

Université de Sherbrooke

**Rôle de SOCS1 dans l'immunogénicité de la tumeur en particulier au niveau  
du carcinome hépatocellulaire**

Par  
Maroua Abidi  
Programme d'Immunologie

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 Immunologie

Sherbrooke, Québec, Canada  
Janvier, 2017

Membres du jury d'évaluation  
Pr Ilangumaran Subburaj, PhD, pédiatrie-Immunologie  
Pr Abdelaziz Amrani, PhD, pédiatrie-Immunologie  
Pr Klaus Klarskov, PhD, Département de pharmacologie-physiologie

© Maroua Abidi, 2016

## Remerciements

Je remercie tout d'abord mon superviseur Subburaj Ilangumaran pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, ce qui m'a permis de maîtriser plusieurs techniques.

Je remercie toutes personnes qui ont contribué à la concrétisation ainsi qu'à la correction de ce mémoire, en particulier Pre Claire Dubois qui m'a beaucoup aidé et m'a soutenu tout le long de la réalisation de ce mémoire bien qu'elle ne fasse pas partie de ce jury (merci infiniment), Pr Abdelaziz Amrani qui a m'a beaucoup offert de son temps et m'a beaucoup soutenu au cours de cette maîtrise (merci beaucoup) ainsi qu'au Pr Klaus Klarskov qui a accepté de faire partie de ce Jury.

Je remercie vivement Pr Jean-Pierre Perreault, Vice-doyen à la recherche et aux études supérieures, Pre Johanne Desrosiers, Secrétaire facultaire et Vice-doyenne à la vie étudiante, ainsi que Mme Caroline Audette, conseillère en matière de respect, de m'avoir aidé à mener à terme ce mémoire.

Et enfin je tiens à remercier mes collègues de l'Université de Sherbrooke.

## Remerciements

Je dédie ce mémoire à ma famille, spécialement à ma sœur, mon père et ma mère qui m'ont beaucoup soutenu tout le long de ce programme, mes cousines Yosra et Manel, mon amie Imen, et aux personnes qui ont cru en moi.

Finalement, je dédie ce mémoire à moi même. Sa rédaction m'a beaucoup appris.

Life is a serious business! People will always push you if you let them do, so don't make it easy for them. Don't let someone else's opinion decide your future. Fight your way out.

Stay hungry, stay foolish (Steeve Jobs), and stay strong. Never quit and remember that pain is temporary.

## Résumé

### Rôle de SOCS1 dans l'immunogénicité de la tumeur en particulier au niveau du carcinome hépatocellulaire

Par

Maroua Abidi

Programme d'Immunologie

Le carcinome hépatocellulaire (HCC) est la troisième cause commune de décès de cancer et affecte plus les hommes que les femmes. Le HCC résulte d'une dérégulation des voies de signalisation impliquées dans l'initiation de l'inflammation menant ainsi à des répercussions désastreuses. De part la complexité de ce type de cancer, les traitements qui existent à ce jour ne sont pas très prometteurs et ont un faible pourcentage de « rémission ». L'immunothérapie soulève beaucoup d'espoir quant à l'orientation vers un traitement efficace plausible. En effet, plusieurs suppresseurs de tumeur se retrouvent réprimés, parmi lesquels le SOCS1. C'est dans cette optique que nos recherches se sont orientées en mettant la lumière sur le SOCS1 «suppresseur de signalisation des cytokines 1 (SOCS1) » qui est réprimé au niveau du HCC et dont la restauration pourrait contribuer à un pronostic favorable à la rémission. La protéine SOCS1 a beaucoup attiré la curiosité des chercheurs de part son rôle suppresseur de tumeur. Pour comprendre les mécanismes d'action de SOCS1 et son implication dans la neutralisation de la tumeur, nous avons généré trois types stables de la lignée cellulaire du carcinome hépatocellulaire de souris Hepa1-6, une portant un vecteur vide, l'autre exprimant le type sauvage du gène SOCS1 (SOCS1-WT; Hepa-S) et une portant une mutation au niveau du domaine SH2 (SOCS1-R105K; Hepa-R). Le mutant ne peut plus inhiber la signalisation des cytokines. Lors de l'implantation sous-cutanée des cellules Hepa1-6 modifiées, chez des souris C57BL/6 et NOD.scid.gamma (NSG). Nous avons observé que les cellules Hepa1-6 exprimant le vecteur de contrôle (Hepa-V) formaient de grosses tumeurs tandis que les cellules Hepa-S formaient de petites tumeurs chez les deux types de souris. Les cellules Hepa-R quant à elles, formaient de grosses tumeurs seulement chez des souris immunodéficientes (NSG) mais montraient une croissance nettement retardée lorsqu'elles étaient greffées aux souris (C57BL/6) immunocompétentes. Partant de ce constat intrigant, nous avons postulé que SOCS1 favorise l'immunogénicité des cellules tumorales par son domaine SOCS Box. Par conséquent, les cellules Hepa-R offrent une occasion unique de démêler le potentiel pro-immunogène de SOCS1, et ceci dans le but d'élucider les fonctions immunogènes de SOCS1 dans le cancer du foie. Jusqu'à présent aucune précédente recherche ne s'est aventurée à chercher l'implication de SOCS1 dans l'augmentation de l'immunogénicité.

Mots clés : Carcinome hépatocellulaire, infiltration cellulaire, réponse anti-tumorale, lymphocytes T, SOCS1.

## Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the third common cause of cancer deaths and affects men more than women. HCC results from a dysregulation that affects many factors including inflammation, leading to disastrous repercussions. Due to the complexity of this type of cancer, existing treatments nowadays are not promising and have a low remission percentage. Immunotherapy raises great hope regarding the direction towards a plausible effective treatment. It is in this context that our research has focused on shedding light on the SOCS1 "signaling suppressor of cytokine 1" (SOCS1) which was found to be suppressed in HCC and whose restoration could contribute to a favorable prognosis. The SOCS1 gene fueled the curiosity of researchers due to its suppressor role in tumor. To understand the underlying mechanisms, we generated three types of stable mice cell line hepatocellular carcinoma Hepa1-6, one carrying an empty vector, the other expressing the wild-type gene SOCS1 (SOCS1-WT; hepatic S) and carrying a mutation in the SH2 domain (SOCS1-R105K; Hepa-R). These mutants cannot inhibit JAK-STAT cytokine signaling.

Upon subcutaneous implantation of the modified Hepa1-6 cells in C57BL/6 and NOD.scid.gamma (NSG) mice, the Hepa1-6 cells expressing the control (Hepa-V) formed large tumors while the Hepa-S cells formed small tumors in both types of mice. Hepa-R cells in turn, formed large tumors only in immunodeficient mice (NSG), but showed a markedly delayed growth when transplanted into (C57BL/6) immunocompetent mice. Based on this intriguing finding, we speculate that SOCS1 could promote immunogenicity of tumor cells, which was masked by the ability of SOCS1 to inhibit signaling of growth factors. Therefore, Hepa-R cells provide a unique opportunity to unravel the pro-immunogenic potential of SOCS1, and this in order to elucidate the immunogenic functions of SOCS1 in liver cancer. So far no previous research studied the potential of SOCS1 in increasing immunogenicity.

**Keywords :** Hepatocellular carcinoma, cellular infiltration, antitumor immunity, T lymphocytes, SOCS1.

## Table des matières

<b>Résumé</b> .....	iv
<b>Table des matières</b> .....	vi
<b>Liste des figures</b> .....	ix
<b>Liste des tableaux</b> .....	xi
<b>Liste des abréviations</b> .....	i
<b>Introduction</b> .....	1.
I. CARCINOME HEPATOCELLULAIRE.....	1
1. Cellules du foie .....	1.
2. Fonctions du foie.....	2.
3. Homéostasie du système immunitaire dans le foie.....	2.
4. Facteurs de risques .....	4.
II. ETIOLOGIE DU CARCINOME HEPATOCELLULAIRE.....	6.
1. Inflammation.....	6.
2. Instabilités génomiques .....	7.
III. DIAGNOSTIQUE ET TRAITEMENTS.....	8.
1. Diagnostique.....	8.
2. Traitements du carcinome hépatocellulaire .....	8.
IV. La réponse anti-Tumorale.....	9.
1. Le rôle primordial des lymphocytes T CD8+ dans l'élimination des tumeurs.....	10.
2. Théorie d'échappement à l'immuno-surveillance tumorale .....	12.
V. ROLES DE SOCS1 .....	14.
1. Structure.....	15.
2. Implication dans le système immunitaire.....	16.
3. rôle de suppresseur de tumeur .....	17.
4. Le devenir des peptides dégradés.....	20.
<b>Hypothèse/problématique</b> .....	22.
<b>Matériel et méthodes</b> .....	24.

1. Lignées cellulaires .....	24.
2. Culture cellulaire et stimulation avec les cytokines .....	24.
3. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS et immunobuvardage .....	25.
4. Modèles animaux .....	28.
5. Croissance tumorale .....	29.
6. Histochimie .....	30.
7. Isolation des lymphocytes infiltrants la tumeur.....	31.
8. Isolation des cellules des ganglions.....	32.
9. Analyse par cytométrie de flux (FACS) .....	32.
10. Analyses statistiques.....	33.
<b>Résultats</b> .....	34.
I. EVALUER LE RÔLE DE SOCS1 DANS LA CROISSANCE DES HÉPATOCARCINOMES CHEZ DES SOURIS IMMUNODÉFICIENCES NSG ET IMMUNOCOMPÉTENTES C57BL/6.....	34.
1. Validation des lignées cellulaires utilisées dans ce travail .....	34.
2. Croissance tumorale chez les souris NOD .....	35.
3. Croissance tumorale chez les souris C57BL/6.....	37.
II. CARACTÉRISATION DES LEUCOCYTES RECRUTÉS AU NIVEAU DE LA TUMEUR ET DES GANGLIONS DRAINANTS ET NON DRAINANTS .....	41.
1. Caractérisation des cellules lymphocytaires recrutées au niveau de la tumeur et des ganglions drainants et non drainants .....	41.
2. Caractérisation des cellules leucocytaires recrutées au niveau de la tumeur et des ganglions drainants et non drainants. ....	48.
<b>Discussion</b> .....	55.
1. Le domaine SH2 est responsable de la répression de la signalisation des cytokines inflammatoires .....	56.
2. La Croissance tumorale chez les souris immunodéficientes et chez les souris C57BL/6.....	58.
3. Etude de la structure des tissus tumoraux prélevés des souris injectées avec les cellules Hepa.....	59.

4. Nombre total des sous populations T lymphocytaires au niveau des tumeurs induites chez les souris C57BL/6 injectées avec les cellules Hepa.....	60.
5. Nombre total des sous populations T lymphocytaires au niveau des ganglions en réponse à l'implantation des cellules tumorales Hepa.....	62.
a. Nombre total de la sous population T CD8+ lymphocytaire.....	62.
b. Nombre total de la sous population T CD4+ lymphocytaire .....	63.
6. Nombre total des populations leucocytaires au niveau des tumeurs induites chez les souris C57BL/6 injectées avec les cellules Hepa.....	64.
<b>Conclusion</b> .....	66.
<b>Perspectives</b> .....	67.
<b>Liste des références</b> .....	68.

