activation du suppresseur de tumeur p53 (Calabrese et al., 2009). En présence de SOCS1, cette activation est symbolisée par une hausse de la phosphorylation de p53 sur sa sérine 15, ce qui favorise son activité transcriptionnelle (**Figure 5**). Une de ses cibles transcriptionnelles bien connues est la protéine p21. Celle-ci a été largement caractérisée pour inhiber l'activité du complexe mitogénique cycline/CDK, ce qui a pour conséquence de bloquer le cycle cellulaire entre la phase G1 et S. Dans cette mesure la protéine p21 est unanimement considérée comme étant un suppresseur de tumeurs dans les cancers.

Dans notre modèle cellulaire, soit la lignée CCR CT26 qui surexprime SOCS1, l'activation de p53 semble, en accord avec la littérature, être favorisée. Effectivement, on remarque que la phosphorylation sur la sérine 18 (séquence murine) de p53 est aussi augmentée et soutenue suite à un stress génotoxique induit par un traitement au cisplatine (**Figure 18**). De manière paradoxale, nous remarquons dans ces mêmes CT26 Flag-SOCS1, que l'expression de p21 est diminuée, que ce soit ou non en présence de cisplatine (**Figure 18**). Étant donné que p21 est une cible transcriptionnelle bien connue de p53, il aurait été logique de voir, au contraire, que son expression soit augmentée dans les cellules CT26 qui surexpriment SOCS1. Cependant, ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par le laboratoire du professeur Ilangumaran dans le contexte cellulaire hépatique (Yeganeh et al., résultats non-publiés). Étant donné le rôle joué par p21 dans la régulation du cycle cellulaire, nous proposons que sa régulation négative par SOCS1, pourrait être en partie responsable de l'accroissement des caractéristiques cancéreuses des cellules CT26 Flag-SOCS1.

4. Modèle moléculaire proposé pour le rôle pro-tumoral de SOCS1 dans le CCR

Notre caractérisation de l'influence de SOCS1 sur les voies de signalisations JAK1/STAT1, du récepteur Met et de p53, nous a permis d'avancer des éléments de réponses quant aux mécanismes moléculaires sous-jacents au rôle pro-tumoral de SOCS1 dans le CCR. Ces dernières sont résumées dans le modèle suivant (**Figure 19**). En inhibant l'activité de suppresseurs de tumeur tels que STAT1, p21 ou encore p66Shc, SOCS1 favoriserait la progression tumorale colique. Fréquemment dans le CCR l'oncogène RAS présente une activation aberrante. Dans un tel contexte, l'action répressive de SOCS1 sur le récepteur Met n'aura pas d'incidence. De plus sa probable phosphorylation par Met le rendrait fonctionnellement inactif.

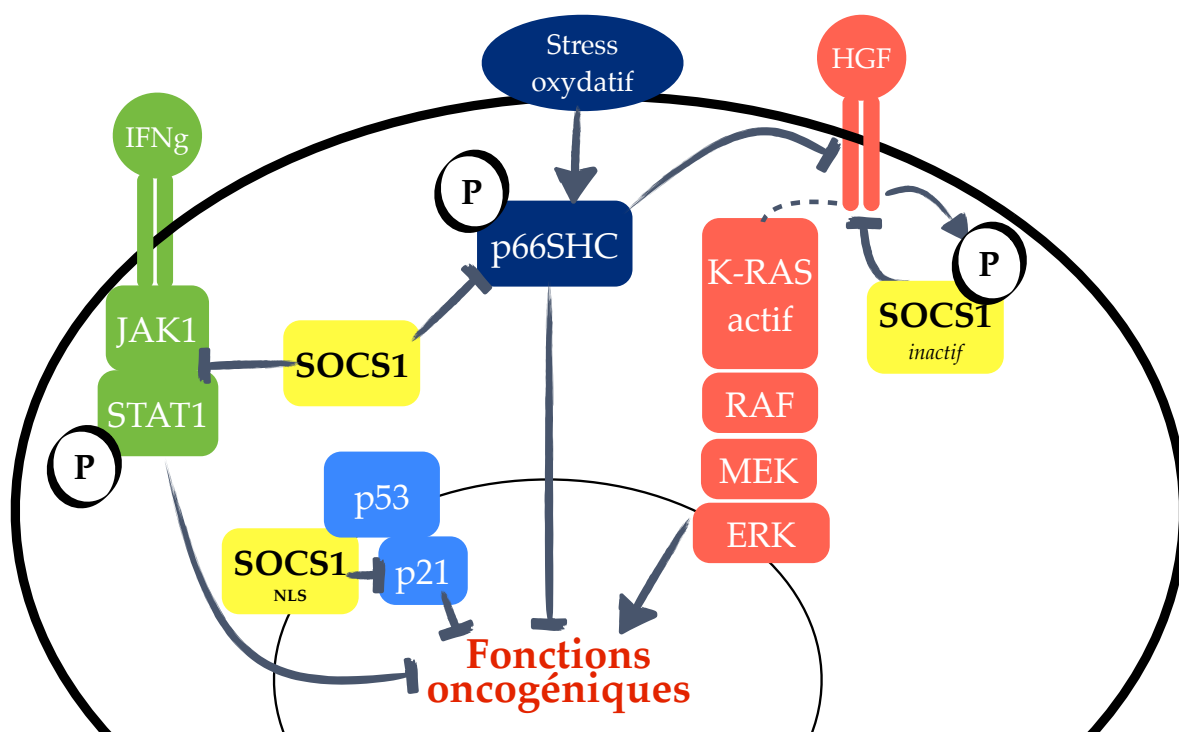


Figure 19. Modèle proposé illustrant l'implication moléculaire de SOCS1 responsable de son action pro-tumoral

5. La double face de SOCS1 dans le CCR

Les multiples évidences biologiques et moléculaires présentées dans ce travail, nous amènent à proposer un rôle pro-tumoral pour SOCS1 dans le CCR. Cependant, notre investigation présente la limite de ne pas prendre en considération le contexte cellulaire. Dès 1889, le chirurgien Stephen Paget en proposant la théorie « The seed and the soil » a pour la première fois émis l'hypothèse que le microenvironnement cellulaire pouvait jouer un rôle dans le processus métastatique (Fidler, 2003). Aujourd'hui, cette idée est devenue une certitude, que ce soit pour les phénomènes métastatiques, mais aussi pour l'émergence même des cancers primaires. Ainsi, le contexte inflammatoire colique, causé par des pathologies tel que la colite ulcéreuse ou la maladie de Crohn, offre des prédispositions majeures quant à l'apparition des CCR (Terzic et al., 2010). La communauté scientifique s'accorde même à distinguer les types de CCR dits « associés à un contexte inflammatoire », des CCR dits « sporadiques » (Terzic et al., 2010). Cette distinction repose sur des différences majeures, qui se trouvent tant au niveau clinique qu'au niveau moléculaire (Brentnall et al., 1994; Grivennikov, 2013; Renz et al., 2013).

Dans la présente étude, nous avons révélé, de manière *in cellulo* et *in vivo*, l'implication oncogénique de SOCS1 dans les lignées CCR CT26/CT36, et ce sans composante inflammatoire. Cette démarche expérimentale nous permet donc de reporter nos observations et conclusions uniquement aux CCR de type sporadique et non aux CCR associés à l'inflammation. Néanmoins, la fonction la mieux caractérisée de SOCS1 reste la régulation négative de la signalisation induite par les cytokines et par conséquent la régulation de l'inflammation. L'effet anti-inflammatoire de SOCS1 est tel que les souris invalidées pour le gène *socs1* ont la caractéristique de présenter une mortalité néonatale des suites d'une inflammation aberrante (Marine et al., 1999). De plus, dans le modèle murin *socs1*^{-/-TG} (décrit au chapitre 2.1), on remarque une apparition de tumeurs coliques accompagnées par une forte inflammation (Hanada et al., 2006). Ces dernières observations sont autant d'évidences solides considérant SOCS1 comme un suppresseur de tumeur dans les CCR associés à un contexte inflammatoire.

En accord avec nos résultats et les données de la littérature, nous proposons que SOCS1 jouerait des fonctions opposées dépendamment du type de CCR. De sorte que dans les CCR de type sporadique, SOCS1 devrait être considéré comme oncogène et son expression comme marqueur de mauvais pronostic ; et dans les CCR reliés aux pathologies inflammatoires, SOCS1 devrait être considéré comme suppresseur de tumeur et son expression comme marqueur de mauvais pronostic.

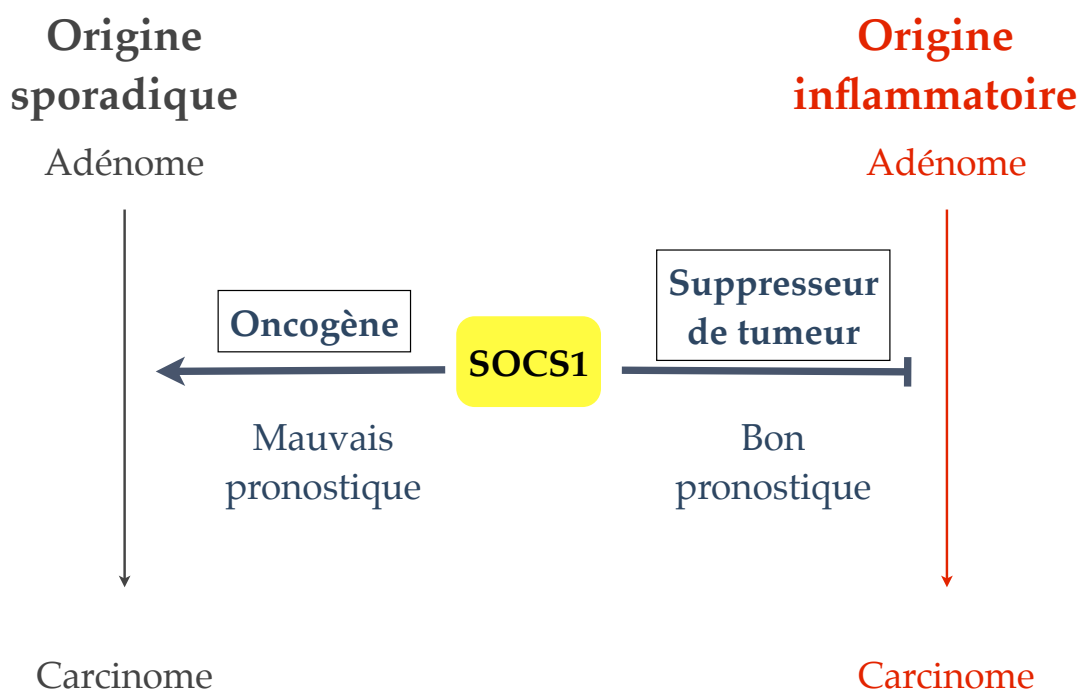


Figure 20. Modèle représentant la double face de SOCS1 dans le CCR

En inhibant l'activité de suppresseurs de tumeur tels que STAT1, p21 ou encore p66Shc, SOCS1 devrait être considéré comme un oncogène dans les CCR sporadiques. En se comportant comme un puissant régulateur de la signalisation des cytokines, SOCS1 agirait en tant que suppresseur de tumeur dans les CCR associés à un contexte inflammatoire.

CONCLUSION

La protéine SOCS1 est régulièrement proposée dans la littérature comme agissant en tant que suppresseur de tumeur dans les cancers. Cependant, dans la carcinogénèse colorectale son implication reste très peu caractérisée. La présente étude avait donc pour vocation de faire la lumière sur l'implication de SOCS1 dans la progression tumorale colorectale.

Pour la première fois, nos résultats suggèrent, au contraire, que **SOCS1 pourrait exercer des fonctions pro-tumorales dans le CCR.**

En effet, la surexpression de SOCS1 a provoqué dans la lignée de CCR CT26 une augmentation de la croissance cellulaire, une hausse de la croissance sans ancrage à la matrice, une résistance à l'anoïkose accrue, ainsi qu'une capacité à former des tumeurs *in vivo* facilitée. À l'inverse, sa diminution dans la lignée CCR CT36 a provoqué une baisse de ces mêmes caractéristiques fonctionnelles associées à la carcinogénèse colorectale.

Nous avons ensuite tenté de comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents à ce rôle pro-tumoral que jouerait SOCS1 dans le CCR.

Nous avons d'abord confirmé que SOCS1 régulait négativement la signalisation JAK1/STAT1 dans notre modèle cellulaire CT26 (**Figure 14**). Cette voie de signalisation étant connue pour avoir une action antiproliférative et pro-apoptotique, sa régulation négative pourrait donc favoriser la progression tumorale colorectale.

Ensuite, nos résultats confirment que SOCS1 conserve son aptitude à inhiber l'expression du récepteur Met dans la lignée CCR CT26 (**Figure 15**). Cependant, cette lignée cellulaire présente une mutation activatrice dans le gène *k-ras*. Se situant en aval des RTK, une activation aberrante de la protéine K-RAS activerait le sentier de signalisation des MAPK indépendamment de l'activation du RTK Met. Nous proposons donc que l'effet suppresseur de tumeur dû à l'inhibition de l'expression de l'oncogène Met par SOCS1, serait masqué par l'activation aberrante de K-RAS, ce qui est d'ailleurs un évènement très fréquent dans l'émergence des CCR de type sporadique.