## Liste des figures

Figure I.1: les trois phases de l'échappement de la tumeur à l'action du système immunitaire .....	14.
Figure I.2 Structure des protéines de la famille SOCS.....	16.
Figure I.3 Rôle suppresseur de SOCS1 via la répression de la signalisation des cytokines inflammatoires.....	18.
Figure I.4. Rôle suppresseur de SOCS1 via l'ubiquitination des substrats la signalisation des cytokines inflammatoires.....	20.
Figure II. 1 Rôle immunogène pour la protéine SOCS1.....	23.
Figure III.1 : Stratégie d'inoculation des cellules tumorales dans le flanc des souris .....	30.
Figure IV.1. Inhibition de la phosphorylation de STAT3 par la protéine SOCS1 mais pas par SOCS1R105K chez les cellules Hepa 1-6.....	35.
Figure IV. 2. La croissance tumorale chez les souris NOD.scid.gamma (NSG)...	36.
Figure IV. 3. La croissance tumorale chez les souris C57BL/6.....	38.
Figure IV. 4. Infiltration par les cellules mononucléaires du tissu tumoral des souris C57BL/6 injectées avec les cellules Hepa exprimant SOCS1 ou SOCS1R105K..	40.
Figure IV.5. Stratégie d'identification de la population de leucocytes recrutée au niveau des tumeurs et des ganglions.....	42.
Figure IV. 6. Stratégie de sélection des populations T lymphocytaires.....	43.
Figure IV.7. Fréquence des sous populations des lymphocytes T recrutées au niveau des tumeurs et des ganglions.....	44.
Figure IV.8. Nombre total des sous populations T lymphocytaires au niveau des tumeurs induites chez les souris C57BL/6 injectées avec les cellules Hepa.....	45.
Figure IV.9. Nombre total des sous populations T CD8 <sup>+</sup> lymphocytaires au niveau des ganglions induites chez les souris C57BL/6 injectées avec les cellules Hepa	47.
Figure IV.10. Nombre total de la sous population T CD4 <sup>+</sup> lymphocytaire au niveau des ganglions induite chez les souris C57BL/6 injectées avec les cellules Hepa.	48.
Figure IV.11 Stratégie de sélection des populations leucocytaires.....	49.

Figure IV.12. Profil des populations leucocytaires au niveau de la tumeur et des ganglions.....	50.
Figure IV.13. Nombre total des leucocytes au niveau des tumeurs induites chez les souris C57BL/6 injectées avec les cellules tumorales Hepa.....	51.
Figure IV.14. Nombre total des cellules NK et des macrophages au niveau des ganglions drainants de souris C57BL/6 injectées avec les cellules tumorales Hepa.....	52.
Figure IV.15. Nombre total des lymphocytes (NKT, T et B) recrutés au niveau des ganglions de souris C57BL/6 injectées avec les cellules tumorales Hepa.....	53

## Liste des tableaux

Tableau III.1. Composantes du gel de polyacrylamide-SDS et tampons d'électrophorèse.....	26.
Tableau III. 2. Liste des anticorps utilisés.....	28.
Tableau III.3. Liste des anticorps utilisés pour l'analyse par FACS.....	33.
Tableau IV.1. Tableau récapitulatif des cellules recrutées au niveau des masses tumorales de souris implantées avec les cellules Hepa-vecteur, Hepa-SOCS1 ou Hepa SOCS1R105K.....	54.



## Liste des abréviations

a.a.	Acide aminé
APC	Cellules présentatrices d'antigène
AFP	$\alpha$ -fétoprotéin
ARNm	ARN messenger
BSA	Albumine de sérum bovin
BCLL	Clinique Barcelona-Clinic Liver Cancer
CCPA	Conseil canadien de protection des animaux en science
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CD40L	<i>CD40 ligand</i>
cDNA	ADN complémentaire
CYP2E1	Cytochrome P450 2E1
CMH CI-I	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
c-terminal	Extrémité carboxyl-terminale
CTL	Lymphocyte T cytotoxique
DCs	Cellules dendritiques
DP	Doubles positives
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
ESS	Domaine étendu du sous domaine de SH2
ECL	<i>Enhance Chemiluminescence</i>
EDTA	Éthylène diamine tétra-acétique
FBS	Sérum de veau foetal
GP	Glycoprotéine
GP73	Golgi protein 73
GPC3	Glypican-3
H&E	Hématoxyline et éosine
HBV	Virus de l'hépatite B
HCC	Carcinome hépatocellulaire

HCV	Virus de l'hépatite C
Hepa	Lignée de carcinome hépatocellulaire de souris
HSC	Cellules stellaires du foie
Hepa	Lignée de carcinome hépatocellulaire de souris
H-V	Hepa-Vecteur
H-R	Hepa-R105KSOCS1
H-S	Hepa-SOCS1
IFN- $\gamma$	Interféron-gamma
IHC	Immunohistochimie
IL-6	Interleukine-6
iNOS	oxyde nitrique synthase inductible
kDa	Kilodalton
JAK	Janus Kinase
KCs	Kupffer cells
KIR	Kinase inhibitrice Region
LCMV	Lymphocytic choriomeningitis virus
LSECs	Cellules épithéliales sinusoïdales du foie
LPS	Lipopolysaccharide
M	Macrophage
MRI	Imagerie par résonance magnétique
NALF	Stéatose hépatique non alcoolique
NaCl	Chlorure de sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium
NK	Natural killer
NKT	Natural killer T lymphocytes
NP-40	Nonidet-40
NLS	Nuclear Localization Signal
PA	Acide phosphatidique
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PBST	PBS supplémenté avec Tween-20
PCR	Polymorphism Chain Réaction

PKC	Protéine kinase C
PTP	Protéine tyrosine phosphatase
PVDF	Polyfluorure de vinylidène
PxxP	Région riche en proline
RNA	Acide ribonucléique
ROS	Espèce réactive de l'oxygène
RTK	Récepteur tyrosine kinase
SCID	<i>Severe combined immunodeficiency</i>
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SEM	Erreur standard à la moyenne
SH2	Domaine d'homologie de Src 2
SH3	Domaine d'homologie de Src 3
SOCS	<i>Suppressor of cytokine signaling</i>
shRNA	Petit ARN en tête d'épingle
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TAG-72	Tumor-associated glycoprotein 72
TAP1, 2	Transporteur associé à l'apprêtement de l'antigène 1 et 2
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBST	<i>Tris-suffered saline + Tween20</i>
TGF- $\beta$ 1	<i>Transforming growth factor- bêta 1</i>
Th1	Lymphocyte T <i>helper</i> 1
Th17	Lymphocyte T <i>helper</i> 17
Treg	lymphocytes T régulateurs
T $\gamma\delta$	Lymphocytes T gamma-delta
TGF- $\beta$	Facteur de transformation de croissance
TNF- $\alpha$	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
T reg	Lymphocytes T régulateurs
Tris-HCl	Tris-hydrochlorhydrique
Y	Tyrosine



## Chapitre I : Introduction

### I. LE CARCINOME HEPATOCELLULAIRE

Le carcinome hépatocellulaire (HCC) est un cancer primaire qui touche le foie (Papoulas & Theocharis 2009). Il est plus fréquent que les autres types de cancer du foie tels que le cholangiocarcinome, l'angiosarcome et l'hépatoblastome (Papoulas & Theocharis, 2009).

Le HCC est la troisième cause de décès du cancer dans le monde (Papoulas & Theocharis, 2009). Dans le HCC, les cellules du foie appelées hépatocytes se multiplient de manière non contrôlable et anarchique (Walther & Jain, 2011). Les patients atteints de carcinome hépatocellulaire finissent par avoir une insuffisance hépatique qui peut engendrer une encéphalopathie hépatique (Michalopoulos, 2007), allant jusqu'au comas.

L'incidence du carcinome hépatocellulaire augmente de manière considérable, selon le genre, homme ou femme. Ainsi, selon les statistiques Canadienne récentes (cohorte de 2000-2009), ce cancer affecte plus les hommes que les femmes, avec un taux de 3.2% chez les hommes et de 2.0% chez les femmes (Anon 2013). Cette différence d'incidence du carcinome hépatocellulaire entre les hommes et les femmes s'explique par le fait que l'estrogène contribue à la diminution de l'inflammation (Shi et al. 2014) alors que les hommes ont une production élevée des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 (Naugler et al. 2007).

#### 1. Cellules du foie

Le foie se caractérise par deux types de cellules ; parenchymateuses et non-parenchymateuses dont l'origine et la fonction diffèrent. Les cellules parenchymateuses englobent les hépatocytes qui constituent la plus grande proportion de cellules au niveau du foie. Alors que les cellules non-

parenchymateuses englobent les cellules épithéliales sinusoïdales du foie (LSECs), les cellules stellaires du foie (HSC), les macrophages résidents du foie ou cellules de Kupffer (KCs) ainsi que les cholangiocytes (Alpini et al. 1994) qui secrètent la bile et assurent ses fonctions métaboliques et réparatrices (O'Hara et al. 2013; Damm et al. 2013).

## 2. Fonction du foie

Le foie assure plusieurs rôles essentiels au bon fonctionnement de l'organisme. Parmi ces fonctions, on cite: le stockage des vitamines et des minéraux, la production de coagulateurs du sang, la filtration du sang et l'élimination des substances toxiques (Michalopoulos, 2007). Le foie constitue aussi le carrefour de la circulation sanguine, de part le grand volume du sang qu'il reçoit en vue d'assurer sa filtration de toutes substances toxiques. Ce flux sanguin afférant au niveau du foie, peut aussi ramener des virus ainsi que les cellules métastatiques ayant migré de leur foyer initial.

## 3. Homéostasie de système immunitaire dans le foie

Comme le foie est constamment confronté à des agents toxiques, les cellules immunitaires majoritairement du système immunitaire inné, représentant la première ligne de défense, sont chargées de le protéger (Doherty & O'Farrelly, 2000). La régulation du système immunitaire au niveau du foie est quelque peu particulière (Doherty & O'Farrelly 2000; Schildberg et al. 2015) avec une forte présence des populations de NK et NKT résidentes du foie qui jouent un double rôle dans la prévention et dans la contribution au développement d'une infection ou d'une tumeur (Seki et al. 2000; Doherty & O'Farrelly 2000).

Le mécanisme de défense du foie est assuré par plusieurs cellules immunitaires et non-parenchymateuses du foie, comme les LSECs et les HSC qui permettent le maintien d'une certaine tolérance afin d'éviter le déclenchement de réaction auto-inflammatoire. En effet, la rencontre de l'antigène par les LSECs inhibe l'action inflammatoire des lymphocytes T Helper 1 (Th1) et les lymphocytes T Helper 17 (Th17), en modulant la sécrétion des cytokines inflammatoires qu'elles

secrètent induisant ainsi, la différenciation des lymphocytes T régulateurs (Treg). Une telle modulation affecte aussi la capacité des cellules présentatrices d'antigène (APC) à présenter l'antigène, et donc empêche l'activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> suite à l'engagement des molécules inhibitrice PDL-1 (Schildberg et al. 2015).

L'effet inhibiteur des cellules LECs est amplifié par l'action des HSCs qui exercent aussi un effet suppresseur du système immunitaire, de part leur faible potentiel à présenter l'antigène et leur action immunosuppressive (Schildberg et al. 2015). Cet environnement est quelque peu protecteur d'un éventuel dommage qui pourrait être porté au tissu hépatique. Cependant, dans de telles conditions de tolérance, ce mécanisme favoriserait l'échappement de certains pathogènes à la neutralisation du système immunitaire, ce qui conduirait à une infection persistante (Schildberg et al. 2015). De plus, une balance du microenvironnement cytokinique vers une inflammation activerait les cellules HSCs et altérerait leur phénotype, contribuant ainsi au développement d'une fibrose (Schildberg et al. 2015).

Les cellules immunitaires présentes dans le foie ainsi que les cellules parenchymateuses et non parenchymateuses contribuent aussi à la réparation du tissu hépatique, suite à une lésion. Dans les conditions inflammatoires, les KCs secrètent de l'interleukine-6 (IL-6) qui est une cytokine mitogène impliquée dans le processus de régénération du foie (Forbes & Rosenthal, 2014; Sachdeva et al. 2015). Ces KCs sont aussi responsables, ainsi que les cellules NK, de l'orientation de la réponse immune des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> en réponse immune de type Th1 en réponse au milieu cytokinique pro-inflammatoire, dans lequel les lymphocytes T se trouvent. Ainsi, le foie serait prédisposé à une infection suite à la présence constitutive d'agents pathogènes. D'une part, la forte présence de NK résidentes du foie contribuerait au développement des maladies. D'autre part, l'inflammation conduirait à la suppression du système immunitaire par l'action des LECs. Ces deux éléments confèreraient au foie une plus forte susceptibilité d'être attaqué.