Les protéines Shc sont des protéines adaptatrices impliquées dans la transduction du signal en aval des RTK, dont le récepteur Met. Récemment, une étude a proposé que les protéines SOCS1 et p66Shc seraient susceptibles d'interagir ensemble (Malette et al., 2010). Nos résultats ont tout d'abord permis de confirmer cette interaction, mais ils ont aussi mis en évidence une inhibition de l'expression de p66Shc par SOCS1 (**Figure 16-17**). Il est connu que P66Shc a la capacité d'induire l'apoptose suite à un stress oxydatif, et à inhiber l'activation de la voie mitogénique des MAPK en aval des RTK ; En conséquence, nous proposons que l'intensification des caractéristiques cancéreuses observées dans les cellules CT26 qui surexpriment SOCS1 pourrait être expliquée par une régulation négative du suppresseur de tumeur p66Shc.

Enfin, nous avons validé l'implication de SOCS1 dans l'activation du suppresseur de tumeur p53 suite à un stress génotoxique dans la lignée CT26, dénoté par une augmentation de son expression et de sa phosphorylation sur sa sérine 15 (**Figure 18**). Paradoxalement, nous observons une baisse de l'expression de la protéine p21, une cible transcriptionnelle de p53. Étant donné la capacité de p21 à provoquer l'arrêt du cycle cellulaire, il est probable que sa régulation négative par SOCS1 pourrait être en partie responsable de l'accroissement des caractéristiques cancéreuses de la lignée CCR CT26.

Au terme de cette étude, nos résultats révèlent un rôle pro-tumoral joué par SOCS1 dans le CCR. En inhibant l'activité de suppresseurs de tumeur tels que STAT1, p21 ou encore p66Shc, nous avons mis en évidence que l'expression de SOCS1 pourrait faciliter le progression tumorale colorectale. Cependant, ce nouvel aspect tumorigénique de SOCS1 dans le CCR que nous présentons ici ne peut s'appliquer exclusivement qu'aux CCR dits sporadiques. En effet, la méthodologie usitée dans ce travail présente la limite de s'affranchir de la composante inflammatoire, laquelle est connue pour jouer un rôle crucial dans l'initiation d'un certain type de CCR. Ces derniers, dits CCR d'origines inflammatoires, présentent de nombreuses évidences qui supportent un rôle suppresseur de tumeur pour SOCS1. En conclusion, en se comportant comme oncogène dans les CCR sporadique, et comme suppresseur de tumeur dans les CCR associé à l'inflammation, nous proposons que la protéine SOCS1 présente une double face dans la tumorigénèse colorectale.

RÉFÉRENCES

- Aaronson, D.S., and C.M. Horvath. 2002. A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science*. 296:1653-1655.
- Alberici, P., and R. Fodde. 2006. The role of the APC tumor suppressor in chromosomal instability. *Genome Dyn*. 1:149-170.
- Alexander, W.S. 2002. Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2:410-416.
- Alexander, W.S., R. Starr, J.E. Fenner, C.L. Scott, E. Handman, N.S. Sprigg, J.E. Corbin, A.L. Cornish, R. Darwiche, C.M. Owczarek, T.W. Kay, N.A. Nicola, P.J. Hertzog, D. Metcalf, and D.J. Hilton. 1999. SOCS1 is a critical inhibitor of interferon gamma signaling and prevents the potentially fatal neonatal actions of this cytokine. *Cell*. 98:597-608.
- Armata, H.L., D.S. Garlick, and H.K. Sluss. 2007. The ataxia telangiectasia-mutated target site Ser18 is required for p53-mediated tumor suppression. *Cancer research*. 67:11696-11703.
- Baetz, A., C. Koelsche, J. Strebovsky, K. Heeg, and A.H. Dalpke. 2008. Identification of a nuclear localization signal in suppressor of cytokine signaling 1. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 22:4296-4305.
- Ben-Zvi, T., A. Yayon, A. Gertler, and E. Monsonogo-Ornan. 2006. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) 1 and SOCS3 interact with and modulate fibroblast growth factor receptor signaling. *J Cell Sci*. 119:380-387. Vive le Quebec libre
- Bernier, Walid Chababi, Véronique Pomerleau, and C. Saucier. 2011. Oncogenic engagement of the Met receptor is sufficient to evoke angiogenic, tumorigenic, and metastatic activities in rat intestinal epithelial cells.
- Birchmeier, C., W. Birchmeier, E. Gherardi, and G.F. Vande Woude. 2003. Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 4:915-925.
- Brattain, M.G., J. Strobel-Stevens, D. Fine, M. Webb, and A.M. Sarrif. 1980. Establishment of mouse colonic carcinoma cell lines with different metastatic properties. *Cancer research*. 40:2142-2146.
- Brentnall, T.A., D.A. Crispin, P.S. Rabinovitch, R.C. Haggitt, C.E. Rubin, A.C. Stevens, and G.C. Burmer. 1994. Mutations in the p53 gene: an early marker of neoplastic progression in ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 107:369-378.
- Buchdunger, E., C.L. Cioffi, N. Law, D. Stover, S. Ohno-Jones, B.J. Druker, and N.B. Lydon. 2000. Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 295:139-145.
- Calabrese, V., F.A. Mallette, X. Deschenes-Simard, S. Ramanathan, J. Gagnon, A. Moores, S. Ilangumaran, and G. Ferbeyre. 2009. SOCS1 links cytokine signaling to p53 and senescence. *Mol Cell*. 36:754-767.
- Chu, P.Y., C.M. Yeh, N.C. Hsu, Y.S. Chang, J.G. Chang, and K.T. Yeh. 2010. Epigenetic alteration of the SOCS1 gene in hepatocellular carcinoma. *Swiss Med Wkly*. 140:w13065.

- Crocker, B.A., H. Kiu, and S.E. Nicholson. 2008. SOCS regulation of the JAK/STAT signalling pathway. *Semin Cell Dev Biol.* 19:414-422.
- Danilkovitch-Miagkova, A., and B. Zbar. 2002. Dysregulation of Met receptor tyrosine kinase activity in invasive tumors. *The Journal of clinical investigation.* 109:863-867.
- De Sepulveda, P., S. Ilangumaran, and R. Rottapel. 2000. Suppressor of cytokine signaling-1 inhibits VAV function through protein degradation. *The Journal of biological chemistry.* 275:14005-14008.
- De Sepulveda, P., K. Okkenhaug, J.L. Rose, R.G. Hawley, P. Dubreuil, and R. Rottapel. 1999. Socs1 binds to multiple signalling proteins and suppresses steel factor-dependent proliferation. *The EMBO journal.* 18:904-915.
- Dean, M., M. Park, and G.F. Vande Woude. 1987. Characterization of the rearranged tpr-met oncogene breakpoint. *Molecular and cellular biology.* 7:921-924.
- Dey, B.R., S.L. Spence, P. Nissley, and R.W. Furlanetto. 1998. Interaction of human suppressor of cytokine signaling (SOCS)-2 with the insulin-like growth factor-I receptor. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY.* 273:24095-24101.
- el-Deiry, W.S., B.D. Nelkin, P. Celano, R.W. Yen, J.P. Falco, S.R. Hamilton, and S.B. Baylin. 1991. High expression of the DNA methyltransferase gene characterizes human neoplastic cells and progression stages of colon cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 88:3470-3474.
- Endo TA, M.M., Yokouchi M, Suzuki R, Sakamoto H, Mit- sui K, Matsumoto A, Tanimura S, Ohtsubo M, Misawa H, Mi- yazaki T, Leonor N, Taniguchi T, Fujita T, Kanekura Y, Komiya S, Yoshimura A. 1997. A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature.* 387: 921-4.
- Esposito, I., J. Kleeff, S.C. Bischoff, L. Fischer, P. Collecchi, M. Iorio, G. Bevilacqua, M.W. Buchler, and H. Friess. 2002. The stem cell factor-c-kit system and mast cells in human pancreatic cancer. *Lab Invest.* 82:1481-1492.
- Esteller, M., P.G. Corn, S.B. Baylin, and J.G. Herman. 2001. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer research.* 61:3225-3229.
- Fearon, E.R. 2011. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu Rev Pathol.* 6:479-507.
- Fidler, I.J. 2003. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer.* 3:453-458.
- Fixman, E.D., M.A. Naujokas, G.A. Rodrigues, M.F. Moran, and M. Park. 1995. Efficient cell transformation by the Tpr-Met oncoprotein is dependent upon tyrosine 489 in the carboxy-terminus. *Oncogene.* 10:237-249.
- Frangioni, J.V., and B.G. Neel. 1993. Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins. *Anal Biochem.* 210:179-187.
- Frantsve, J., J. Schwaller, D.W. Sternberg, J. Kutok, and D.G. Gilliland. 2001. Socs-1 inhibits TEL-JAK2-mediated transformation of hematopoietic cells through inhibition of JAK2 kinase activity and induction of proteasome-mediated degradation. *Molecular and cellular biology.* 21:3547-3557.
- Fujimoto, M., and T. Naka. 2010. SOCS1, a Negative Regulator of Cytokine Signals and TLR Responses, in Human Liver Diseases. *Gastroenterology research and practice.* 2010.
- Fujita, S., and K. Sugano. 1997. Expression of c-met proto-oncogene in primary colorectal cancer and liver metastases. *Jpn J Clin Oncol.* 27:378-383.

- Fujitake, S., K. Hibi, O. Okochi, Y. Kodera, K. Ito, S. Akiyama, and A. Nakao. 2004. Aberrant methylation of SOCS-1 was observed in younger colorectal cancer patients. *Journal of gastroenterology*. 39:120-124.
- Galimov, E.R. 2010. The Role of p66shc in Oxidative Stress and Apoptosis. *Acta Naturae*. 2:44-51.
- Galm, O., H. Yoshikawa, M. Esteller, R. Osieka, and J.G. Herman. 2003. SOCS-1, a negative regulator of cytokine signaling, is frequently silenced by methylation in multiple myeloma. *Blood*. 101:2784-2788.
- Gao, W., X. Bing, M. Li, Z. Yang, Y. Li, and H. Chen. 2013. Study of critical role of c-Met and its inhibitor SU11274 in colorectal carcinoma. *Med Oncol*. 30:546.
- Grivennikov, S.I. 2013. Inflammation and colorectal cancer: colitis-associated neoplasia. *Semin Immunopathol*. 35:229-244.
- Gui, Y., M. Yeganeh, S. Ramanathan, C. Leblanc, V. Pomerleau, G. Ferbeyre, C. Saucier, and S. Ilangumaran. 2011. SOCS1 controls liver regeneration by regulating HGF signaling in hepatocytes. *J Hepatol*. 55:1300-1308.
- Hanada, T., T. Kobayashi, T. Chinen, K. Saeki, H. Takaki, K. Koga, Y. Minoda, T. Sanada, T. Yoshioka, H. Mimata, S. Kato, and A. Yoshimura. 2006. IFN γ -dependent, spontaneous development of colorectal carcinomas in SOCS1-deficient mice. *The Journal of experimental medicine*. 203:1391-1397.
- Hanada, T., and A. Yoshimura. 2002. Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev*. 13:413-421.
- Hassan, H.T. 2009. c-Kit expression in human normal and malignant stem cells prognostic and therapeutic implications. *Leukemia research*. 33:5-10.
- Hassan, H.T., and M. Freund. 1995. Human stem cell factor protects CD34 positive human myeloid leukaemia cells from chemotherapy-induced apoptosis. *European journal of cancer*. 31A:1883-1884.
- Heideman, D.A., P.J. Snijders, E. Bloemena, C.J. Meijer, G.J. Offerhaus, S.G. Meuwissen, W.R. Gerritsen, and M.E. Craanen. 2001. Absence of tpr-met and expression of c-met in human gastric mucosa and carcinoma. *J Pathol*. 194:428-435.
- Herman, J.G., and S.B. Baylin. 2003. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*. 349:2042-2054.
- Hiscox, S.E., M.B. Hallett, M.C. Puntis, T. Nakamura, and W.G. Jiang. 1997. Expression of the HGF/SF receptor, c-met, and its ligand in human colorectal cancers. *Cancer Invest*. 15:513-521.
- Hodis, E., I.R. Watson, G.V. Kryukov, S.T. Arold, M. Imielinski, J.P. Theurillat, E. Nickerson, D. Auclair, L. Li, C. Place, D. Dicara, A.H. Ramos, M.S. Lawrence, K. Cibulskis, A. Sivachenko, D. Voet, G. Saksena, N. Stransky, R.C. Onofrio, W. Winckler, K. Ardlie, N. Wagle, J. Wargo, K. Chong, D.L. Morton, K. Stemke-Hale, G. Chen, M. Noble, M. Meyerson, J.E. Ladbury, M.A. Davies, J.E. Gershenwald, S.N. Wagner, D.S. Hoon, D. Schadendorf, E.S. Lander, S.B. Gabriel, G. Getz, L.A. Garraway, and L. Chin. 2012. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell*. 150:251-263.
- Horii, M.S.Y.M.A.S.S.F.A. 1998. The H-cadherin (CDH13) gene is inactivated in human lung cancer. *Hum Genet*.
- Huang, F.J., P.S. Steeg, J.E. Price, W.T. Chiu, P.C. Chou, K. Xie, R. Sawaya, and S. Huang. 2008. Molecular basis for the critical role of suppressor of cytokine signaling-1 in melanoma brain metastasis. *Cancer Res*. 68:9634-9642.