#### 4. Facteurs de risques

Le développement du carcinome hépatocellulaire est influencé par plusieurs facteurs, on peut citer :

- Le virus de l'hépatite B (HBV) et ou C (HCV). Le HCV et le HBV ont la capacité d'intégrer leur génome dans l'ADN de la cellule hôte ce qui induit des lésions au niveau de l'ADN menant au déclenchement d'un processus oncogénique ou même à une inflammation (Moradpour & Blum 2005). En effet, les patients infectés par le virus HCV ou HBV se caractérisent par un dysfonctionnement des cellules NK, la réduction de leur nombre et la réduction du pouvoir cytolytique de leurs cytokines (Sun et al. 2015). L'infection par ces virus, peut engendrer une modulation de l'activité des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> déclenchant un processus inflammatoire (Lee et al. 2010). Cependant, les patients infectés par le HCV, de part le stress oxydatif qui leur est occasionné, semblent être plus susceptibles de contracter le HCC (Moriya et al. 2001; Korenaga et al. 2005). L'incidence du HCC peut être augmentée suite à une infection avec le HBV et est considérablement augmentée si le patient souffre préalablement du diabète (Siegel et Zhu, 2009; Yu et al. 2012; Shlomai et al. 2014).

- La consommation abusive d'alcool constitue aussi un facteur de risque du HCC. En effet, la consommation d'alcool engendre la libération de radicaux libres, par les cellules, au niveau du cytochrome P450 2E1 (CYP2E1). Ces radicaux libres sont capables de promouvoir un stress oxydatif et d'initier un processus de peroxydation (Day & James, 1998; Jimenez-Lopez & Cederbaum, 2005). Ce phénomène crée des instabilités génétiques et des mutations au niveau de certains gènes cibles responsables de l'absorption du fer (Emerit et al. 2001; Jimenez-Lopez & Cederbaum 2005). Par ailleurs, il a été démontré que chez les patients infectés par le HCV la consommation de l'alcool augmente le risque de

développer le HCC (El-Serag 2012).

- La consommation d'aliments mal conservés qui peuvent contenir de l'aflatoxine B1 pourrait contribuer au développement du carcinome hépatocellulaire, en créant des instabilités génomiques (Soini et al. 1996). En particulier, la présence d'aflatoxine conduit à la substitution d'une base G en T sur le codon 249 du suppresseur de tumeur p53 (Soini et al. 1996) et contribue à augmenter les risques d'infection avec le HBV (Soini et al. 1996; El-Serag 2012).

- Le diabète, qui est l'une des causes de Stéatose hépatique non alcoolique (NALF) fait partie des facteurs sensibilisant le HCC. Une corrélation entre le surpoids et le développement du HCC a été rapportée. En effet, le diabète de type 2, induit des modifications épigénétique ( déacétylase des histones) qui touchent les mêmes gènes cibles impliqués dans la voie de signalisation Wnt /*beta*-catenin, impliquée dans le processus de régénération du foie (Tian et al. 2016) ainsi que d'autres agonistes tels que CTNNB1, APC et AXIN. Ces gènes sont susceptibles d'initier le carcinome hépatocellulaire (Papoulas & Theocharis, 2009; Ying & Tao, 2009; Tian et al. 2016). La voie de signalisation wnt/beta catenine est aussi sensible à la forte concentration de glucose. Cette forte concentration de glucose active la voie de signalisation wnt/beta catenine de façon accrue. Ce qui se traduit par une dérégulation du cycle de prolifération et une différenciation des cellules menant au cancer (García-Jiménez et al. 2013). La forte concentration de glucose affecterait négativement le transport ascorbique, ce qui altérerait la fonction immunitaire conduisant à une importante propagation de cellules malignes (García-Jiménez et al. 2013).

Récemment l'obésité a été rapportée comme facteur de risque important dans le développement du HCC via l'induction de l'inflammation dans le foie et via la génération de la peroxydation des lipides (Caldwell et al. 2004; Papoulas & Theocharis, 2009; Ying & Tao, 2009; Tian et al. 2016).

De même, l'insulinémie (Siegel & Zhu, 2009) est susceptible d'accélérer la progression du HCC, de part son effet sur les cytokines mitogènes de prolifération hépatocytaire (Date et al. 2000).

## II. ETIOLOGIE DU CARCINOME HEPATOCELLULAIRE

### 1. Inflammation

Le développement de HCC est invariablement suivi d'une phase longue d'inflammation chronique induite par les facteurs de risque. L'inflammation est enclenchée en réponse à une lésion causée par un ou plusieurs facteurs de risque mentionné(s) ci-dessus. En effet, une telle lésion libère des signaux de dangers qui attirent les KCs au site de la lésion et les activent (Forbes & Rosenthal, 2014; Sachdeva et al. 2015; (Yu et al. 2012). Ainsi, ce microenvironnement inflammatoire recrute plusieurs autres cellules inflammatoires telles que les neutrophiles, les macrophages et les monocytes qui libèrent à leur tour des cytokines comme l'IL-6 et le TNF- $\alpha$ , ayant un effet mitogène qui perpétuent l'inflammation, et attirent encore plus de cellules immuno-inflammatoires en vue de réparer le tissu endommagé (Date et al. 2000; Zimmermann 2004). Le foie a recourt à ce processus inflammatoire suite à quelconques lésions qui touchent le tissu hépatique ou même suite à une hépatectomie afin de restituer une partie manquante du tissu hépatique (Zimmermann 2004; Michalopoulos 2007; Fausto et al. 2006).

Ce processus réparateur prend généralement fin, suite à la restauration du tissu hépatique. Cependant, dans les conditions où les causes d'inflammation persistent (HCV, HBV) ou sont récurrentes (abus de l'alcool), ce processus inflammatoire hépatique se perpétue et rentre dans un cycle (nécrose - régénération). Ce phénomène engendre une réparation aberrante du tissu et s'accompagne de l'abolition de la régénération de l'épithélium. Il en résulte une transformation de la structure cellulaire du foie (Walther & Jain 2011; Forbes & Rosenthal, 2014), de la perte de l'architecture et de l'accumulation de nodules de régénération (Farazi & DePinho 2006). En effet, une équipe de recherche, analysant des marqueurs de surface cellulaire, a démontré que les cellules malignes étaient en fait des cellules de type épithéliales ou des cellules semblables aux cellules souches qui se sont transformées donnant naissance à des hépatoblastomes. De ce fait, les hépatoblastomes expriment les mêmes marqueurs que les cellules hépatiques

souches (CD34, c-kit) ou les cellules épithéliales (CD31), suggérant une contribution de ces deux types de cellules à la pathogenèse de l'hépatoblastome (Fiegel et al. 2004).

Ainsi, l'évolution du cancer du foie commence par une lésion chronique, qui selon le degré de l'inflammation, donne naissance à une fibrose, culmine en une cirrhose et finit par une transformation maligne des hépatocytes en carcinome hépatocellulaire (Forbes & Rosenthal, 2014).

## 2. Instabilités génomiques

Afin de limiter la propagation des cellules tumorales, des gènes suppresseurs de tumeurs sont activés. Ces gènes suppresseurs de tumeurs touchent plusieurs fonctions vitales de la cellule comme la réparation de l'ADN altéré, le contrôle du cycle cellulaire, la transduction du signal et la régulation de l'apoptose. Cependant, il arrive que les gènes suppresseurs de tumeurs subissent des modifications épigénétiques et deviennent réprimés alors que les proto-oncogènes deviennent surexprimés (Herath et al. 2006; Chu et al. 2010). Ce dérèglement conduit à la mise en place d'une transformation des cellules saines en cellules tumorales, aboutissant au développement d'un cancer.

Les mécanismes épigénétiques susceptibles de modifier l'expression d'un gène sont pour la plus part, des mécanismes de méthylation des ilots CpG, via l'insertion de groupement méthyle. Ce mécanisme empêche la fixation des facteurs de transcription aux promoteurs des gènes ce qui abolit la transcription de l'ADN. Ceci est le cas de plusieurs suppresseurs de tumeur qui se retrouvent ainsi hyperméthylés (Nishida et al. 2008)( Herath et al. 2006; Nishida et al. 2008; Um et al. 2011).

Parmi les gènes suppresseurs de tumeurs qui sont touchés par un tel dérèglement, il y a le gène SOCS1. En effet, il a été démontré par des techniques de PCR (Polymorphism Chain Réaction) que le gène SOCS1 est méthylé dans les lignées du carcinome hépatocellulaire humaines (Yoshikawa et al. 2001).

La détection des protéines transcrites par la technique de Northern blot a révélé l'absence d'expression de SOCS1 dans les échantillons cellulaires ayant les deux allèles méthylés (Yoshikawa et al. 2001). Ces résultats confirment l'abolition de la transcription du gène SOCS1 suite à sa méthylation. Il en est de même pour les échantillons de patients atteints de carcinome hépatocellulaire (Yoshikawa et al. 2001). De plus, chez 65% des patients atteints de HCC, SOCS1 a au moins un allèle méthylé (Yoshikawa et al. 2001). Ce pourcentage révèle que le gène SOCS1 pourrait servir d'un biomarqueur qui contribuerait à la détection du carcinome hépatocellulaire chez les patients atteints de ce type de cancer. Ce n'est pas le seul suppresseur de tumeur qui se retrouve réprimé mais ce travail met la lumière sur la contribution de SOCS1 au niveau du carcinome hépatocellulaire.

### **III. DIAGNOSTIQUE ET TRAITEMENTS**

#### **1. Diagnostic**

Les patients atteints de carcinome hépatocellulaire souffrent d'une accumulation de liquide dans le foie et les intestins. Ils présentent un jaunissement de la peau et du blanc des yeux. Ils ont des nausées, de la fièvre et des douleurs abdominales. Ils perdent l'appétit et le poids et sont souvent fatigués.

Pour confirmer qu'il s'agit bien d'un cancer du foie, une échographie, une imagerie par résonance magnétique et des biopsies sont nécessaires afin de confirmer la maladie.

#### **2. Traitements du carcinome hépatocellulaire**

Les patients atteints de carcinome hépatocellulaire peuvent être traités selon un calendrier mis en place par la 'Clinique Barcelona-Clinic Liver Cancer' (BCLL) qui est basée sur les critères de taille et morphologie des tumeurs chez les patients atteints de HCC ainsi que leur l'état de santé (Pons et al. 2005).

Ainsi on distingue trois stades de traitement:

Les patients au **Stade I** ayant un seul nodule de taille inférieure à 2 cm. Ces patients peuvent avoir recours à plusieurs traitements qui dépendent de leur état de santé et du stade évolutif de leur maladie (Pons et al. 2005).

Ainsi les patients atteints du HCC à un stade précoce peuvent avoir recours à une résection avec des chances de guérison allant à 30% (Pons et al. 2005). La transplantation n'est pas toujours possible à cause du manque important de donneurs (Wiesner 2005; Forner et al. 2012).

Néanmoins, ce choix tend à se limiter en fonction de l'évolution du stade. Ainsi, les patients au **Stade II** qui se divise en trois autres stades (précoce, intermédiaire et avancé), peuvent être traités par transplantation et chémo-embolisation. Les traitements chimiques ne durent pas assez dans le corps et ne sont pas assez immunogènes d'où la nécessité de les combiner avec des adjuvants (Date et al. 2000; Shen et al. 2010; Wang et al. 2013).

Chez les patients au **stade III**, les traitements sont plus tôt de nature palliative (Pons et al. 2005) d'où la nécessité d'explorer d'autres stratégies, comme l'immunothérapie.

#### **IV. LA RÉPONSE ANTI-TUMORALE**

La réponse immunitaire est la première ligne de défense de l'organisme. Elle recrute les composants du système immunitaire inné et ceux du système immunitaire adaptatif (requis pour neutraliser un agent pathogène spécifique).

Dans le contexte du foie, la genèse du carcinome hépatocellulaire est initiée suite à la persistance de l'inflammation. Ce dérèglement de la fonction du foie touche aussi bien le mécanisme cellulaire que le mécanisme moléculaire, favorisant ainsi, la mise en place d'une transformation maligne (Um et al. 2011).

## 1. Rôle primordial des lymphocytes T CD8+ dans l'élimination des tumeurs

Dans un contexte inflammatoire, l'émission de signaux de danger active les cellules présentatrices d'antigène (APC), parmi lesquelles les cellules dendritiques (DCs). Ces DCs matures libèrent des cytokines comme l'interféron gamma (INF- $\gamma$ ) en réponse à la reconnaissance des antigènes tumoraux, de manière à neutraliser les cellules cibles (Nicchitta 2003; Bose & Baral 2007). Ce qui se traduit par l'augmentation de l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) (Meunier et al. 2005). En effet, la production d' INF- $\gamma$  corrèle avec la réduction de l'angiogenèse tumorale (Meunier et al. 2005). Les cytokines relâchées dans le milieu servent aussi à améliorer l'activité cytolytique des cellules cytotoxiques en vue de lyser les cellules tumorales.

Parmi les cellules cytotoxiques (du système immunitaire inné) recrutées au niveau de la tumeur, on cite:

Les cellules NK (Natural killer) qui contribuent de manière non spécifique à l'éradication des cellules tumorales et ce par l'action des cytokines inflammatoires qu'elles secrètent (Martín-Fontecha et al. 2004; Orange 2008). En effet, la fixation de la molécule NKG2D à son ligand à la surface des cellules infectées, enclenche la libération des granzymes et des perforines et des cytokines inflammatoires comme l'INF- $\gamma$  et TNF- $\alpha$  en vue de lyser la cellule cible (Doherty & O'Farrelly, 2000). Ainsi, il a été reporté que, chez des souris, l'INF- $\gamma$  empêche la formation spontanée des tumeurs ainsi que celles chimiquement induites (Melief, 2008).

Les lymphocytes T $\gamma\delta$  (T gamma delta) sont essentielles à la neutralisation de la croissance tumorale par leur activité cytotoxique médiée par l'action des granules et par l'action de l'INF- $\gamma$ . Ces cellules semblent contribuer à la réparation du tissu hépatique (Doherty & O'Farrelly, 2000).

Les lymphocytes NKT (Natural killer T), leur rôle n'est pas bien élucidé. Par contre, une équipe de recherche a rapporté leur capacité à contribuer de deux manières contradictoires, en activant et en orientant le développement des cellules T CD4<sup>+</sup>

vers un phénotype Th1 et en exerçant une surveillance anti-tumorale par l'action de l'INF- $\gamma$  et l'IL-12, inhibant ainsi, l'action des cellules T par l'intermédiaire des récepteur inhibiteur KIR (Doherty & O'Farrelly, 2000). Ces cellules contribuent à l'évasion du pathogène par le cycle inflammatoire qu'elles initient, contribuant ainsi à la persistance de l'inflammation (Exley & Koziel, 2004).

Une fois les cellules tumorales tuées, elles libèrent les antigènes tumoraux dans le milieu extracellulaire. Les antigènes tumoraux seront internalisés et dégradés en petits fragments peptidiques par les DCs qui migrent vers les ganglions drainants et présentent ces fragments peptidiques aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques. Ces cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques activées migrent à leur tour au site de la tumeur afin de lyser les cellules tumorales (Hiroishi et al. 2010; Harimoto et al. 2013). De ce fait la réponse des lymphocytes T cytotoxiques est considérée comme la clé de l'élimination des tumeurs.

Les lymphocytes Th1 (T Helper 1) contribuent aussi à la réduction de la masse tumorale et son élimination, via leur action pro-inflammatoire conférée par la multitude de cytokines inflammatoires qu'elles libèrent dans le milieu et qui ont pour conséquence de changer le microenvironnement tumoral dans lequel baigne d'autres cellules immunitaires (Martín-Fontecha et al. 2004; Budhu et al. 2006; Swann & Smyth 2007; Quail & Joyce 2013). En effet, un microenvironnement cytokinique pro-inflammatoire est susceptible d'orienter la différenciation des sous populations de macrophages, en macrophages de type M1, dérégulant ainsi la balance entre les macrophages M1 anti-tumoraux, qui contribuent à la neutralisation de l'expansion tumorale et M2 pro-tumoraux, qui contribuent à l'expansion voire l'évasion tumorale (Biswas & Mantovani, 2010; Quail & Joyce, 2013).

L'infiltration du tissu tumoral avec toutes ces cellules immunitaires indique un pronostic en faveur de l'éradication des cellules tumorales (Quail & Joyce, 2013).

## 2. Théorie d'échappement à l'immuno-surveillance tumorale

L'immunosurveillance exercée par le système immunitaire passe par trois phases essentielles (Figure I.1) :

**La phase de l'élimination** au cours de laquelle, les cellules des systèmes immunitaires inné et adaptatif (macrophages type M1, NK, NKT, T CD8+, Th1), auraient réussi à neutraliser l'expansion tumorale et à éliminer complètement les cellules tumorales (Kim et al. 2007; Swann & Smyth, 2007; Quail & Joyce, 2013). Cependant, il arrive que le système immunitaire ne parvienne pas à éliminer la tumeur en raison des différentes stratégies que les cellules tumorales auraient développées, afin de contourner l'action du système immunitaire, comme la diminution de l'expression des molécules de CMH à la surface des cellules tumorales (Kim et al. 2007; Quail & Joyce 2013).

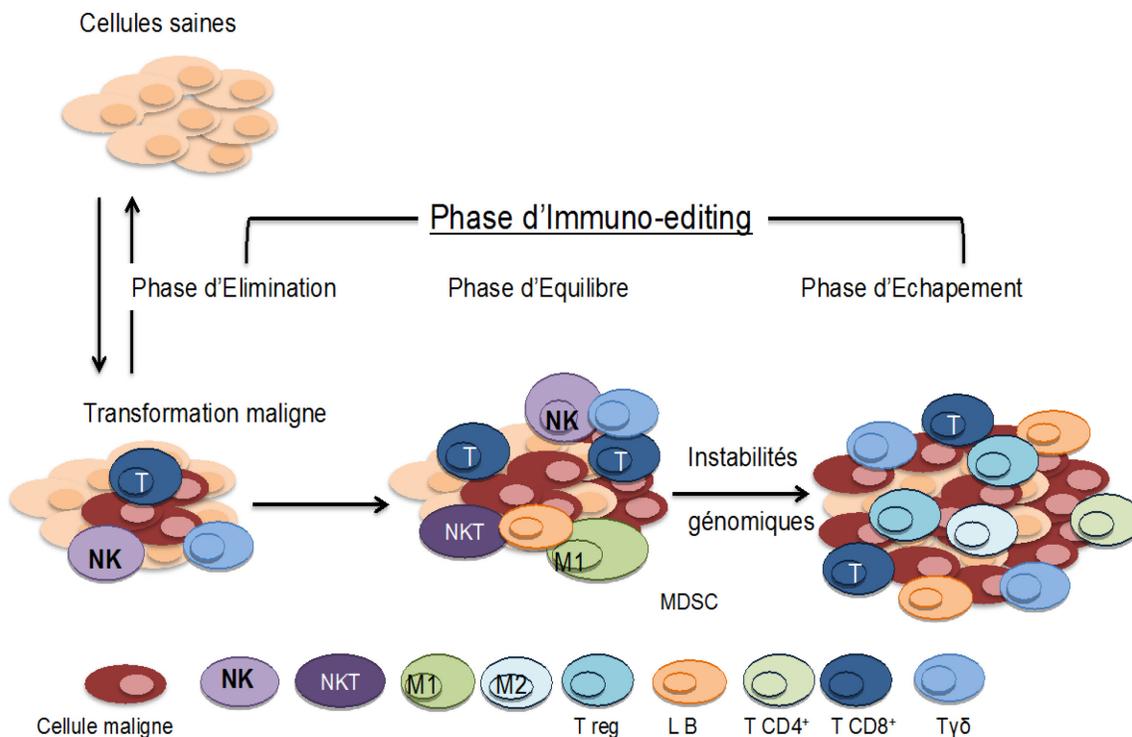
Les cellules tumorales qui ont pu échapper à la lyse par les cellules immunitaires, rentrent dès lors dans une **phase d'équilibre** (Kim, 2007; Quail & Joyce 2013; Chen & Mellman 2013). Au cours de ce processus, les cellules tumorales vont être éditées, suite à l'accumulation des mutations ainsi qu'à l'émergence de nouveaux variants. Ceci leur permettra d'être moins immunogènes et non reconnaissables par le système immunitaire (Kim et al. 2007). Cette phase a aussi pour caractéristique de sélectionner les cellules tumorales les plus virulentes en n'épargnant que les cellules qui ont pu être éditées (Kim et al. 2007) ce qui conduit à la troisième phase, au cours de laquelle, les cellules tumorales auront développé des stratégies leur permettant de s'échapper à l'action du système immunitaire. Dans cette phase, il y a augmentation des molécules inhibitrices CTLA-4 à la surface des cellules tumorales qui induisent l'anergie des cellules T (Kim et al. 2007; Quail & Joyce, 2013) et recrutement des cellules suppressives T régulatrices (Treg) ainsi que les molécules immunomodulatrices que les cellules Treg secrètent au niveau du microenvironnement tumoral (Kim et al. 2007). Le TGF- $\beta$  (facteur de transformation de croissance) et l'IL-10 produites par les Treg suppriment l'activation et la prolifération des cellules T, en réprimant

les signaux de co-stimulation entre les cellules T et les DCs (Chen & Mellman, 2013; Kim et al. 2007; Quail & Joyce, 2013)

En effet, il a été rapporté que les patients atteints de HCC, se caractérisent par une infiltration réduite des lymphocytes  $T\gamma\delta$  associée à une dérégulation de la sécrétion d'INF- $\gamma$  en réponse à l'action des cytokines immunosuppressives émises par les Treg (Yi et al. 2013).

Il a été aussi montré que les cellules (NK, NKT, Th1) ayant la capacité d'éliminer les cellules tumorales pourraient aussi être associées à un mauvais pronostic en dérégulant la balance de l'environnement cytokinique, ce qui résulte en une augmentation de l'inflammation (Budhu et al. 2006; Chew et al. 2010).

Ces tumeurs finissent par devenir résistantes et prolifèrent de façon aberrante. De part, le milieu inflammatoire qu'elles accentuent, ces cellules immunitaires pro-inflammatoires contribuent au processus d'évasion des cellules tumorales et à leur dissémination dans d'autres organes (Budhu et al. 2006; Chew et al. 2010).



**Figure I.1: les trois phases de l'échappement de la tumeur à l'action du système immunitaire.**

Dans un contexte tumoral, le système immunitaire exerce une immunosurveillance tumorale. Dans ces conditions, deux cas de figures se présentent. Le premier représenterait le cas où le système immunitaire aurait réussi à neutraliser la croissance tumorale et aurait fini par éliminer toutes les cellules anormales transformées. Alors que, le deuxième cas de figure représenterait une incompétence à lyser toutes les cellules malignes. Les cellules tumorales entrent en phase d'immuno-édition où elles se reprogramment afin d'acquérir de nouvelles caractéristiques phénotypiques qui leur permettent de s'échapper et de croître de façon aberrante.

## V. ROLES DE SOCS1

Le gène SOCS1 « suppressor of cytokine signaling 1 » est un suppresseur de tumeur qui est méthylé au niveau de plusieurs cancers (Sasi et al. 2014), suite à des mécanismes d'altérations épigénétiques menant à l'insertion de groupements méthyles sur les îlots CpG (Yoshikawa et al. 2001). Quand il n'est pas méthylé, le gène SOCS1 code pour une protéine SOCS1 de 24 KDa.

Cette protéine a été initialement découverte en 1997 par trois équipes de recherche (Starr et al. 1997; Endo et al. 1997; T Naka et al. 1997).