- Kamizono, S., T. Hanada, H. Yasukawa, S. Minoguchi, R. Kato, M. Minoguchi, K. Hattori, S. Hatakeyama, M. Yada, S. Morita, T. Kitamura, H. Kato, K. Nakayama, and A. Yoshimura. 2001. The SOCS box of SOCS-1 accelerates ubiquitin-dependent proteolysis of TEL-JAK2. *The Journal of biological chemistry*. 276:12530-12538.
- Kawano, H., M. Nishikawa, M. Mitsui, Y. Takahashi, K. Kako, K. Yamaoka, Y. Watanabe, and Y. Takakura. 2007. Improved anti-cancer effect of interferon gene transfer by sustained expression using CpG-reduced plasmid DNA. *International journal of cancer. Journal international du cancer*. 121:401-406.
- Kile, B.T., and W.S. Alexander. 2001. The suppressors of cytokine signalling (SOCS). *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 58:1627-1635.
- Koelsche, C., J. Strebovsky, A. Baetz, and A.H. Dalpke. 2009. Structural and functional analysis of a nuclear localization signal in SOCS1. *Molecular immunology*. 46:2474-2480.
- Komazaki, T., H. Nagai, M. Emi, Y. Terada, A. Yabe, E. Jin, O. Kawanami, N. Konishi, Y. Moriyama, T. Naka, and T. Kishimoto. 2004. Hypermethylation-associated inactivation of the SOCS-1 gene, a JAK/STAT inhibitor, in human pancreatic cancers. *Jpn J Clin Oncol*. 34:191-194.
- Krebs, D.L., and D.J. Hilton. 2001. SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem Cells*. 19:378-387.
- Kubota, T., H. Fujiwara, H. Amaike, K. Takashima, S. Inada, K. Atsuji, M. Yoshimura, K. Matsumoto, T. Nakamura, and H. Yamagishi. 2004. Reduced HGF expression in subcutaneous CT26 tumor genetically modified to secrete NK4 and its possible relation with antitumor effects. *Cancer science*. 95:321-327.
- Lacave, R., C.-J. Larsen, and J. Robert. 2005. Cancérologie fondamentale. *John Libbey Eurotext*.
- Laurent, A., C. Nicco, C. Chereau, C. Goulvestre, J. Alexandre, A. Alves, E. Levy, F. Goldwasser, Y. Panis, O. Soubrane, B. Weill, and F. Batteux. 2005. Controlling tumor growth by modulating endogenous production of reactive oxygen species. *Cancer research*. 65:948-956.
- Lee, T.-B., S.-C. Lim, Y.-S. Moon, and C.-H. Choi. 2013. Melanoma antigen gene family A as a molecular marker of gastric and colorectal cancers. *Oncology Reports*.
- Lemmon, M.A., and J. Schlessinger. 2010. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 141:1117-1134.
- Li, Z., D. Metze, D. Nashan, C. Muller-Tidow, H.L. Serve, C. Poremba, T.A. Luger, and M. Bohm. 2004. Expression of SOCS-1, suppressor of cytokine signalling-1, in human melanoma. *The Journal of investigative dermatology*. 123:737-745.
- Ling Xia, L.W., Alicia S. Chung, Stanimir S. Ivanov, Mike Y. Ling, Ana M. Dragoi, Adam Platt, Tona M. Gilmer, Xin-Yuan Fu, and Y. Eugene Chin. 2002. Identification of Both Positive and Negative Domains within the Epidermal Growth Factor Receptor COOH-terminal Region for Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) Activation. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*.
- Liu, C., M. Park, and M.S. Tsao. 1992. Overexpression of c-met proto-oncogene but not epidermal growth factor receptor or c-erbB-2 in primary human colorectal carcinomas. *Oncogene*. 7:181-185.
- Lowe, S.W., E. Cepero, and G. Evan. 2004. Intrinsic tumour suppression. *Nature*. 432:307-315.

- Mallette, F.A., V. Calabrese, S. Ilangumaran, and G. Ferbeyre. 2010. SOCS1, a novel interaction partner of p53 controlling oncogene-induced senescence. *Aging (Albany NY)*. 2:445-452.
- Marine, J.C., D.J. Topham, C. McKay, D. Wang, E. Parganas, D. Stravopodis, A. Yoshimura, and J.N. Ihle. 1999. SOCS1 deficiency causes a lymphocyte-dependent perinatal lethality. *Cell*. 98:609-616.
- Matsumura, A., T. Kubota, H. Taiyoh, H. Fujiwara, K. Okamoto, D. Ichikawa, A. Shiozaki, S. Komatsu, M. Nakanishi, Y. Kuriu, Y. Murayama, H. Ikoma, T. Ochiai, Y. Kokuba, T. Nakamura, K. Matsumoto, and E. Otsuji. 2013. HGF regulates VEGF expression via the c-Met receptor downstream pathways, PI3K/Akt, MAPK and STAT3, in CT26 murine cells. *International journal of oncology*. 42:535-542.
- Meek, D.W., and C.W. Anderson. 2009. Posttranslational modification of p53: cooperative integrators of function. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 1:a000950.
- Migliaccio, E., M. Giorgio, S. Mele, G. Pelicci, P. Reboldi, P.P. Pandolfi, L. Lanfrancone, and P.G. Pelicci. 1999. The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals. *Nature*. 402:309-313.
- Migliaccio, E., S. Mele, A.E. Salcini, G. Pelicci, K.M. Lai, G. Superti-Furga, T. Pawson, P.P. Di Fiore, L. Lanfrancone, and P.G. Pelicci. 1997. Opposite effects of the p52shc/p46shc and p66shc splicing isoforms on the EGF receptor-MAP kinase-*fos* signalling pathway. *The EMBO journal*. 16:706-716.
- Naka, T., M. Narazaki, M. Hirata, T. Matsumoto, S. Minamoto, A. Aono, N. Nishimoto, T. Kajita, T. Taga, K. Yoshizaki, S. Akira, and T. Kishimoto. 1997. Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature*. 387:924-929.
- Narazaki, M., M. Fujimoto, T. Matsumoto, Y. Morita, H. Saito, T. Kajita, K. Yoshizaki, T. Naka, and T. Kishimoto. 1998. Three distinct domains of SSI-1/SOCS-1/JAB protein are required for its suppression of interleukin 6 signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95:13130-13134.
- Neuwirt, H., M. Pühr, F.R. Santer, M. Susani, W. Doppler, G. Marcias, V. Rauch, M. Brugger, A. Hobisch, L. Kenner, and Z. Culig. 2009. Suppressor of cytokine signaling (SOCS)-1 is expressed in human prostate cancer and exerts growth-inhibitory function through down-regulation of cyclins and cyclin-dependent kinases. *Am J Pathol*. 174:1921-1930.
- Ohya, K., S. Kajigaya, Y. Yamashita, A. Miyazato, K. Hatake, Y. Miura, U. Ikeda, K. Shimada, K. Ozawa, and H. Mano. 1997. SOCS-1/JAB/SSI-1 can bind to and suppress Tec protein-tyrosine kinase. *The Journal of biological chemistry*. 272:27178-27182.
- Pawson, T. 1995. Protein modules and signalling networks. *Nature*. 373:573-580.
- Pensa, S., G. Regis, D. Boselli, F. Novelli, and V. Poli. 2009. STAT1 and STAT3 in Tumorigenesis: Two Sides of the Same Coin?
- Peschard, P., and M. Park. 2007. From Tpr-Met to Met, tumorigenesis and tubes. *Oncogene*. 26:1276-1285.
- Qing, Y., A.P. Costa-Pereira, D. Watling, and G.R. Stark. 2005. Role of tyrosine 441 of interferon-gamma receptor subunit 1 in SOCS-1-mediated attenuation of STAT1 activation. *The Journal of biological chemistry*. 280:1849-1853.
- Qiu, X., G. Guo, K. Chen, M. Kashiwada, B.J. Druker, P.B. Rothman, and J.L. Chen. 2012. A requirement for SOCS-1 and SOCS-3 phosphorylation in Bcr-Abl-induced tumorigenesis. *Neoplasia*. 14:547-558.

- Raccurt, M., S.P. Tam, P. Lau, H.C. Mertani, A. Lambert, T. Garcia-Caballero, H. Li, R.J. Brown, M.A. McGuckin, G. Morel, and M.J. Waters. 2003. Suppressor of cytokine signalling gene expression is elevated in breast carcinoma. *Br J Cancer*. 89:524-532.
- Renz, B.W., W.E. Thasler, G. Preissler, T. Heide, P.N. Khalil, M. Mikhailov, K.W. Jauch, M.E. Kreis, M. Rentsch, and A. Kleespies. 2013. Clinical outcome of IBD-associated versus sporadic colorectal cancer: a matched-pair analysis. *J Gastrointest Surg*. 17:981-990.
- Reverte, C.G., M.D. Ahearn, and L.E. Hake. 2001. CPEB degradation during *Xenopus* oocyte maturation requires a PEST domain and the 26S proteasome. *Dev Biol*. 231:447-458.
- Rogers, S., R. Wells, and M. Rechsteiner. 1986. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science*. 234:364-368.
- Rottapel, R., S. Ilangumaran, C. Neale, J. La Rose, J.M. Ho, M.H. Nguyen, D. Barber, P. Dubreuil, and P. de Sepulveda. 2002. The tumor suppressor activity of SOCS-1. *Oncogene*. 21:4351-4362.
- Saito, H., Y. Morita, M. Fujimoto, M. Narazaki, T. Naka, and T. Kishimoto. 2000. IFN regulatory factor-1-mediated transcriptional activation of mouse STAT-induced STAT inhibitor-1 gene promoter by IFN-gamma. *Journal of immunology*. 164:5833-5843.
- Sakamoto, H., H. Yasukawa, M. Masuhara, S. Tanimura, A. Sasaki, K. Yuge, M. Ohtsubo, A. Ohtsuka, T. Fujita, T. Ohta, Y. Furukawa, S. Iwase, H. Yamada, and A. Yoshimura. 1998. A Janus kinase inhibitor, JAB, is an interferon-gamma-inducible gene and confers resistance to interferons. *Blood*. 92:1668-1676.
- Sammarco, I., G. Capurso, L. Coppola, A.P. Bonifazi, S. Cassetta, G. Delle Fave, A. Carrara, G.B. Grassi, P. Rossi, C. Sette, and R. Geremia. 2004. Expression of the proto-oncogene c-KIT in normal and tumor tissues from colorectal carcinoma patients. *Int J Colorectal Dis*. 19:545-553.
- Sasaki, A., H. Yasukawa, A. Suzuki, S. Kamizono, T. Syoda, I. Kinjyo, M. Sasaki, J.A. Johnston, and A. Yoshimura. 1999. Cytokine-inducible SH2 protein-3 (CIS3/SOCS3) inhibits Janus tyrosine kinase by binding through the N-terminal kinase inhibitory region as well as SH2 domain. *Genes Cells*. 4:339-351.
- Sasi, W., W.G. Jiang, A. Sharma, and K. Mokbel. 2010. Higher expression levels of SOCS 1,3,4,7 are associated with earlier tumour stage and better clinical outcome in human breast cancer. *BMC Cancer*. 10:178.
- Schwaller, J., J. Frantsve, J. Aster, I.R. Williams, M.H. Tomasson, T.S. Ross, P. Peeters, L. Van Rompaey, R.A. Van Etten, R. Ilaria, Jr., P. Marynen, and D.G. Gilliland. 1998. Transformation of hematopoietic cell lines to growth-factor independence and induction of a fatal myelo- and lymphoproliferative disease in mice by retrovirally transduced TEL/JAK2 fusion genes. *The EMBO journal*. 17:5321-5333.
- Scutti, J.A., A.L. Matsuo, F.V. Pereira, M.H. Massaoka, C.R. Figueiredo, D.F. Moreira, J.E. Belizario, and L.R. Travassos. 2011. Role of SOCS-1 Gene on Melanoma Cell Growth and Tumor Development. *Transl Oncol*. 4:101-109.
- Sekido, Y., T. Takahashi, R. Ueda, M. Takahashi, H. Suzuki, K. Nishida, T. Tsukamoto, T. Hida, K. Shimokata, K.M. Zsebo, and et al. 1993. Recombinant human stem cell factor mediates chemotaxis of small-cell lung cancer cell lines aberrantly expressing the c-kit protooncogene. *Cancer research*. 53:1709-1714.