## 1. Structure

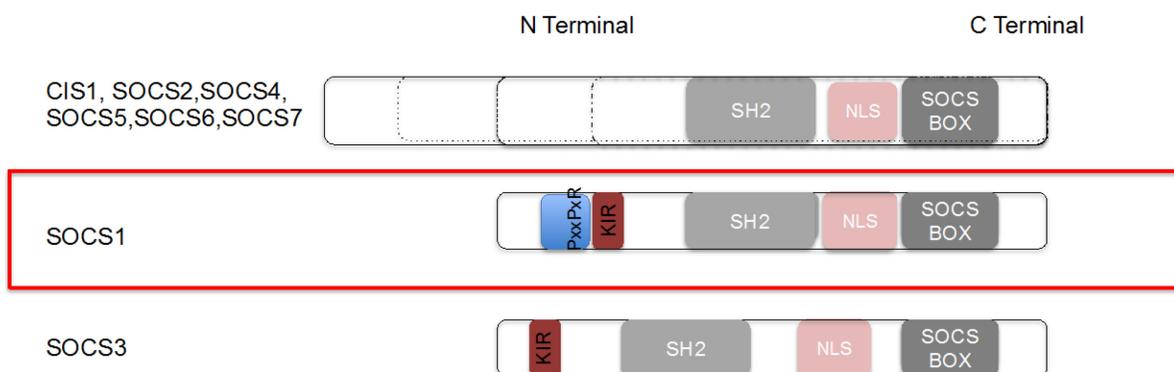
La protéine SOCS1 dérive d'une famille de protéines qui comprend 8 membres (à savoir les protéines CIS1, SOCS1, SOCS2, SOCS3, SOCS4, SOCS5 et SOCS6, SOCS7) (Figure I.2). Au fil du temps, cette protéine a porté différentes appellations et ceci selon les fonctions qu'elle accomplit: JAB : JAK Binding Protein; CIS1 : Cytokine-Inducible SH2-containing; TIP3 Tec Interacting Protein3; CISH1; SSI-1 STAT-Induced STAT Inhibitor 1; SOCS-1 (Tetsuji Naka et al. 1997; Starr et al. 2009).

Toutes les protéines de la famille SOCS possèdent un domaine SRC "homology 2 domaines (SH2)" qui réprime la signalisation cellulaire des cytokines inflammatoires, via la liaison des motifs tyrosines (Tetsuji Naka et al. 1997; Starr et al. 2009). Ce processus permet la régulation de la croissance et la prolifération cellulaire de manière négative. Les protéines SOCS1 et SOCS3, à elles seules, expriment une région kinase inhibitrice ou (KIR) du côté N-terminal, responsable du contrôle de la signalisation cellulaire. Comme le domaine SH2, le domaine SOCS Box, localisé du côté C-terminal, est lui aussi un domaine conservé chez tous les membres de la famille des protéines SOCS (Ilangumaran & Rottapel 2003) (Figure I.2).

Le domaine SOCS Box permet l'assemblage d'un complexe ubiquitine ligase 3 permettant l'ubiquitination des protéines à dégrader, via le protéasome (Ilangumaran & Rottapel 2003) (Figure I.2).

Deux motifs di-proline, de classe 1 (PxxPxR) et de classe 2 (RPxPxxP), qui se retrouvent dans la partie N-terminale de SOCS1, sont requis pour la liaison de haute affinité des protéines adaptatrices avec les domaines SH3 (Src Homology 3) (De Sepulveda et al. 1999).

Une séquence NLS (Nuclear Localization Signal), comme son nom l'indique, permet la translocation nucléaire (Baetz et *al.* 2008), ou cytoplasmique. Ceci permet à la protéine SOCS1, induite en réponse à l'activation de la voie de signalisation cytokinique JAK-STAT, de réguler cette voie de signalisation (Koelsche et *al.* 2009) (Figure I.2).



**Figure I.2 Structure des protéines de la famille SOCS.**

La famille des protéines comprend 8 membres nommés SOCS1-7 et CIS. Tous les membres de la famille de SOCS possèdent deux domaines conservés SH2 et SOCS Box. Seules les protéines SOCS1 et SOCS3 possèdent en plus une région KIR. La longueur du domaine N terminal est variable entre les membres de la famille de protéines SOCS.

## 2. Implication dans le système immunitaire

Il a été démontré que le gène SOCS1 contribue au développement et à la différenciation de plusieurs cellules, en régulant négativement les cytokines inflammatoires qu'elles secrètent (Yoshimura et *al.* 2003). SOCS1 régule la voie de signalisation des TLR communes pour plusieurs cellules du système immunitaire (Kinjyo et *al.* 2002; Hanada et *al.* 2003). En effet, la stimulation avec le lipopolysaccharide (LPS) induit la sécrétion de l'INF- $\gamma$  chez les cellules dendritiques (Zhang et *al.* 2012), les macrophages, les cellules NK et les lymphocytes T (Schluns & Lefrançois 2003). La protéine SOCS1 intervient aussi dans plusieurs processus, lors de la différenciation des sous populations de cellules dendritiques et dans la régulation de leur aptitude à présenter l'antigène

ainsi que leur capacité à maintenir la tolérance du soi (Evel-Kabler et al. 2006). La protéine SOCS1 participe aussi au développement des lymphocytes T, très tôt dans le thymus, au cours de la sélection positive des populations T doubles positive (DP) (Catlett & Hedrick 2005). Il a aussi été reporté qu'une déficience pour le gène SOCS1 chez les cellules T DP favoriserait une différenciation vers un phénotype T CD8<sup>+</sup> mémoire (Palmer & Restifo 2009). Ceci vient en répercussion de l'expression élevée de l'INF- $\gamma$  requis pour la génération des cellules mémoires (Shen et al. 2004; Palmer & Restifo 2009).

La protéine SOCS1 régule négativement chacune des sous populations de type Th1 et Th2, en modulant la production soit INF- $\gamma$  ou l'interleukine-4 (IL-4). Ceci se réalise en fonction des niveaux d'expression des deux différentes cytokines (INF- $\gamma$ , IL-4) ce qui permet la différenciation des cellules T en Th1 ou Th2 (Ilangumaran, Ramanathan, Rottapel, et al. 2004). SOCS1 régule d'autres sous types de population T, en réprimant l'effet de l'IL-6, ainsi que l'effet du TGF- $\beta$  chez les cellules Th17 et l'effet de l'IL-10 chez les cellules T régulatrices (Yoshimura et al. 2007).

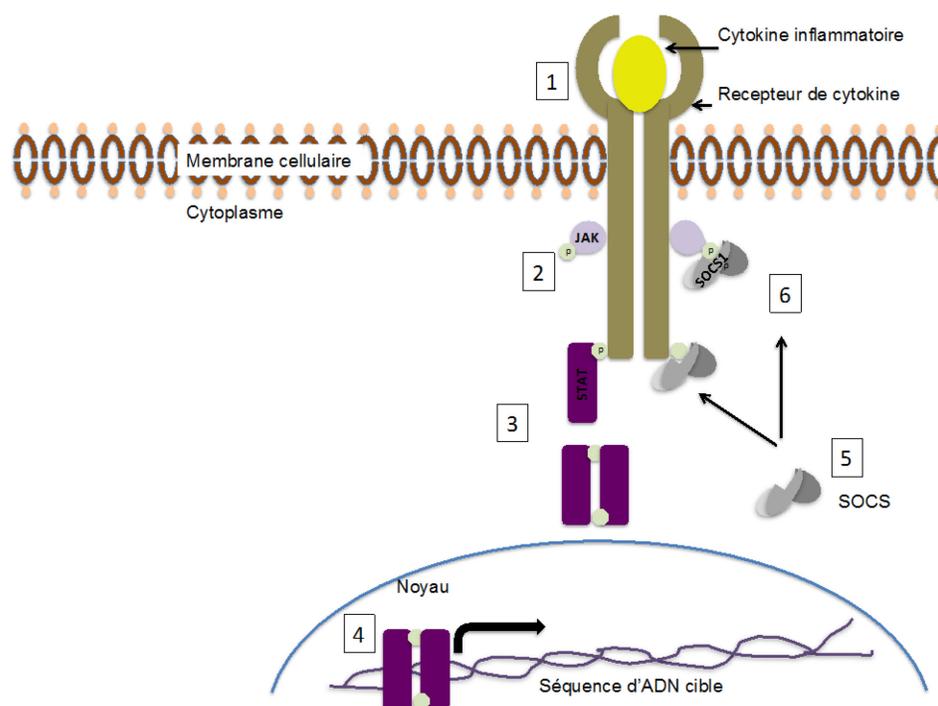
### 3. Rôle de suppresseur de tumeur

De part ses fonctions, le SOCS1 est considéré comme un suppresseur de tumeur en particulier, par sa capacité à réprimer la signalisation des cytokines à effet mitogène dans le processus de la régénération du foie (Gui et al. 2015). En effet, la fixation d'une cytokine inflammatoire (Tetsuji Naka et al. 1997; Starr et al. 2009) ou d'une hormone de croissance (Ram & Waxman, 1999) à son récepteur se traduit par la phosphorylation des molécules JAKs qui phosphorylent à leur tour le domaine cytoplasmique du récepteur, créant ainsi un site de recrutement pour les protéines de signalisation STAT et induisant leur phosphorylation (Tetsuji Naka et al. 1997; Trengove & Ward 2013). La phosphorylation des STATs conduit à la formation de dimères et à leur translocation au niveau des promoteurs des gènes

cibles. Parmi ceux-ci on retrouve SOCS1 dont l'expression permet l'établissement d'une boucle de rétrocontrôle négatif.

Une fois que le gène SOCS1 est transcrit et traduit, il donne naissance à une protéine SOCS1 (Tregrove & Ward 2013). La protéine SOCS1 est alors transloquée du noyau au cytoplasme, afin d'exercer ses fonctions suppressives.

Le domaine étendu de SH2 ainsi que la région KIR de la protéine SOCS1 reconnaissent des motifs tyrosine phosphorylés qui leur permettent de se lier au substrat, induisant ainsi l'inhibition de la phosphorylation de JAK (Endo et al. 1997)

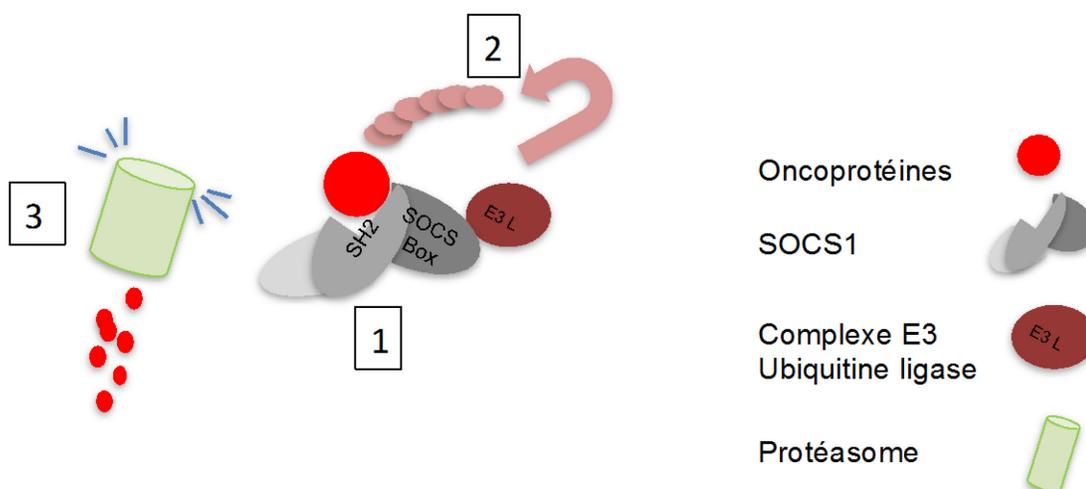


**Figure I.3 Rôle suppresseur de SOCS1, via la répression de la signalisation des cytokines inflammatoires.**

(1) La fixation d'une cytokine inflammatoire ou une hormone de croissance à son récepteur déclenche l'activation d'une cascade de phosphorylations (2,3) menant à la transcription des gènes des protéines SOCS (4) qui vont exercer un rétrocontrôle négatif (5) aboutissant à la répression d'une voie de signalisation donnée (6).

Le domaine SH2 du SOCS1, quant à lui exerce une inhibition compétitive avec les molécules STATs afin de se lier aux motifs tyrosines phosphorylés du récepteur activé et d'arrêter ainsi la voie de signalisation de manière à exercer un rétrocontrôle négatif (Figure I.3).