- Shuai, K., J. Liao, and M.M. Song. 1996. Enhancement of antiproliferative activity of gamma interferon by the specific inhibition of tyrosine dephosphorylation of Stat1. *Molecular and cellular biology*. 16:4932-4941.
- Shumway, S.D., M. Maki, and S. Miyamoto. 1999. The PEST domain of IkappaBalpha is necessary and sufficient for in vitro degradation by mu-calpain. *The Journal of biological chemistry*. 274:30874-30881.
- Soman, N.R., P. Correa, B.A. Ruiz, and G.N. Wogan. 1991. The TPR-MET oncogenic rearrangement is present and expressed in human gastric carcinoma and precursor lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88:4892-4896.
- Song, M.M., and K. Shuai. 1998. The suppressor of cytokine signaling (SOCS) 1 and SOCS3 but not SOCS2 proteins inhibit interferon-mediated antiviral and antiproliferative activities. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 273:35056-35062.
- Soreide, K., E.A. Janssen, H. Soiland, H. Korner, and J.P. Baak. 2006. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Br J Surg*. 93:395-406.
- Starr, R., T.A. Willson, E.M. Viney, L.J. Murray, J.R. Rayner, B.J. Jenkins, T.J. Gonda, W.S. Alexander, D. Metcalf, N.A. Nicola, and D.J. Hilton. 1997. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature*. 387:917-921.
- Starska, K., E. Forma, I. Lewy-Trenda, O. Stasikowska, M. Brys, W.M. Krajewska, and M. Lukomski. 2009. The expression of SOCS1 and TLR4-NFkappaB pathway molecules in neoplastic cells as potential biomarker for the aggressive tumor phenotype in laryngeal carcinoma. *Folia Histochem Cytobiol*. 47:401-410.
- Takeuchi, H., A. Bilchik, S. Saha, R. Turner, D. Wiese, M. Tanaka, C. Kuo, H.J. Wang, and D.S. Hoon. 2003. c-MET expression level in primary colon cancer: a predictor of tumor invasion and lymph node metastases. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 9:1480-1488.
- Terzic, J., S. Grivennikov, E. Karin, and M. Karin. 2010. Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology*. 138:2101-2114 e2105.
- Trinei, M., M. Giorgio, A. Cicalese, S. Barozzi, A. Ventura, E. Migliaccio, E. Milia, I.M. Padura, V.A. Raker, M. Maccarana, V. Petronilli, S. Minucci, P. Bernardi, L. Lanfrancone, and P.G. Pelicci. 2002. A p53-p66Shc signalling pathway controls intracellular redox status, levels of oxidation-damaged DNA and oxidative stress-induced apoptosis. *Oncogene*. 21:3872-3878.
- Valster, A., N.L. Tran, M. Nakada, M.E. Berens, A.Y. Chan, and M. Symons. 2005. Cell migration and invasion assays. *Methods*. 37:208-215.
- Watanabe, D., S. Ezoe, M. Fujimoto, A. Kimura, Y. Saito, H. Nagai, I. Tachibana, I. Matsumura, T. Tanaka, H. Kanegane, T. Miyawaki, M. Emi, Y. Kanakura, I. Kawase, T. Naka, and T. Kishimoto. 2004. Suppressor of cytokine signalling-1 gene silencing in acute myeloid leukaemia and human haematopoietic cell lines. *British journal of haematology*. 126:726-735.
- Weisenberger, D.J., K.D. Siegmund, M. Campan, J. Young, T.I. Long, M.A. Faasse, G.H. Kang, M. Widschwendter, D. Weener, D. Buchanan, H. Koh, L. Simms, M. Barker, B. Leggett, J. Levine, M. Kim, A.J. French, S.N. Thibodeau, J. Jass, R. Haile, and P.W. Laird. 2006. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nature genetics*. 38:787-793.

- Winder, T., and H.J. Lenz. 2010. Molecular predictive and prognostic markers in colon cancer. *Cancer Treat Rev.* 36:550-556.
- Worthley, D.L., V.L. Whitehall, R.L. Buttenshaw, N. Irahara, S.A. Greco, I. Ramsnes, K.A. Mallitt, R.K. Le Leu, J. Winter, Y. Hu, S. Ogino, G.P. Young, and B.A. Leggett. 2010. DNA methylation within the normal colorectal mucosa is associated with pathway-specific predisposition to cancer. *Oncogene.* 29:1653-1662.
- Wu, J., J.P. Issa, J. Herman, D.E. Bassett, Jr., B.D. Nelkin, and S.B. Baylin. 1993. Expression of an exogenous eukaryotic DNA methyltransferase gene induces transformation of NIH 3T3 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 90:8891-8895.
- Yasukawa, H., H. Misawa, H. Sakamoto, M. Masuhara, A. Sasaki, T. Wakioka, S. Ohtsuka, T. Imaizumi, T. Matsuda, J.N. Ihle, and A. Yoshimura. 1999. The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *The EMBO journal.* 18:1309-1320.
- Yoshimura, A. 2009. Regulation of cytokine signaling by the SOCS and Spred family proteins. *Keio J Med.* 58:73-83.
- Yoshimura, A., T. Ohkubo, T. Kiguchi, N.A. Jenkins, D.J. Gilbert, N.G. Copeland, T. Hara, and A. Miyajima. 1995. A novel cytokine-inducible gene CIS encodes an SH2-containing protein that binds to tyrosine-phosphorylated interleukin 3 and erythropoietin receptors. *The EMBO journal.* 14:2816-2826.
- Zhang, B., S.K. Halder, S. Zhang, and P.K. Datta. 2009. Targeting transforming growth factor-beta signaling in liver metastasis of colon cancer. *Cancer letters.* 277:114-120.
- Zhang, J., H. Li, J.P. Yu, S.E. Wang, and X.B. Ren. 2012. Role of SOCS1 in tumor progression and therapeutic application. *Int J Cancer.* 130:1971-1980.
- Zhang, J.G., A. Farley, S.E. Nicholson, T.A. Willson, L.M. Zugaro, R.J. Simpson, R.L. Moritz, D. Cary, R. Richardson, G. Hausmann, B.J. Kile, S.B. Kent, W.S. Alexander, D. Metcalf, D.J. Hilton, N.A. Nicola, and M. Baca. 1999. The conserved SOCS box motif in suppressors of cytokine signaling binds to elongins B and C and may couple bound proteins to proteasomal degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 96:2071-2076.

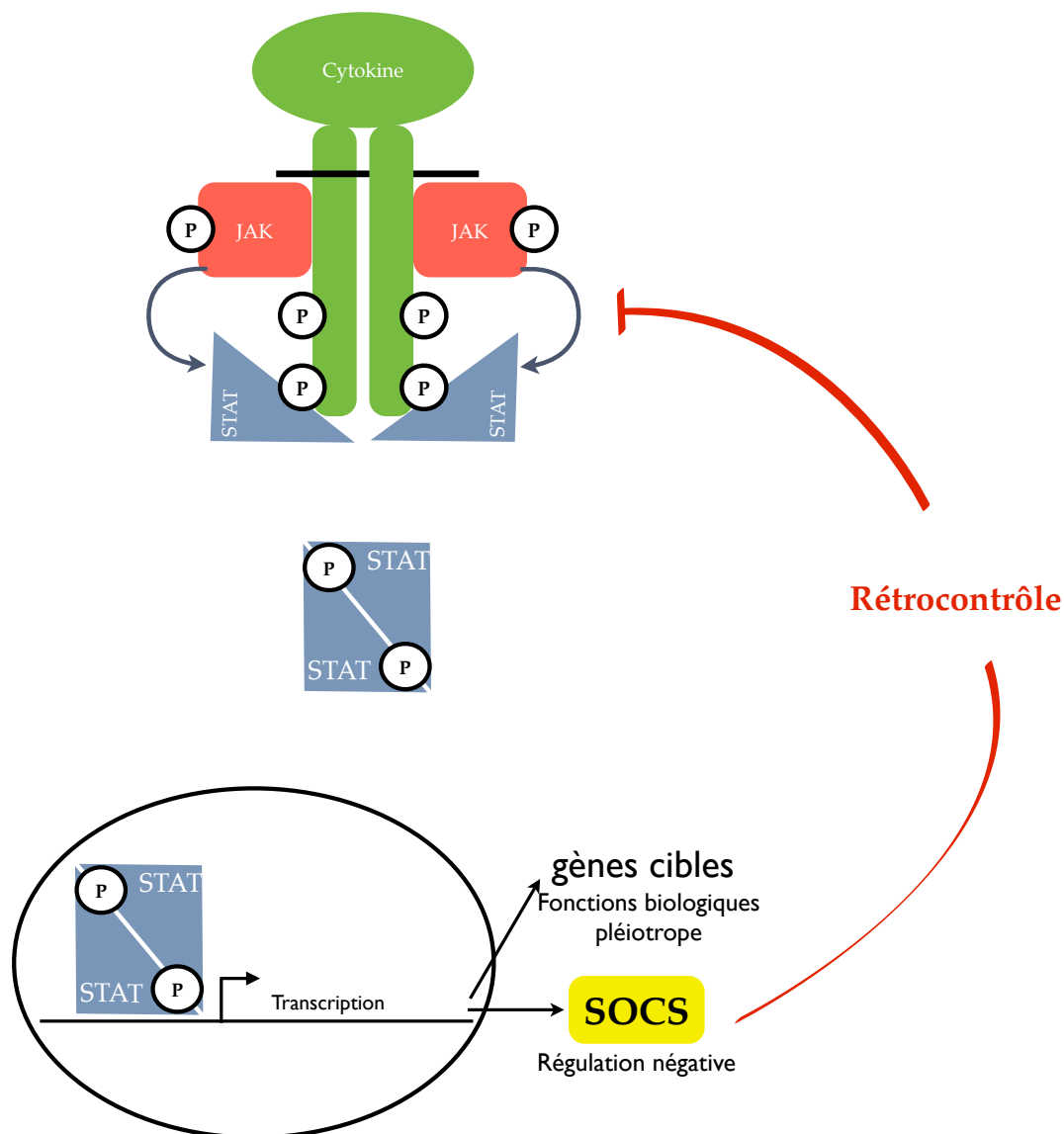


Figure 2. Signalisation JAK/STAT et son rétrocontrôle par les protéines SOCS

Suite à la fixation d'une cytokine à son récepteur spécifique, les kinases JAK vont s'activer et favoriser le recrutement des facteurs STAT. Ces derniers vont, à leurs tours, s'activer, et induire la transcription de nombreux gènes cibles. Parmi eux, les gènes *socs* sont impliqués dans une boucle de rétrocontrôle visant à réguler négativement la signalisation JAK/STAT.

interaction pTyr-indépendante avec la protéine VAV (De Sepulveda et al., 2000). Par ailleurs, le domaine ESS pour « Extended SH2 Subdomain) » a été décrit pour être nécessaire à la complète fonctionnalité du domaine SH2 (Sasaki et al., 1999).

Une **séquence NLS (Nuclear Localization Signal)** a récemment été identifiée dans la protéine SOCS1, ce qui permet sa translocation nucléaire (Baetz et al., 2008). Sa localisation intracellulaire, nucléaire ou cytoplasmique, jouerait un rôle crucial dans la fonctionnalité de SOCS1 (Koelsche et al., 2009).

Un **domaine SOCS box**, de 40 acides aminés dans la partie C-terminale de SOCS1, permet le recrutement des protéines élongines B et C, ce qui forme un complexe protéique de type ubiquitine (Ub) ligase E3 (Zhang et al., 1999). Ce dernier est connu pour induire l'ubiquitination ainsi que la dégradation protéasomale subséquente des protéines cibles auxquelles il se fixe (Kile and Alexander, 2001). La kinase JAK2, a été la première cible de SOCS1 à avoir été décrite (Frantsve et al., 2001).



Figure 3. Structure protéique de la protéine SOCS1

Domaines protéiques principaux composant la protéine SOCS1. Un domaine PEST impliqué dans les processus protéolytiques. Deux motifs di-prolines, de classe1 et de classe2 caractérisés pour permettre les interactions avec les domaines protéiques SH3. Un domaine KIR pour l'inhibition de l'activité kinasique des JAK. Un domaine SH2 permettant les interactions protéine-protéine avec des tyrosines phosphorylés. Une séquence NLS permettant la translocation nucléaire de SOCS1. Enfin un domaine SocsBOX permettant une activité Ub-ligase.

pTyr441 du récepteur à l'interféron gamma 1 (IFNGR) (Qing et al., 2005). Cette interaction empêche le recrutement des facteurs de transcription STAT au récepteur et donc leurs activations. On parle d'inhibition de la transduction du signal par compétition. Enfin le domaine SOCS box, de par sa capacité à recruter un complexe protéique E3-Ub ligase, va promouvoir l'ubiquitination ainsi que la dégradation protéasomale de la kinase JAK (Kamizono et al., 2001).

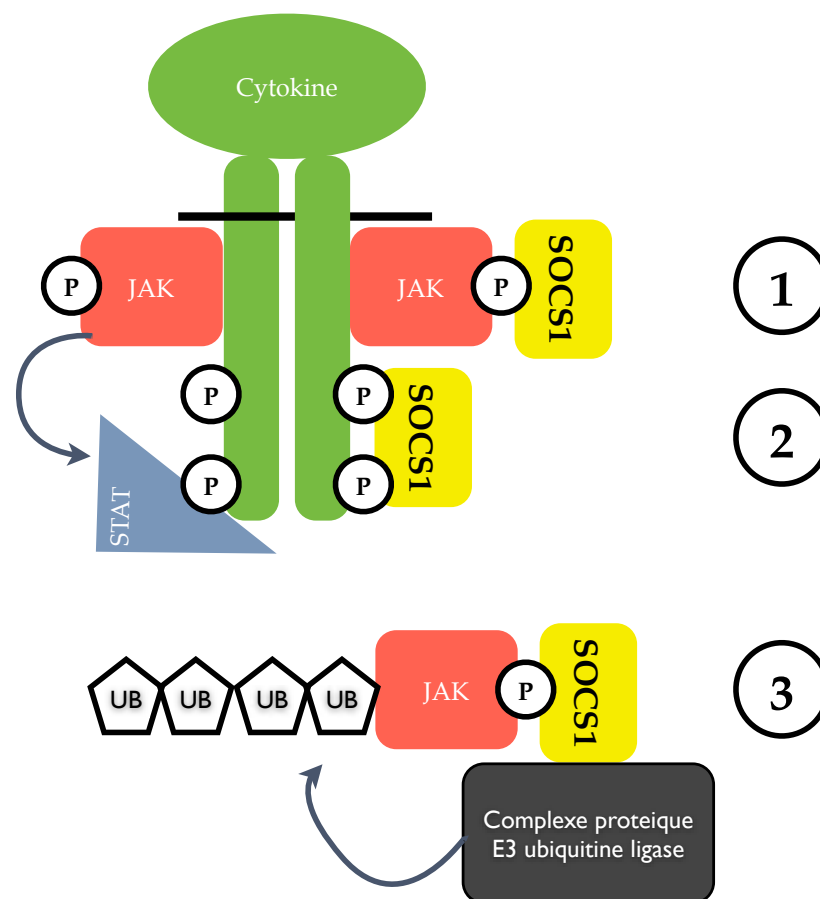


Figure 4. Mécanismes de l'inhibition de la signalisation JAK/STAT par SOCS1

① SOCS1 interagit directement avec la kinase JAK et agit en tant que pseudo-substrat. ② SOCS1 peut lier les résidus tyrosines phosphorylés du récepteur et ainsi compétitionner avec les facteurs STAT pour accéder au récepteur. ③ Grâce au recrutement d'un complexe Ub-ligase E3, SOCS1 promeut l'ubiquitination, ainsi que la dégradation protéasomale de la kinase JAK.

d'activation du suppresseur de tumeur p53 par SOCS1 dans un contexte où STAT5 est activé constitutivement. En reliant la signalisation JAK/STAT, à celle de p53, SOCS1 permettrait à la cellule de se prémunir d'une activation aberrante des cytokines en promouvant la sénescence. Le mécanisme moléculaire proposé est que SOCS1 peut interagir directement avec p53 via son domaine SH2 et avec les sérine/thréonine kinases ATM et ATR via son domaine SOCS Box (Figure 5). L'ATM/ATR engendre la phosphorylation de p53 sur sa sérine 15, ce qui est considérée comme un événement majeur dans sa stabilisation et son activation (Meek and Anderson, 2009). Ces données supportent donc un modèle dans lequel SOCS1 formerait un complexe protéique avec p53 et l'ATM/ATR, ce qui favoriserait l'activité transcriptionnelle de p53 aboutissant à la sénescence. Le complexe protéique formé par p53 et l'ATM/ATR étant nucléaire, SOCS1 transloquerait au noyau grâce à sa séquence NLS, et favoriserait la rencontre entre p53 et l'ATM/ATR au noyau.