Le SOCS1 exerce aussi un rôle répresseur de tumeur via son domaine SOCS Box impliqué dans la dégradation des protéines (Piessevaux et *al.* 2008). Une fois le substrat fixé par les deux domaines KIR et stabilisé par le domaine étendu du sous domaine de SH2 (ESS), le domaine SOCS Box de la protéine localisé du côté C terminal recrute l'élongine C qui recrute l'élongine B. Ceci stabilise davantage le substrat fixé qui peut lier deux autres éléments à savoir la Culline 5 et le Rbx (Kohroki et al. 2005). Ce groupement forme donc une enzyme 3 Ub ligase dont le but est de permettre le transfert de l'ubiquitine sur le groupe amine d'une lysine du substrat. Ces groupements ubiquitines donnent un signal au protéasome afin de dégrader la protéine (Figure I.4). Ainsi, ce système permet l'internalisation et la dégradation de plusieurs protéines dont p65/RelA (Ryo et al. 2003), ainsi que plusieurs oncoprotéines comme le VAV1 (Sepulveda et al. 2000), JAK2 (Kamizono et al. 2001), TEL-JAK2 (Kamizono et al. 2001) et MET (Gui et al. 2015), P21 (Yeganeh et al. 2016) dont la dérégulation est impliquée dans la croissance tumorale. De ce fait, SOCS1 peut réguler la croissance tumorale via la dégradation de ces oncoprotéines.



**Figure I.4. Rôle de SOCS1 comme suppresseur via l'ubiquitination des substrats la signalisation des cytokines inflammatoires.**

La fixation d'un substrat au domaine SH2 ou à un autre domaine du côté N terminal (1) induit le recrutement de plusieurs autres élongines par le domaine SOCS Box, afin de stabiliser encore plus cette liaison (2). Ces élongines recrutent encore plus d'éléments afin de former un complexe E3 ubiquitine ligase dont la fonction consiste à insérer des groupements ubiquitines à des endroits bien spécifiques du substrat, ce qui permet ainsi le déclenchement d'un processus de dégradation, via le protéasome (3).

#### 4. Le devenir des peptides dégradés

Les protéines SOCS1 sont capables de reconnaître les protéines tumorales qu'elles dégradent via le processus d'ubiquitination. Il existe deux types d'antigènes tumoraux qui peuvent être produits par les cellules tumorales.

Des antigènes spécifiques de la tumeur, comme l'expression de nouveaux peptides par exemple l' $\alpha$ -fétoprotéin (AFP) et le glypican-3 (GPC3) qui est impliqué dans une activation accrue de la voie de signalisation Wnt (Fujiyama et al. 2001). Des antigènes associés aux tumeurs qui peuvent être exprimés par plusieurs autres cancers, comme la Golgi protein 73 (GP73) ou encore le tumor-associated glycoprotein 72 (TAG-72) (Fujiyama et al. 2001).

Les oncoprotéines ubiquitinées vont être fragmentées par le protéasome pour générer des fragments peptidiques reconnaissables par les cellules T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques, via un processus de présentation de l'antigène.

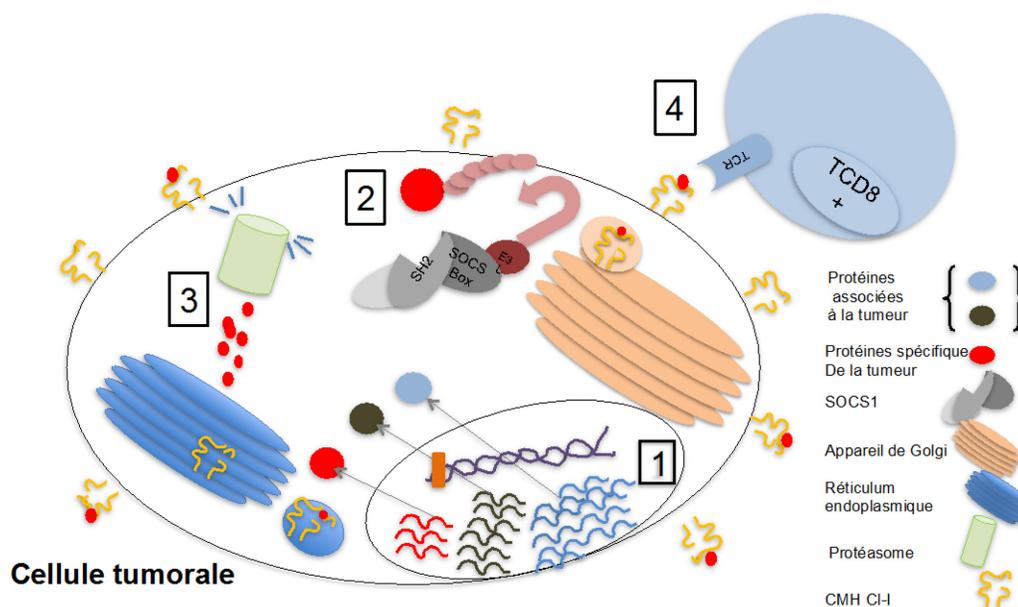
Le gène codant pour la protéine SOCS1 est fréquemment réprimé dans le HCC, ce qui lui suggère un rôle de suppresseur de tumeur dans le foie. Pour comprendre les mécanismes sous-jacents, notre laboratoire a généré 3 types de lignées cellulaires stables dérivées de la lignée cellulaire de carcinome hépatocellulaire de souris Hepa1-6, une portant un vecteur vide, une exprimant le type sauvage du gène SOCS1 (SOCS1-WT, Hepa-SOCS1, Hepa-S) et une portant une mutation au niveau du domaine SH2 (Hepa-R105KSOCS1, Hepa-R). Ce mutant ne peut plus inhiber la signalisation des cytokines alors que les cellules tumorales Hepa ayant le type sauvage de SOCS1 sont capables d'inhiber la signalisation des cytokines pro-inflammatoires.

Les résultats non-publiés de notre laboratoire montrent que lors de l'implantation sous-cutanée des cellules tumorales Hepa1-6, modifiées, chez des souris C57BL/6, et NOD.scid.gamma (NSG), les cellules Hepa1-6, exprimant le vecteur contrôle (Hepa-V), formaient de grosses tumeurs tandis que les cellules Hepa-SOCS1 formaient de petites tumeurs chez les deux types de souris. Les cellules Hepa-R105KSOCS1 quant à elles, formaient de grosses tumeurs seulement chez les souris immunodéficientes, NSG, mais montraient une croissance nettement retardée lorsqu'elles sont greffées aux souris (C57BL/6) immunocompétentes. Partant de ces résultats, nous suggérons que SOCS1 favorise l'immunogénicité des cellules tumorales, qui est masquée par la capacité de SOCS1 à inhiber la signalisation des facteurs de croissance. Par conséquent, les cellules Hepa-R105KSOCS1 offrent une occasion unique d'étudier le potentiel pro-immunogène de SOCS1. Le but de cette étude est d'élucider les fonctions immunogènes de SOCS1 dans le cancer du foie.

## Chapitre II. Hypothèse/problématique

Une cellule sujette à une transformation maligne se caractérise par une production de protéines anormales qui peuvent être des protéines associées à la tumeur (tumor-associated antigens) ou des protéines spécifiques de la tumeur (tumor-specific antigens). La restauration de SOCS1 au niveau de ces cellules tumorales augmenterait la fixation des protéines spécifiques à la tumeur, et leur ubiquitination, via le domaine SOCS Box, ce qui permettrait au protéasome de les reconnaître et de les dégrader en peptides. Par la suite, ces peptides vont être transportés par les Transporteurs associés à l'apprêtement de l'antigène 1 et 2 (TAP1 et TAP2) au niveau du réticulum endoplasmique et seront apprêtées sur les molécules de CMH. Les molécules de CMH chargées avec les peptides migrent vers l'appareil de Golgi et seront apprêtées. Ceci augmenterait la reconnaissance des cellules tumorales par les lymphocytes T cytotoxiques qui peuvent ainsi les lyser.

Mon projet s'intéresse à la capacité de la protéine SOCS1 à promouvoir l'immunogénicité de la tumeur en facilitant la dégradation des antigènes tumoraux en peptides et leur présentation aux cellules T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques (Figure II.1)



### Figure II.1 Rôle immunogène pour la protéine SOCS1?

Une transformation maligne d'une cellule conduit à la synthèse de protéines associées à la tumeur ou spécifique à la tumeur (1) qui vont être reconnues et ubiquitinées par la protéine SOCS1 (2). De petits fragments peptidiques seront générés par le biais de la dégradation protéasomale (3). Ces fragments seront par la suite apprêtés sur les molécules de CMH CI-I ce qui permettra la reconnaissance des cellules cibles et leur élimination par les cellules T CD8<sup>+</sup>.

### Objectifs

L'objectif de ce mémoire est de démontrer le rôle de SOCS1 dans l'immunogénicité de la tumeur.

Les objectifs spécifiques sont ;

1. Définir le rôle de SOCS1 dans la croissance des hépatocarcinomes chez les souris immunocompétentes et immunodéficientes (par mesure de la croissance tumorale et par histochimie).
2. Identifier la (les) population(s) de leucocytes recrutée(s) au niveau des tumeurs, et des ganglions drainants et non drainants des souris C57BL/6 implantées avec les cellules tumorales Hepa et ses variants.

## Chapitre III : MATERIEL ET METHODES

### 1. Lignées cellulaires

Dans ce travail, nous avons utilisés la lignée tumorale de cellules de carcinome hépatocellulaire Hepa1-6 (achetée de la compagnie ATCC), qui dérive des souris C57L/B6. Les cellules Hepa 1-6 ont été transfectées, en utilisant 3 constructions lentivirales produites dans notre laboratoire (Gui et al. 2011) afin de générer trois types cellulaires stables: Hepa-SOCS1, Hepa- SOCS1R105K et Hepa-Vecteur.

- Hepa-SOCS1 porte la copie du gène SOCS1 sauvage.
- Hepa-SOCS1R105K porte une mutation au niveau de la position 105 du domaine SRC Homologie 2. Cette mutation conduit à une substitution de l'arginine par la lysine dans le motif FLVRES du domaine SH2 de SOCS1, ce qui abolit l'interaction avec les protéines phosphorylées sur des résidus tyrosine (Sepulveda D P et al. 1999).
- Hepa-Vecteur porte un vecteur vide mais exprime le SOCS1 endogène (Gui et al. 2011).

### 2. Culture cellulaire et stimulation avec les cytokines

Les trois types cellulaires générés suite à la transfection des cellules Hepa1-6, à savoir les cellules Hepa-V, Hepa-R105K, Hepa-SOCS1 ont été cultivées dans un milieu DMEM (Eagle's minimal essential medium) tamponné avec du bicarbonate, et supplémenté de pénicilline-streptomycine, glutamine et 5% de sérum bovin foetal (FBS) et maintenue dans un incubateur à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>.

Dans le but de vérifier l'expression de SOCS1 et la modulation de la signalisation des cytokines par SOCS1, les trois types cellulaires ont été cultivés dans des boites de pétri de 60 mm. Lorsque les cellules ont atteint 70-80% de

confluence, elles ont été lavées et incubées dans un milieu réduit en sérum (0.25% FBS). Après 8h de culture en absence de sérum, les cellules ont été stimulées ou non avec l'interleukine 6 (IL-6, 10 ng/ml), pendant 30 minutes, puis le milieu a été aspiré et les cellules lavées avec du PBS froid et lysées avec 200  $\mu$ l de tampon RIPA.

Les lysats cellulaires ont été préparés en ajoutant aux culots de cellules 200 $\mu$ l de tampon RIPA (Radio- immunoprécipitation assay buffer: NaCl 150mM; Tris-HCl pH7.4, 50mM; EDTA 2 mM ; SDS 0.1% ; NL-40 1% ; sodium deoxycholate 0.5%) contenant des inhibiteurs de protéases (PMSF 100mM, aprotinine 10mg/ml, leuprotinine 1mg/ml, pepstatine 1mg/ml, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 150mM, NaF 1mM, glycofosphate 10 mg/ml). Après 5 min de lyse sur glace, les lysats cellulaires ont été recueillis dans des tubes Eppendorf et gardés sur glace ou à 4°C tout au long de l'expérimentation.

Les lysats ont été centrifugés à 20,217 x g pendant 15 min à 4°C et la concentration en protéines des échantillons a été mesurée par la technique de Bradford à l'aide d'une trousse provenant de BioRad et en suivant les instructions du manufacturier.

### 3. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS et immunobuvardage de type Western

Les lysats contenant des quantités égales de protéines ont été dilués dans le tampon d'échantillons SDS-PAGE 6X (tampon Laemmli) afin d'obtenir des lysats avec une concentration finale de 1x (Tris HCl 63mM pH 6.8, glycérol 10%, SDS 2%, 2-mercaptoethanol 0.1%, bromophenol blue 0.0005%). Les échantillons ont été bouillis à 100°C pour une période de 5 min et centrifugés 2 min à 20,217 x g. Les surnageants ont été récoltés et 15-20  $\mu$ g de protéines ont été séparés sur gels SDS-PAGE (gel d'empilage d'acrylamide à 10% et gel de migration d'acrylamide à 4% (Tableau III. 1A, 1B). Les protéines ont été séparées à l'aide d'un appareil

d'électrophorèse BioRad MiniProtean II (Bio-Rad) à 100V pendant 90 min dans le tampon de migration (Tableau III. 1C).

**Tableau III. 1. Constituants du gel de polyacrylamide-SDS et tampons d'électrophorèse**

<b>A) Gel de migration</b>	<b>10%</b>
H <sub>2</sub> O bi-distillée	2ml
30% mix d'acrylamide	1.7ml
1.5M Tris (pH 8.8)	1.3ml
10% SDS	50µl
10% APS	50µl
TEMED	5µl
<b>B) Gel d'empilage</b>	<b>4%</b>
H <sub>2</sub> O bi- distillée	2.7ml
30% mélange d'acrylamide	0.7ml
1M Tris (pH 6.8)	0.5ml
10% SDS	40µl
10% APS	40µl
TEMED	4µl

**Tableau III. 1(suite). Constituants du gel de polyacrylamide-SDS et tampons d'électrophorèse**

<b>C) Tampon de migration</b>	<b>10X</b>
Tris-base	30.3g
Glycérine	144.2g
SDS	10g
Eau bi-distillée	1L
<b>D) Tampon de transfert</b>	<b>10X</b>
Tris-Base	30.3g
Glycérine	144.2g
Eau double distillée	1L
<b>E) Tris-buffered saline (TBS)</b>	<b>10X</b>
Tris	24.2g
NaCl	80
EDTA 0.5M	50ml

Une fois la migration des protéines terminée, les protéines ont été transférées sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF; Roche Diagnostics) pendant 60 min à 115V dans un tampon de transfert (Tableau III. 1D). Après le transfert, la membrane a été lavée dans le tampon TBS (Tris buffered saline, Tableau III. 1E) et incubée 1 heure dans du TBS-T (0.1% Tween-20) contenant 5% de BSA (albumine de sérum bovin) ou de lait en poudre. Cette étape a été suivie de deux lavages de 5 min avec du TBS-T avant d'incuber la membrane avec l'anticorps d'intérêt (Tableau III. 2) dilués dans du TBS-T contenant 5% de BSA ou de lait. Le tout a placé sur une plaque agitatrice pendant une période de 16h à 4°C.

La membrane a ensuite été lavée 3 fois avec du TBS-T, puis incubées avec l'anticorps secondaire (IgG-HRP anti-lapin) pour une période de 1h, à la

température de la pièce. A l'issue de cette seconde incubation, la membrane a été lavée 3 fois, pendant 15 min chacune. La membrane a été par la suite révélée suivant l'addition d'un volume égale de solution A et B de Clarity™ Western ECL Blotting Substrat (BioRad). La lecture a été effectuée à l'aide du Versadoc de BioRad.

**Tableau II. 2. Liste des anticorps utilisés**

<b>Anticorps</b>	<b>Concentration</b>	<b>Poids moléculaire</b>	<b>isotype</b>	<b>compagnie</b>	<b>%du gel</b>
<b>Anti-STAT3 (Y705)</b>	1:1000	92 kDa	Lapin	Cell Signaling	10%
<b>Anti-p-STAT3</b>	1:1000	79/86 kDa	Lapin	Cell Signaling	10%
<b>IgG-HRP anti-lapin</b>	1:5000			GE Healthcare Life Sciences	

#### 4. Modèles animaux

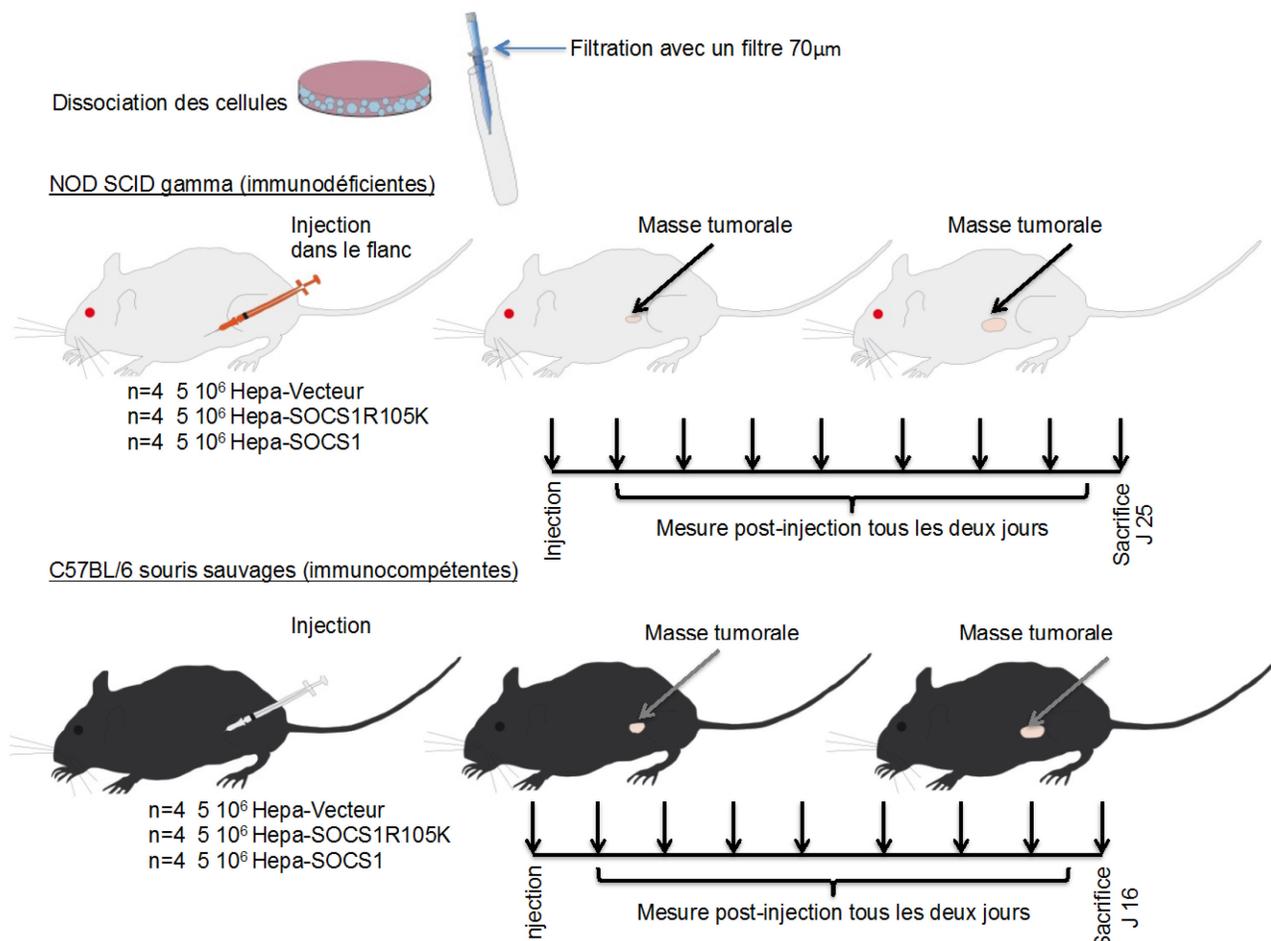
Les expériences utilisant un modèle animal ont été effectuées avec l'approbation du comité d'éthique de l'Université de Sherbrooke. Deux lignées de souris C57BL/6 et NOD.scid.gamma (NSG) ont été achetées de la compagnie Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA) puis hébergées à l'animalerie de la Faculté de médecine et des sciences de la santé de l'Université de Sherbrooke. Seul les males, âgées de 5 à 6 semaines, ont été utilisés dans cette étude.

Nous avons utilisé deux modèles de souris. Les souris NSG qui possèdent deux types de défauts génétiques : la mutation *scid* (*Prkdc<sup>scid</sup>*), qui se caractérise par l'apparition d'un codon stop dans l'ADN causant la terminaison prématurée de

l'adénosine déaminase nécessaire à la réparation de l'ADN doubles brins lors du réarrangement des récepteurs à l'antigène (Fulop et al. 1990). Conséquemment, les souris qui portent cette mutation sont dépourvues de lymphocytes T et B. (Shultz LD, Schweitzer PA, Christianson SW, et al.1995). Le deuxième défaut génétique mène à une perte fonctionnelle de la chaîne gamma du récepteur de l'IL-2. Cette sous-unité est partagée par d'autres récepteurs de la famille du récepteur de l'IL-2, tel que le récepteur de IL-15 qui est essentiel au développement et à l'homéostasie des cellules NK et NKT (Shultz et al. 2005). Conséquemment, les souris NSG ont une perte de l'immunité innée et acquise. Ces souris représentent donc un modèle intéressant pour l'étude de la croissance des cellules tumorales *in vivo*. Nous avons également utilisé les souris C57BL/6, d'où proviennent les cellules hepa1-6 (syngéniques), dans le but de d'étudier le rôle de réponse immunitaire anti-tumorale dans le carcinome hépatocellulaire.

## 5. Croissance tumorale

Afin d'étudier le croissance de cellules Hepa-Vecteur, Hepa-SOCS1 et Hepa-SOCS1R105K chez les souris NSG et C57BL/6, les cellules ont été trypsinées, lavées avec du PBS, comptées, et resuspendues à  $5 \times 10^6$  cellules par ml de PBS. Les suspensions cellulaires ont été filtrées avec un filtre 70 $\mu$ m afin d'enlever les débris cellulaires et 100  $\mu$ l de la suspension cellulaire ont été injectés dans le flanc des souris NSG et C57BL/6 préalablement rasées aux sites d'injection (Figure III. 1).



**Figure III. 1 : Stratégie d'inoculation des cellules tumorales dans le flanc des souris**

Après 4 jours, la croissance tumorale a été mesurée tous les deux jours à l'aide d'un "Vernier Caliper", et ce, pour une période de 25 jours pour les souris NSG et pour une période de 16 jours pour les souris C57BL/6. Le volume tumoral exprimé en mm<sup>3</sup> a été calculé selon la formule suivante :

$$\text{Croissance tumorale} = (\text{largeur}^2 \times \text{longueur}) / 2.$$

## 6. Histochimie

Les souris C57BL/6 implantées avec les trois types cellulaires (Hepa-Vecteur, Hepa-SOCS1R105K et Hepa-SOCS1) ont été sacrifiées deux semaines

post-injection. Les masses tumorales ont été fixées dans une solution de 10% de formaline pendant 48h et les blocs de paraffine ont été préparés. Des coupes de 5µm ont été réalisées à l'aide d'un microtome de type "Leica, RM2235". Les sections ont été colorées avec l'hémoxyline, afin de distinguer les noyaux des cellules (coloration bleue) et avec l'éosine, afin de distinguer le cytoplasme (coloration rose).

## 7. Isolation des lymphocytes infiltrants la tumeur

Les lymphocytes infiltrants la tumeur (TILs, tumor infiltrating lymphocytes) ont été isolés à l'aide de billes Gentle MACS (Milteyi Biotech) en suivant des instructions de fabricant. Brièvement, les masses tumorales provenant des souris C57BL/6 ont été pesées, coupées en petits morceaux de 2 à 4 mm dans du milieu RPMI 1640 ('Roswell Park Memorial Institute 1640), et transférées dans des tubes de type "gentleMACS Tube C", contenant un mélange d'enzymes de digestion dilué dans du RPMI-1640 (2.5ml pour 0.04 -1.5g de tissue).