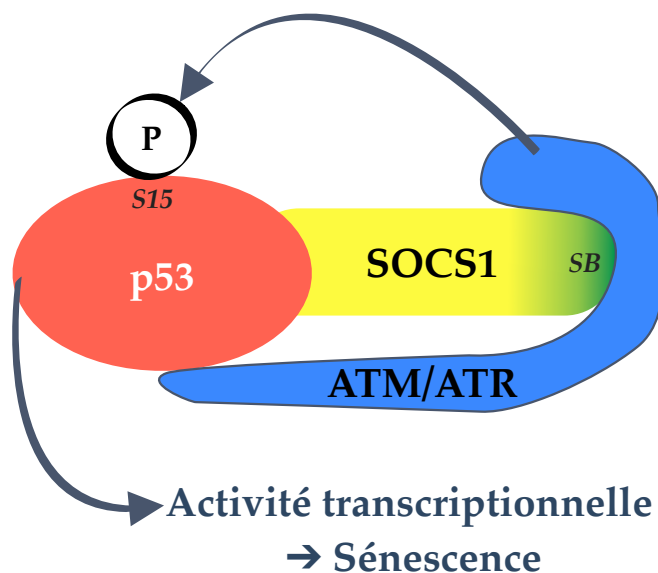


Figure 5. Complexe protéique nucléaire composé de SOCS1, l'ATM/ATR et p53

Ce complexe protéique a pour conséquence l'activation de p53 via sa phosphorylation sur sa sérine 15, ce qui favorise son activité transcriptionnelle aboutissant à la sénescence (Calabrese et al., 2009).

ou GRB2 ainsi que la protéine dite d'échafaudage de plus haut poids moléculaire GAB1. Bien que ne possédant pas d'activité enzymatique, ces protéines favorisent les interactions protéines/protéines et contribuent à l'assemblage de complexes protéiques en aval d'un RTK actif. Ces complexes ont pour vocation l'amplification et l'intégration des signaux intracellulaires tels que, dans le cas du RTK Met, la voie mitogénique des MAPK et la voie de survie PI3K/Akt (**Figure 6**) (Lemmon and Schlessinger, 2010).

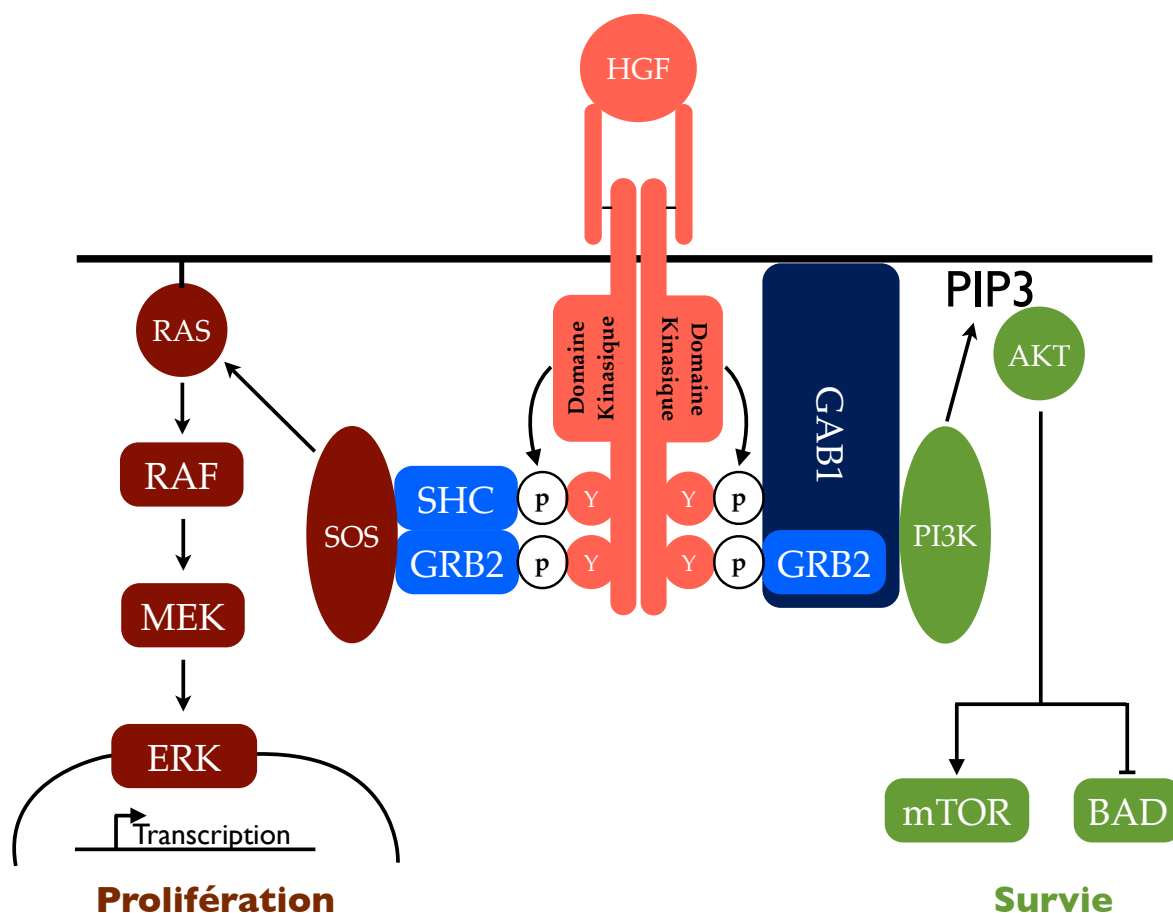


Figure 6. Principales voies de signalisations induites par le récepteur Met suite à son activation par son ligand HGF

Complexe protéique recruté au récepteur Met actif, qui engage un réseau de signalisation qui régule des fonctions biologiques tels que la prolifération, la mobilité ou encore la survie cellulaire.

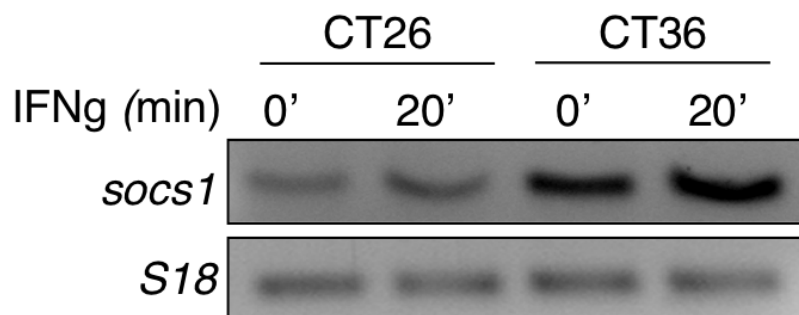


Figure 7. Expression différentielle de l'ARNm endogène de *SOCS1* dans le modèle cellulaire CCR CT26/CT36.

PCR semi-quantitative évaluant l'expression en ARNm de *socs1* et du gène de référence *S18* dans les cellules CT26 et CT36 en condition basale ou suite à une stimulation de 20 minutes à l'IFN γ à une concentration de 20 ng/ml.

1.2 Validation de la modulation de l'expression de SOCS1 dans le modèle cellulaire CT26/CT36

Cette expression différentielle en ARNm de SOCS1 dans le modèle cellulaire CT26/CT36, est en accord avec notre hypothèse qui propose un rôle de suppresseur de tumeur pour SOCS1 dans le CCR. En effet, les CT26, qui présentent des caractéristiques de cellules cancéreuses très agressives, expriment moins le transcrite de SOCS1 en comparaison avec les CT36, cellules cancéreuses faiblement tumorigénique et non métastatique.

Dans le but d'évaluer l'implication de SOCS1 dans la carcinogenèse colorectale, nous avons donc, en cohérence avec nos résultats (**Figure 7**), opté pour la surexpression de SOCS1 dans les cellules CT26 et pour la diminution de son expression dans les cellules CT36. Trois populations indépendantes de cellules CT26 surexprimant SOCS1 ont été générées par infection rétrovirales. Elles ont été nommées CT26 Flag-SOCS1 A, B et C. À noter que la séquence codante du gène *socs1* est précédée en 5' par l'étiquette Flag. Simultanément, trois autres populations de CT26 exprimant le plasmide vide ont été générées. Elles ont été nommées CT26 pLPCX A, B et C, et servent de contrôle. La

surexpression de SOCS1, en comparaison avec les cellules contrôles, a été validée par immunobuvardage (IB) avec un anticorps dirigé contre l'étiquette Flag (**Figure 8A**).

Des populations de cellules CT36, dont l'expression de SOCS1 a été diminuée par une approche d'ARN interférence ont été générées. Le shARN dirigé contre l'ARNm de SOCS1 a été introduit par infection lentivirale dans des CT36 nommée sh-SOCS1. Parallèlement, un shARN dirigé contre une séquence aléatoire et non-codante a été introduit dans les cellules CT 36 qui serviront de contrôle (CT36 sh-CTRL). La baisse d'expression de SOCS1 dans la lignée CT36 sh-SOCS1 par rapport à la lignée CT36 Sh-CTRL a été validée par PCR semi-quantitative de l'ARNm de SOCS1 (**Figure 8B**).

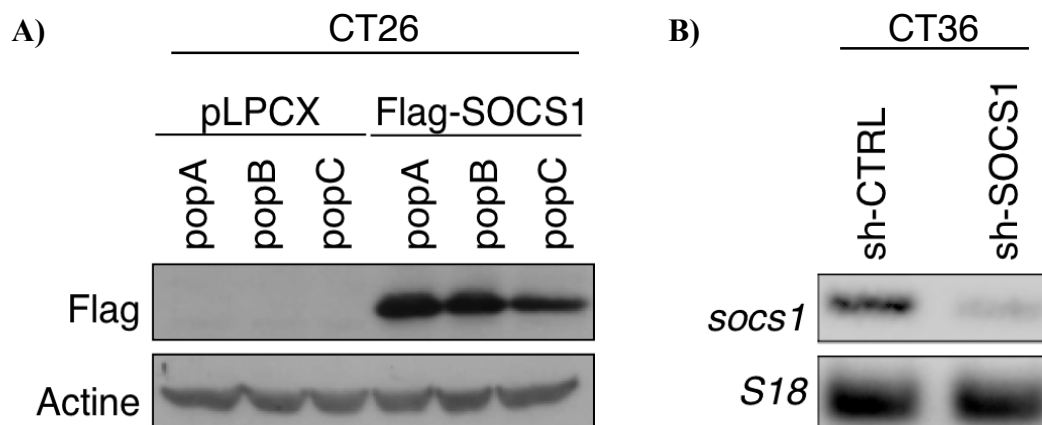


Figure 8. Modulation de l'expression de SOCS1 dans le modèle cellulaire CT26/CT36.

A) Expression de protéine Flag-SOCS1 dans les cellules CT26. Un IB dirigé contre l'étiquette Flag permettant la détection de la protéine SOCS1 exogène a été réalisé avec des lysats cellulaires totaux provenant de populations indépendantes de cellules CT26 Flag-SOCS1 et CT26 pLPCX. **B)** Expression de l'ARNm de SOCS1 dans les cellules CT36. Une analyse PCR semi-quantitative de l'ARNm de SOCS1 a été réalisée chez une population CT36 sh-SOCS1 en comparaison avec la population contrôle CT36 sh-CTRL.

La population CT26 Flag-SOCS1 A étant celle des trois qui présente un niveau de SOCS1 exogène le plus élevé, c'est cette dernière qui a été choisie pour le reste de l'étude. L'annotation « CT26 Flag-SOCS1 » fera dès à présent référence à la population CT26 Flag-SOCS1 A. Bien que d'autres populations de CT36 sh-SOCS1 ont été générées, seule

une morphologie de type épithéliale, faisant des contacts cellule-cellule, révélatrice de leur faible potentiel tumorigénique (**Figure 9B**).

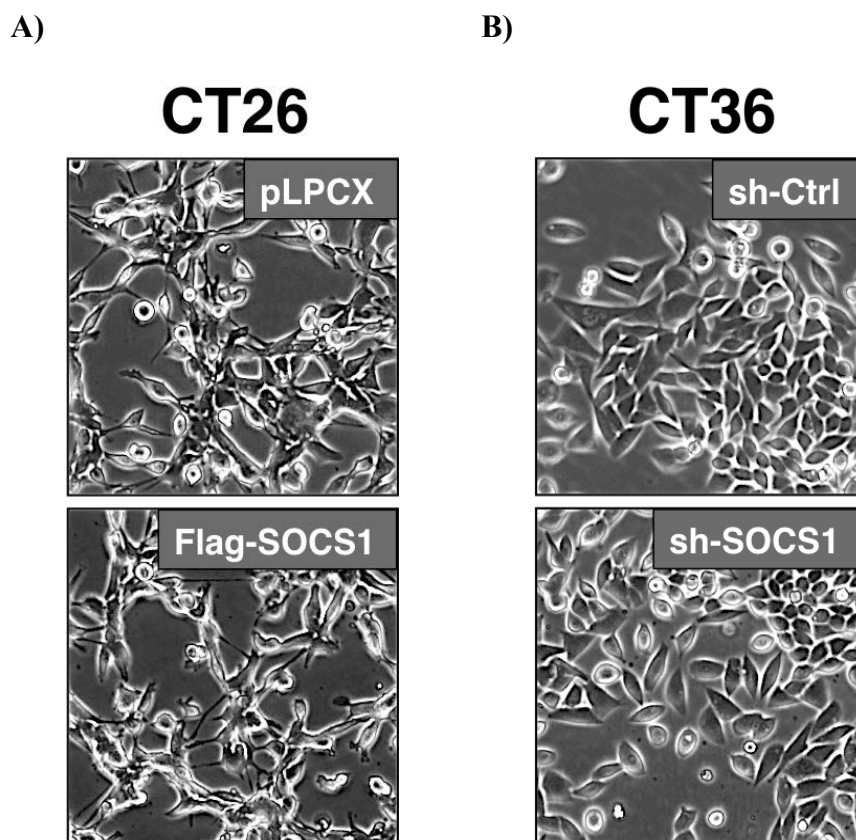


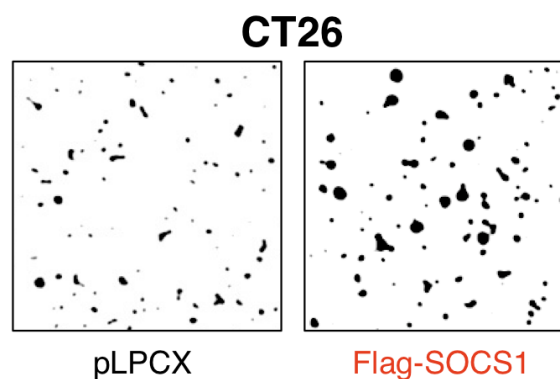
Figure 9. La modulation de l'expression de SOCS1 n'affecte pas la morphologie cellulaire du modèle CT26/CT36

A) Observation microscopique à contraste de phase des cellules CT26 Flag-SOCS1 et pLPCX contrôles. **B)** Observation microscopique à contraste de phase des cellules CT36 sh-SOCS1 et sh-CTRL contrôles.

2.2 SOCS1 augmente la croissance cellulaire des cellules CT26 et CT36

Des décomptes cellulaires journaliers ont été réalisés afin d'évaluer l'implication de SOCS1 dans croissance cellulaire des lignées CT26/CT36. Nos résultats suggèrent que la surexpression de SOCS1 favorise la croissance cellulaire des cellules CT26, alors que sa baisse d'expression dans les cellules CT36 abaisse la croissance cellulaire.

A)



B)

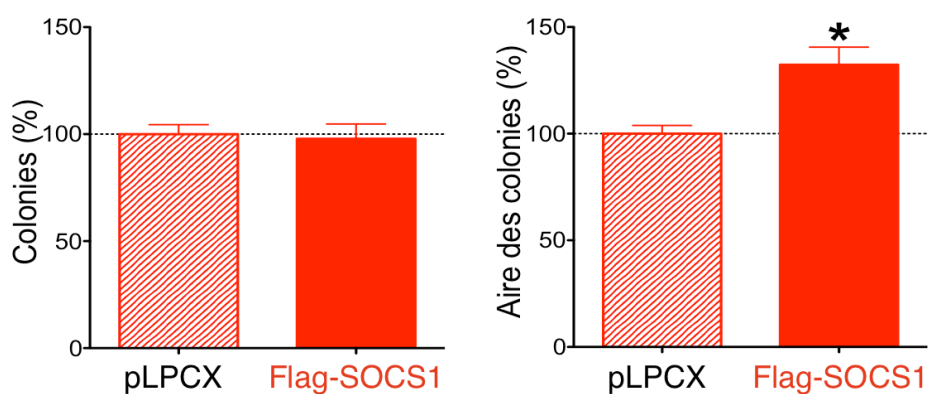


Figure 11. L'expression de SOCS1 dans les cellules CT26 n'a pas d'incidence sur leur capacité à former des colonies en agar mou, mais augmente leurs capacités à croître en indépendance d'ancrage.

Les cellules CT26 pLPCX et Flag-SOCS1 ont étéensemencées dans une couche d'agar mou (5000 cellules/puits dans une plaque de 6 puits) pendant 7 jours. Les colonies formées ont été visualisées grâce à une réaction de métabolisation du MTT, et par la suite photographiées. L'analyse des clichés a été réalisée via le logiciel Image J. **A)** Photographie représentative des colonies formées dans l'agar mou. **B)** Représentations graphiques du pourcentage (\pm SEM, $n = 3$ en triplicata) du nombre et de l'aire des colonies formées par les cellules CT26 Flag-SOCS1 en fonction de celles formées par les cellules CT26 pLPCX. Voir la légende des valeurs significatives (*) dans la section MATÉRIELS ET MÉTHODES.

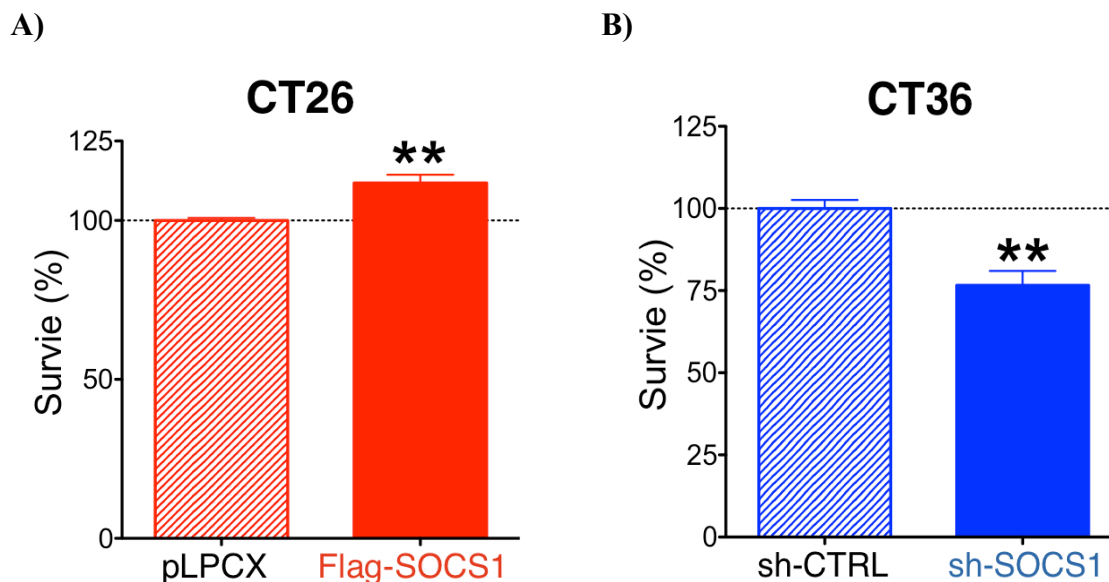


Figure 12. SOCS1 augmente la survie des cellules CT26/CT36 en suspension.

A) Représentation graphique du pourcentage (\pm SEM, n=3 en triplicata) de la viabilité des cellules CT26 Flag-SOCS1 en fonction des CT26 pLPCX. **B)** Représentation graphique du pourcentage de la viabilité des cellules CT36 sh-SOCS1 en fonction des CT36 sh-CTRL (\pm SD, n=2 en triplicata). Les cellules ont été mises en suspension dans un milieu sans sérum dans des plaques de 24 puits préalablement enduits de polyHema. Après 10 heures, la viabilité des cellules a été estimée grâce à un essai colorimétrique du métabolisme du XTT.

Le fait que l'expression de SOCS1 augmente l'aptitude des cellules CT26 et des CT36 à survivre en suspension va encore à l'encontre de notre hypothèse de recherche. Au terme de la caractérisation *in cellulo* de l'influence de SOCS1 sur les caractéristiques cancéreuses du modèle CT26/CT36, nos observations suggèrent un rôle pro-tumoral joué par SOCS1 dans le CCR.

2.5 SOCS1 augmente la capacité des CT26 à former des tumeurs *in vivo*

Dans l'optique de confirmer les observations faites *in cellulo* par une approche expérimentale *in vivo*, nous avons évalué le potentiel tumorigénique de SOCS1 dans un modèle murin. Les cellules CT26 surexprimant SOCS1 et leurs cellules contrôles, les CT26 pLPCX, ont été injectées de façons sous-cutanées dans des souris. Comme mentionné

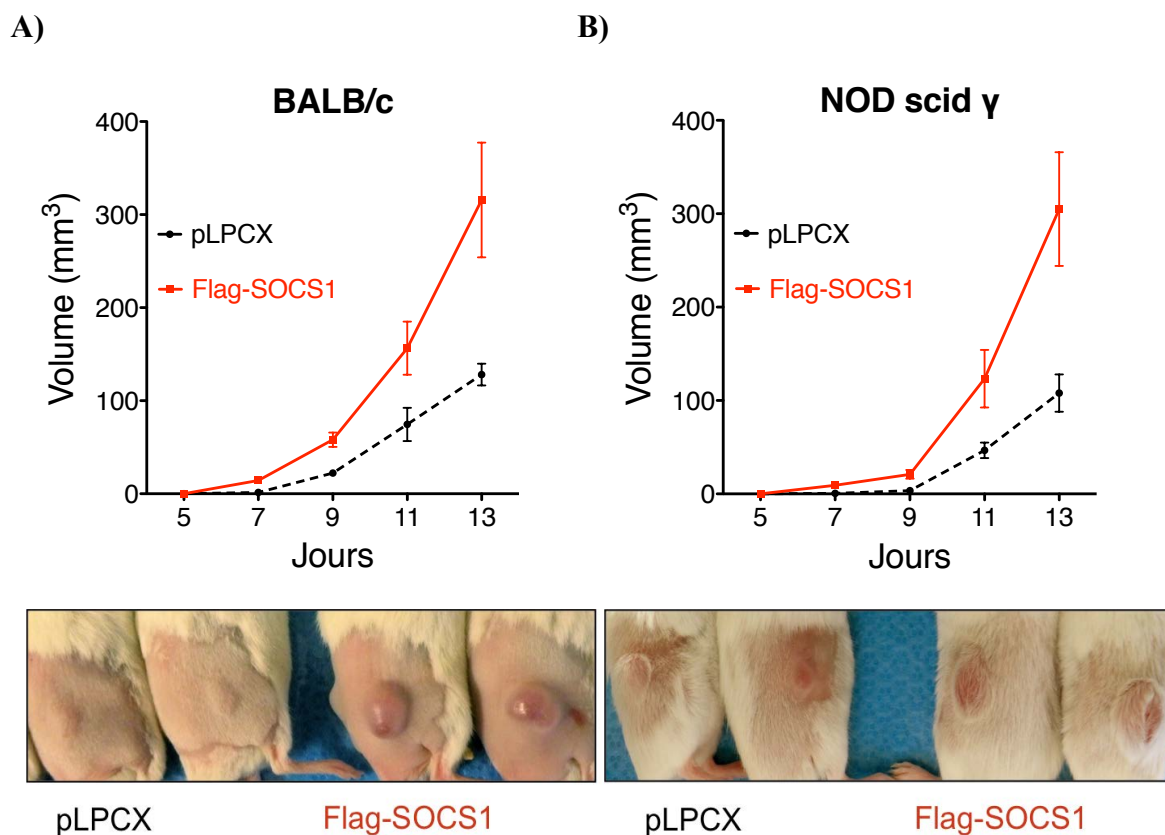


Figure 13. SOCS1 augmente la capacité des CT26 à former des tumeurs sous-cutanées dans les souris BALB/c et les NOD scid gamma.

Les cellules CT26 surexprimant SOCS1 ou le vecteur pLPCX (10^5), ont été injectées dans des souris BALB/c **A)** et NOD scid gamma **B)**. Pour chaque type cellulaire, trois souris ont été injectées de manière sous-cutanée au niveau des flancs droit et gauche, soit un total de six injections. Les graphiques représentent les volumes tumoraux selon le nombre de jours suite à l'injection des cellules dans les souris. Les photographies illustrent les souris le jour du sacrifice. Un test statistique 2way ANOVA démontre que les courbes (Flag-SOCS1 et pLPCX) sont significativement différentes ($p < 0,0001$) et ce dans les deux graphiques A) et B).

Ces résultats obtenus *in vivo* corroborent ceux obtenus *in cellulo* décrits précédemment. Toujours en opposition avec notre hypothèse initiale, ces évidences *in vivo* suggèrent un rôle pro-tumoral pour SOCS1 dans notre modèle CT26/CT36.

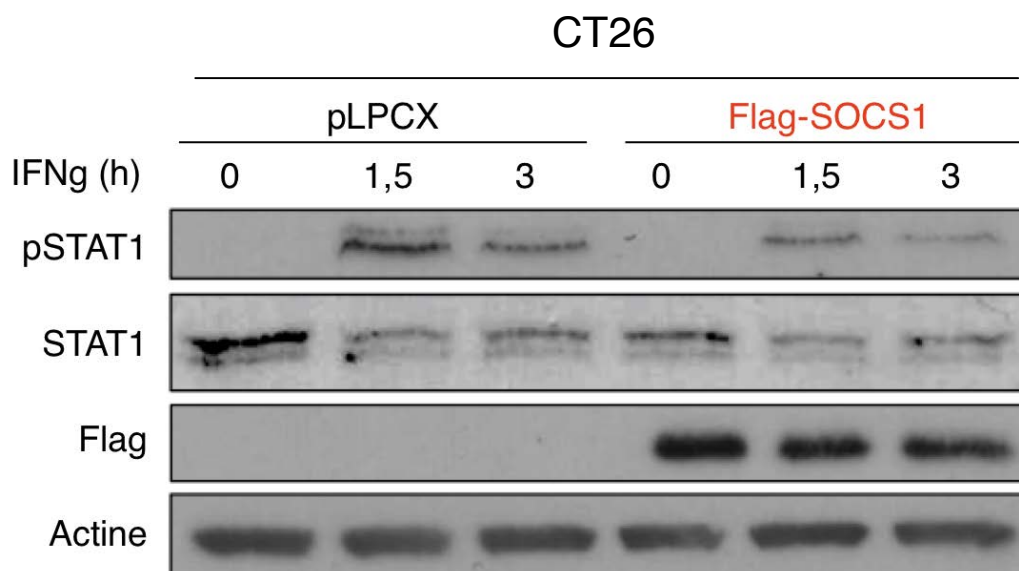


Figure 14. SOCS1 régule négativement l'activation du facteur STAT1 induite par l'IFN γ dans la lignée cellulaire CT26

Évaluation de l'expression et de la phosphorylation de STAT1 dans les cellules CT26 Flag-SOCS1 et pLPCX, plus ou moins stimulées à l'IFN γ (20ng/ml) réalisée par IB sur des lysats cellulaires totaux.

3.2 SOCS1 inhibe l'expression du récepteur Met dans les CT26

La protéine SOCS1 possède l'aptitude à réguler négativement l'expression du récepteur Met, ainsi que sa signalisation et les fonctions biologiques induites suite à une stimulation à l'HGF dans les hépatocytes (Gui et al., 2011). Il doit être précisé que la lignée cellulaire CT26 est bien décrite dans la littérature pour présenter des caractéristiques tumorigéniques et métastatiques en partie dépendantes de l'activité du récepteur Met (Kubota et al., 2004; Matsumura et al., 2013). Pour savoir si SOCS1 conserve cette faculté dans les cellules de CCR CT26, nous avons évalué l'expression, ainsi que l'état d'activation du récepteur Met dans les cellules CT26 qui surexpriment SOCS1. Nos résultats supportent une inhibition de l'expression de Met par SOCS1 dans les cellules CT26 (**Figure 15**). Cette observation va de pair avec une baisse de l'activation de Met, mis en évidence par sa phosphorylation réduite sur tyrosines suite à une stimulation à l'HGF.

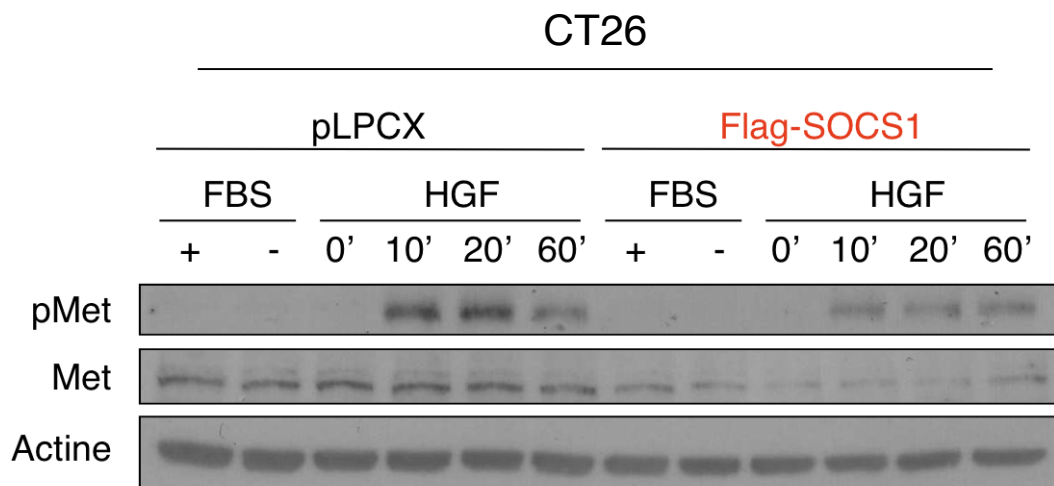


Figure 15. SOCS1 régule négativement l'expression du récepteur Met ainsi que son activation induite par l'HGF dans la lignée cellulaire CT26

Les cellules CT26 Flag-SOCS1 et pLPCX ont été maintenues dans du milieu contenant du FBS (10%), ou bien sujettes à une privation en sérum suivi ou non d'une stimulation à l'HGF (25ng/ml). Des IB visant à évaluer l'expression et la phosphorylation du récepteur Met ont été réalisés sur des lysats cellulaires totaux.

SOCS1 interagit et inhibe l'expression de p66SHC

Via l'utilisation de la spectrométrie de masse comme moyen de découvrir des nouveaux partenaires protéiques de SOCS1, une récente publication a rapportée une probable interaction entre SOCS1 et la protéine adaptatrice p66SHC (Malette et al., 2010). Les protéines Shc sont des protéines adaptatrices communément recrutées aux RTK actifs et impliquées dans la transduction du signal en aval. Il existe trois isoformes de la protéine Shc (p46, p52, et p66). L'isoforme p66SHC se distingue des autres isoformes notamment pour sa capacité à induire l'apoptose suite à un stress oxydatif, et à inhiber l'activation de la voie mitogénique des MAPK en aval des RTK (Galimov, 2010; Migliaccio et al., 1997). En cela, P66SHC est de plus en plus considéré comme un suppresseur de tumeur.

Pour confirmer l'interaction entre SOCS1 et P66SHC décrite par Malette et ses collaborateurs, une expérience d'interaction *in vitro* à l'aide d'une protéine de fusion GST-SOCS1 a été réalisée (**Figure 16A**). Effectivement, notre expérience suggère qu'il existe

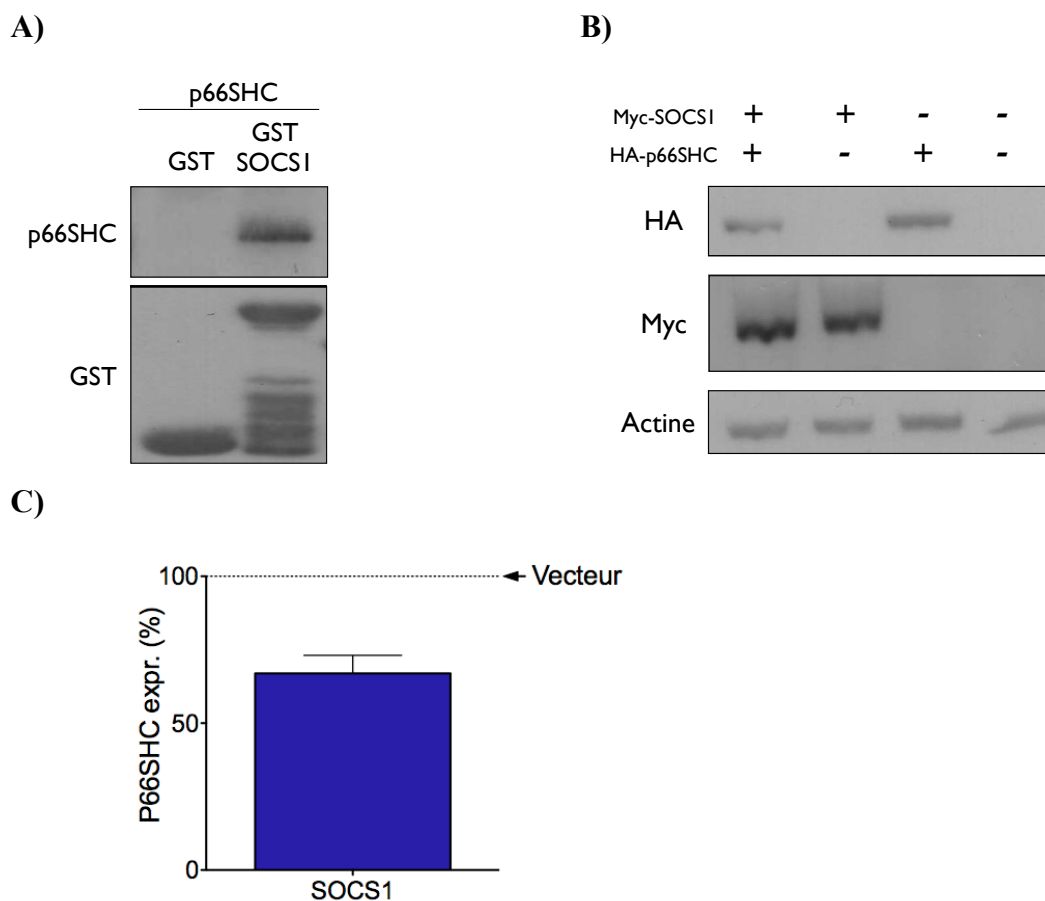


Figure 16. SOCS1 interagit et régule négativement l'expression exogène de P66SHC dans les cellules HEK 293

A) Validation de l'interaction entre SOCS1 et l'isoforme p66SHC. Les protéines Myc-SOCS1 et HA-p66SHC ont été exprimées transitoirement dans des HEK293. Les niveaux protéiques de SOCS1, de p66Shc et de l'actine ont été évalués par IB sur des lysats cellulaires totaux. **B)** Les quantifications sur trois expériences indépendantes ont été réalisées par densitométrie. La représentation graphique illustre le pourcentage d'expression de p66SHC en présence de SOCS1 par rapport à son expression en absence de SOCS1. Les barres d'erreurs sont obtenues par le calcul de SD. **C)** Expérience d'interaction protéique *in vitro* entre la protéine de fusion GST-SOCS1 et du lysat cellulaire total de HEK293 surexprimant la protéine p66SHC avec une étiquette HA.

SOCS1 ayant la capacité d'interagir et inhiber l'expression de p66SHC exogène en condition transitoire, le niveau d'expression de p66SHC endogène a été évalué dans les cellules CT26 (**Figure 17**). Les résultats révèlent que l'expression de p66SHC varie en fonction de l'expression de SOCS1. L'analyse quantitative de trois expériences indépendantes démontre une régulation négative marquée de l'isoforme P66SHC par SOCS1 dans les cellules CT26 Flag-SOCS1 et sh-SOCS1 dans lesquelles l'expression de SOCS1 est modulée (**Figure 17B**).

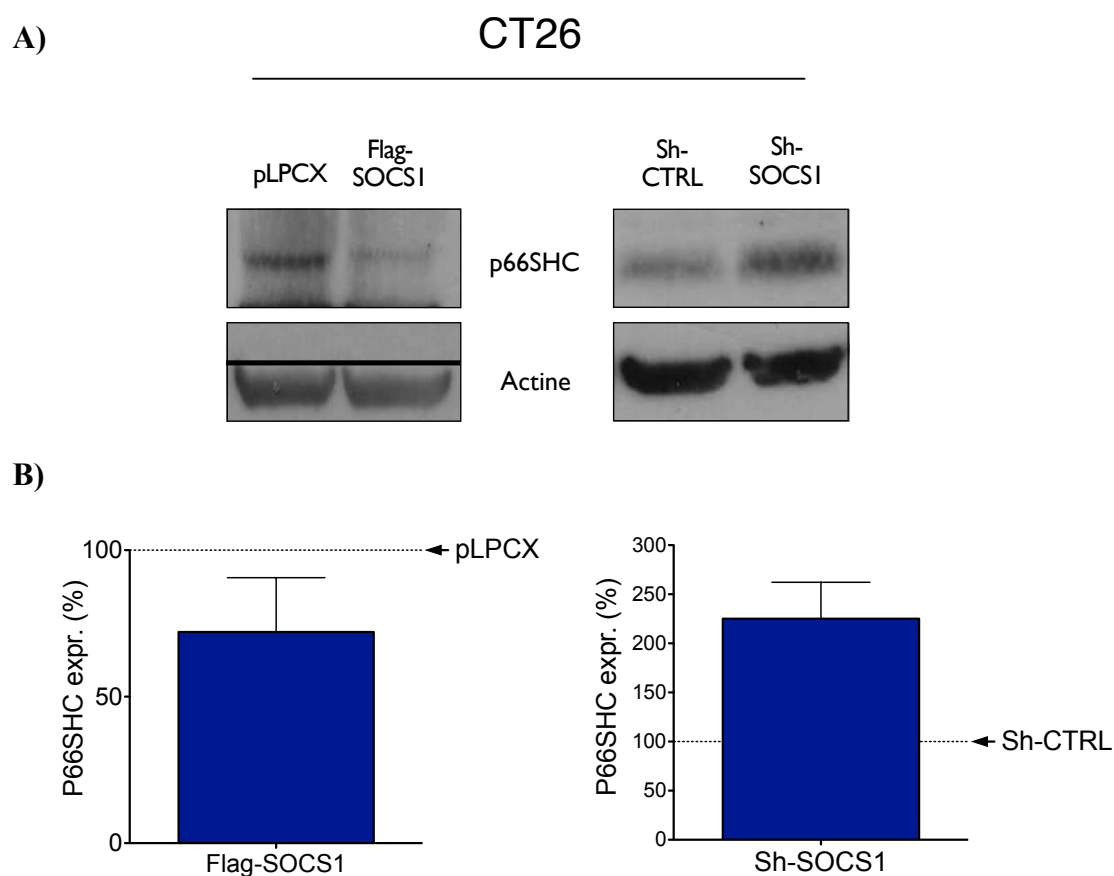


Figure 17. SOCS1 régule négativement l'expression de P66SHC dans la lignée cellulaire CT26

A) IB dirigé contre la protéine endogène p66SHC dans des LCT provenant des populations cellulaires CT26 Flag-SOCS1/pLPCX et CT26 Sh-SOCS1/Sh-CTRL. **B)** Densitométrie quantifiant les niveaux protéiques de p66Shc dans les contextes cellulaires CT26 Flag-SOCS1/pLPCX et CT26 Sh-SOCS1/Sh-CTRL. Les représentations graphiques sont basées sur 3 expériences indépendantes et les barres d'erreurs sont obtenues par le calcul de SD.

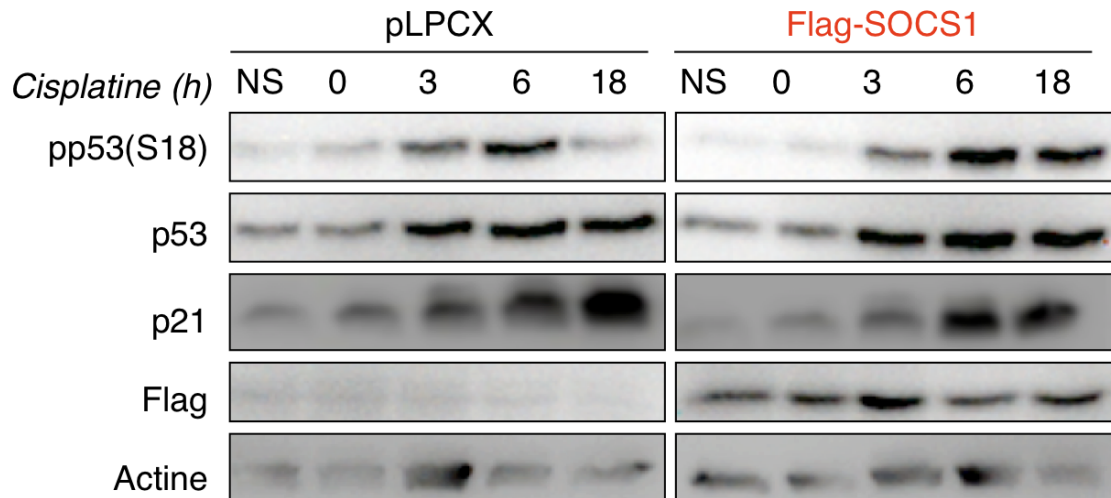


Figure 18. SOCS1 induit l'expression et l'activation de P53, mais paradoxalement réprime l'expression de P21 une de ses cibles transcriptionnelle

Les populations cellulaires CT26 Flag-SOCS1 et CT26 pLPCX ont été traitées avec 10 uM de Cisplatine pendant trois heures, puis les cellules ont été lavées avec du PBS. Des populations cellulaires contrôles n'ont pas été traitées et sont notées NS (Non Stimulées). Les lysats cellulaires ont été réalisés aux heures indiquées suivant le traitement. Des IB visant à évaluer l'activation de la signalisation de P53 ont été réalisés sur des lysats cellulaires totaux. Les IB présentés proviennent d'une seule et même membrane, et ont été divisés pour des raisons de clarté.

DISCUSSION

1. SOCS1 amplifie les caractéristiques cancéreuses des lignées CCR CT26/CT36

À l'origine de notre étude, nous avons émis comme hypothèse de recherche que SOCS1 agirait en tant que suppresseur de tumeur dans le CCR. Cependant, notre investigation *in vitro* et *in vivo* des caractéristiques cancéreuses des lignées CT26 et CT36 suite à une modulation de l'expression de SOCS1 suggère le contraire. En effet, nous avons mis en évidence que la surexpression de SOCS1 augmente les attributs cancéreux des CT26, tandis que sa baisse d'expression dans les CT36 les diminue. Les caractéristiques cancéreuses dont il est fait référence ici sont la croissance cellulaire, la croissance sans ancrage à la MEC, la résistance à l'anoïkose ainsi que la croissance de tumeurs expérimentales sous-cutanées chez la souris (**Figures 10-13**). Afin de confirmer ces observations, une approche expérimentale en miroir a été réalisée, soit, une baisse d'expression de SOCS1 dans les cellules CT26 et une surexpression de SOCS1 dans les cellules CT36 (résultats non montrés). De façon cohérente avec les précédents résultats, cette approche confirme l'action pro-tumorale menée par SOCS1 dans le modèle cellulaire CCR CT26/C36 (**Tableau 6**).

	CT26	CT36
Flag-SOCS1	<ul style="list-style-type: none"> ≠ Morphologie cellulaire ↑ Croissance cellulaire ↑ Croissance sans ancrage ↑ Résistance à l'anoïkose ↑ Croissance tumorale <i>in vivo</i> 	<ul style="list-style-type: none"> ≠ Morphologie cellulaire ↑ Croissance cellulaire ≠ Croissance sans ancrage ↑ Résistance à l'anoïkose
sh-SOCS1	<ul style="list-style-type: none"> ≠ Morphologie cellulaire ↓ Croissance cellulaire ↓ Croissance sans ancrage ↓ Résistance à l'anoïkose 	<ul style="list-style-type: none"> ≠ Morphologie cellulaire ↓ Croissance cellulaire ≠ Croissance sans ancrage ↓ Résistance à l'anoïkose

Tableau 6. Rôle pro-tumoral joué par SOCS1 dans le modèle cellulaire CCR CT26/36

Compilation des observations faites suite à la modulation de l'expression de SOCS1 dans les lignées cellulaires CT26/CT36.

4. Modèle moléculaire proposé pour le rôle pro-tumoral de SOCS1 dans le CCR

Notre caractérisation de l'influence de SOCS1 sur les voies de signalisations JAK1/STAT1, du récepteur Met et de p53, nous a permis d'avancer des éléments de réponses quant aux mécanismes moléculaires sous-jacents au rôle pro-tumoral de SOCS1 dans le CCR. Ces dernières sont résumées dans le modèle suivant (**Figure 19**). En inhibant l'activité de suppresseurs de tumeur tels que STAT1, p21 ou encore p66Shc, SOCS1 favoriserait la progression tumorale colique. Fréquemment dans le CCR l'oncogène RAS présente une activation aberrante. Dans un tel contexte, l'action répressive de SOCS1 sur le récepteur Met n'aura pas d'incidence. De plus sa probable phosphorylation par Met le rendrait fonctionnellement inactif.

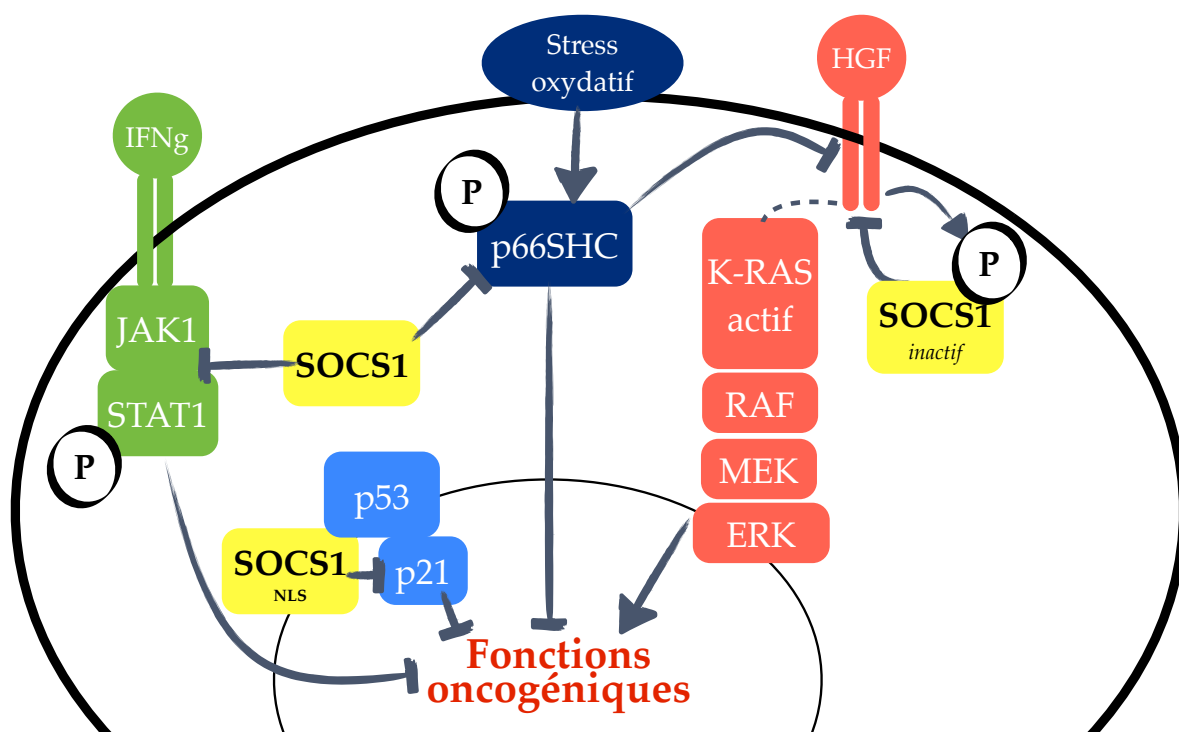


Figure 19. Modèle proposé illustrant l'implication moléculaire de SOCS1 responsable de son action pro-tumoral

En accord avec nos résultats et les données de la littérature, nous proposons que SOCS1 jouerait des fonctions opposées dépendamment du type de CCR. De sorte que dans les CCR de type sporadique, SOCS1 devrait être considéré comme oncogène et son expression comme marqueur de mauvais pronostic ; et dans les CCR reliés aux pathologies inflammatoires, SOCS1 devrait être considéré comme suppresseur de tumeur et son expression comme marqueur de mauvais pronostic.

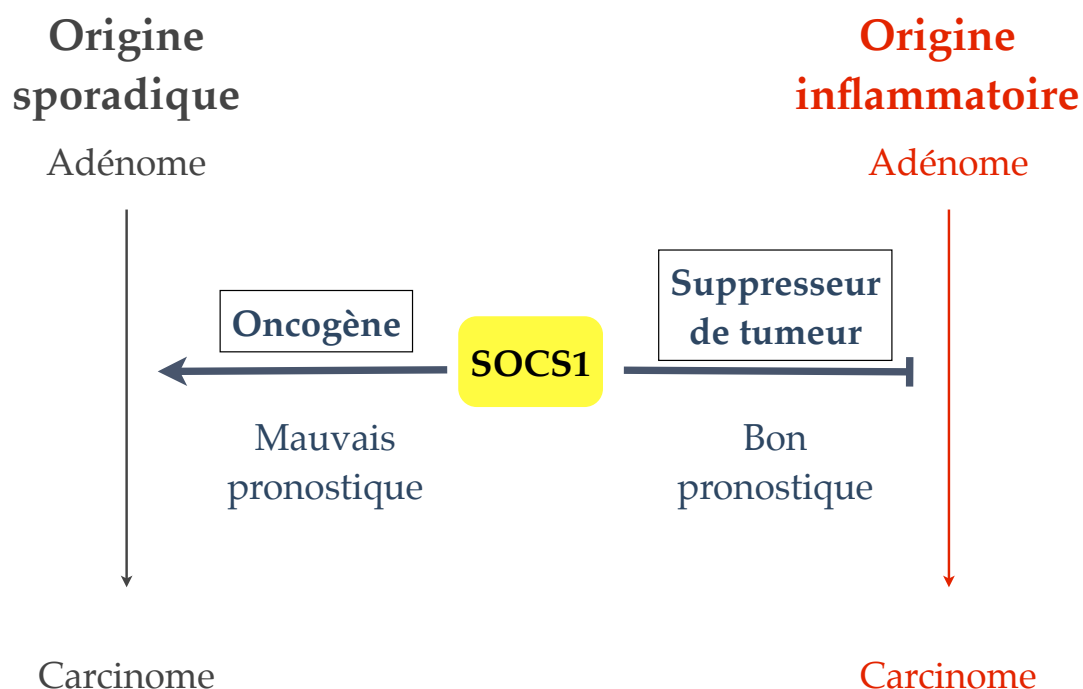


Figure 20. Modèle représentant la double face de SOCS1 dans le CCR

En inhibant l'activité de suppresseurs de tumeur tels que STAT1, p21 ou encore p66Shc, SOCS1 devrait être considéré comme un oncogène dans les CCR sporadiques. En se comportant comme un puissant régulateur de la signalisation des cytokines, SOCS1 agirait en tant que suppresseur de tumeur dans les CCR associés à un contexte inflammatoire.