Les tubes ont été placés dans l'appareil "gentleMACS Dissociator". Le programme m\_impTumor\_02 a été sélectionné et mis en marche pendant 40 min à 37°C sous agitation continue. Subséquemment, le programme m\_impTumor\_03 a été utilisé pour finaliser la procédure de dissociation. Après cette opération, les tubes ont été centrifugés à 300 x g, pendant quelques secondes et les culots cellulaires obtenus ont été resuspendus dans du PBS contenant 2% de FBS. Les suspensions cellulaires obtenues ont été passées dans des filtres de 70 µm. Les filtrats récupérés dans des tubes de 15 ml ont été centrifugés à 300 x g. Les culots cellulaires ont été resuspendus dans 1 ml d'une solution de lyse des érythrocytes d'Ammonium-Chloride-Potassium (ACK, NH<sub>4</sub>Cl 150mM, KHCO<sub>3</sub> 10mM, EDTA 1mM). La lyse a été effectuée sur une période de 1 min. La réaction a été arrêtée en utilisant du PBS contenant 2% de FBS et les cellules ont été récupérées, comptées et ajustées à la concentration de 10<sup>6</sup>/ml dans du PBS contenant 2% de FBS pour l'analyse par cytométrie de flux.

## 8. Isolation des cellules des ganglions

Les ganglions lymphatiques inguinaux, drainants le côté du flanc injecté contenant la tumeur (DLN, draining lymph node) et les ganglions lymphatiques inguinaux non-drainants contrôles (du flanc opposé sans tumeur (NDLN, non-draining lymph node) ont été isolés. Les cellules ont été dissociées dans du PBS contenant 2% de FBS à l'aide de deux lames de microscope. Les suspensions cellulaires ont été centrifugées, les culots ont été resuspendus dans 1ml de PBS contenant 2% de FBS et le décompte cellulaire a été effectué.

## 9. Analyse par cytométrie de flux (FACS)

Les cellules immunitaires présentes au niveau des ganglions et recrutées au niveau des masses tumorales ont été analysées par FACS. À cet effet, une aliquote de cellules a été prélevée et les cellules ont été distribuées dans une plaque de 96 puits ( $0.5 \times 10^6$  cellules/puit). La plaque a été par la suite centrifugée à 300 x g, pendant 5 min à 4°C et incubées avec un des deux mélanges d'anticorps suivants : anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD62L et anti-CD44) ou (anti-CD3, anti-NK1.1, anti-B220, anti-CD11b et anti-Ly6C) à température ambiante et dans le noir pendant 30 min. Le détail des anticorps utilisés est présenté au Tableau III.3. Après 30 min, les cellules ont été lavées avec du PBS, centrifugées et fixées avec 5 % de PFA (paraformaldéhyde) pendant 10 min à température ambiante et à l'obscurité. La plaque a été lavée et les cellules ont été resuspendues dans 100µl de PBS contenant 2% de FBS et placée à 4°C jusqu'à l'analyse par FACS. Les échantillons ont été passés au cytomètre de flux FACS Canto (Becton Dickinson flow cytometry systems, Mississauga, ON, Canada) et les données ont été analysées en utilisant le logiciel FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA) afin de déterminer les fréquences et les nombre totaux des différents types de cellules leucocytaires.

**Tableau III. 3. Liste des Anticorps utilisés pour l'analyse par FACS.**

<b>Anticorps</b>	<b>Fluorochrome</b>	<b>Clone</b>	<b>Compagnie</b>
Anti-CD3	PE-Cy5	145-2C11	eBioscience
Anti-CD8	APC-Cy7	53-6.7	BD Bioscience
Anti-CD4	APC	GK1.5	eBioscience
Anti-CD4	PE	GK1.5	eBioscience
Anti-CD44	FITC	IM7	eBioscience
Anti-CD44	PE-Cy7	IM7	eBioscience*
Anti-CD62L	FITC	MEL-14	eBioscience
Anti-CD62L	APC	MEL-14	ImmunoTools
Anti-CD4	PE	GK1.5	eBioscience
Anti-CD11c	PE	N418	eBioscience
Anti-NK1.1	FITC	PK136	BD Bioscience
Anti-NK1.1	APC	DX5	eBioscience
Anti-B220	APC	RA3-6B2	Biolegend
Anti-B220	PE	14.8	eBioscience
Anti-CD11b	FITC	M1/70	eBioscience
Anti-CD11b	APC	M1/70	eBioscience
Anti-CD11b	PE	M1/70	BioLegend
Anti-GR-1	PerCP	RB6-8C3	BioLegend
Anti-LY6C	Biotin	HK1.4	BioLegend
Anti-STREPTAVIDIN	APC-Cy7		BioLegend

### 10. Analyses statistiques

La croissance des tumeurs et le nombre total de lymphocytes infiltrants les trois groupes de tumeurs ont été comparés en utilisant le logiciel Prism (GraphPad, La Jolla, CA, USA). Le test non paramétrique ONE WAY ANOVA a été utilisé quand il s'agissait d'analyser un seul facteur et le test non paramétrique TWO WAY ANOVA a été utilisé pour analyser plusieurs facteurs.

## Chapitre IV: Résultats

Ce travail comprend deux objectifs : (i) évaluer la croissance des cellules d'hépatocarcinome murin Hepa1-6 exprimant SOCS1 chez des souris immunodéficiences (NOD.scid.gamma, NSG) ainsi que chez les souris immunocompétentes (C57BL/6), et (ii) identifier les populations de leucocytes recrutées au niveau des ganglions drainants et non drainants des souris C57BL/6 implantées avec les cellules tumorales Hepa.

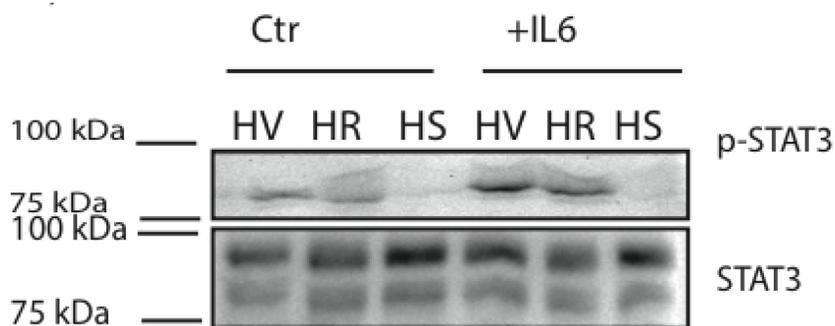
### **I- EVALUER LE RÔLE DE SOCS1 DANS LA CROISSANCE DES HEPATOCARCINOMES CHEZ DES SOURIS IMMUNODEFICIENCES NSG ET IMMUNOCOMPETENTES C57BL/6**

#### 1. Validation des lignées cellulaires utilisées dans ce travail

Dans ce travail, trois types de cellules Hepa 1-6 (Hepa) ont été utilisées, à savoir Hepa-Vecteur, Hepa-SOCS1 et Hepa-R105KSOCS1 qui ont été générées suite à l'infection des cellules Hepa1-6 avec soit un vecteur lentiviral contrôle (Hepa-Vecteur) ou des vecteurs lentiviraux codant les protéines à l'étude (Hepa-SOCS1 et Hepa-R105KSOCS1) (Gui et al. 2011). Les cellules Hepa 1-6 possèdent un gène SOCS1 fonctionnel, mais celui-ci est exprimé de manière inductible, soit suite à une stimulation par des cytokines pro-inflammatoires et des facteurs de croissances (Gui et al. 2011). Cette induction de l'expression de SOCS1 déclenche à son tour un rétrocontrôle négatif dans le but d'atténuer la voie de signalisation des cytokines et des facteurs de croissances (Yoshimura et al. 2007; Trengove & Ward 2013; J U Kazi et al. 2014). Dans notre modèle de travail, les cellules Hepa-Vecteur constituent les cellules contrôles. Les cellules Hepa-R105KSOCS1 expriment un mutant de SOCS1 avec une substitution de l'arginine en lysine à la position 105 du domaine SH2 (SRC homologie domaine 2). Cette mutation abolit la répression de la signalisation des cytokines pro-inflammatoires

et les facteurs de croissances (Sepulveda et al. 2000). Alors que les cellules Hepa-SOCS1 expriment un gène SOCS1 fonctionnel.

Au début de ce travail, la capacité de ces trois types cellulaires (Hepa-Vecteur, Hepa-R105KSOCS1 et Hepa-SOCS1) à répondre aux cytokines inflammatoires a été évaluée. Chacun des trois types cellulaires a été stimulé avec l'interleukine 6 (IL-6) et sa capacité à phosphoryler les protéines STAT3 a été vérifiée. La stimulation avec l'IL-6 induit la phosphorylation des STAT3 chez les cellules Hepa-Vecteur alors que la phosphorylation de STAT3 est réprimée chez les cellules Hepa-SOCS1 (Figure IV.1). Par contre, la phosphorylation induite par l'IL-6 n'est pas inhibée chez les cellules Hepa-R105K. Ainsi, ces résultats valident le système expérimental de cette étude.



**Figure IV.1. Inhibition de la phosphorylation de STAT3 par la protéine SOCS1 mais pas par SOCS1R105K chez les cellules Hepa 1-6.**

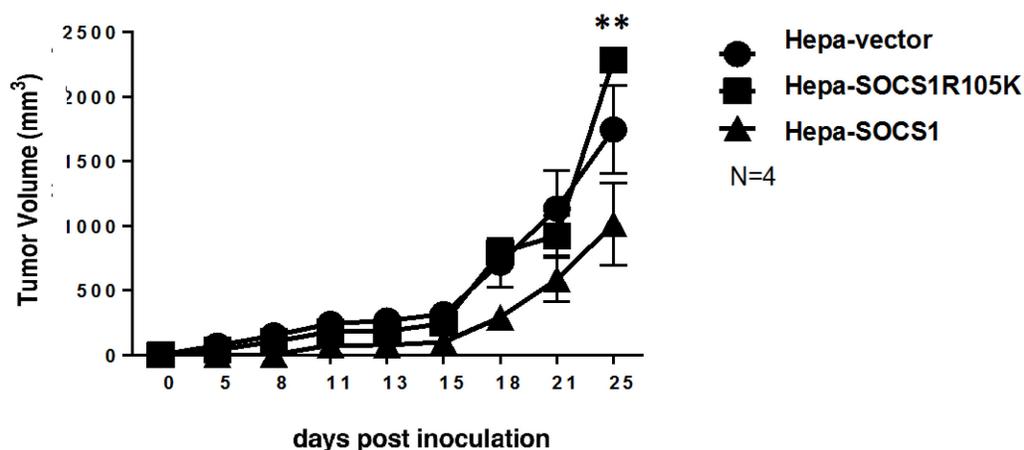
Les cellules Hepa-Vecteur (HV), Hepa-R105KSOCS1 (HR) et Hepa-SOCS1 (HS) ont été privées de sérum pour une durée de 8h. Ensuite, les cellules ont été stimulées ou non avec l'IL-6 (10ng/ml) pendant 30min. Les extraits protéiques ont été préparés et l'expression de pSTAT3 et STAT3 a été analysée par immunobuvardage. Le résultat est représentatif de 3 expériences indépendantes.

## 2. Croissance tumorale chez les souris NOD

Afin d'étudier l'impact de SOCS1 sur modulation de la signalisation des cytokines et des facteurs de croissance in vivo,  $5 \times 10^6$  de cellules de chaque type cellulaire (Hepa-Vecteur, Hepa-R105KSOCS1 et Hepa-SOCS1) ont été injectées en sous-cutané à des souris NOD.scid.gamma (NSG). Ces souris sont dépourvues des acteurs du système

immunitaire adaptatif, alors que les cellules du système immunitaire inné sont dysfonctionnelles. Ceci est dû à la mutation  $Pkdc^{SCID}$  et la déficience en chaîne gamma du récepteur de IL-2, une sous-unité partagée entre plusieurs autres récepteurs de cytokines (Shultz et al. 2005).

La croissance des tumeurs générées a été mesurée, tous les deux jours (Figure IV. 2). Au bout de 25 jours, ou quand le volume mesuré de la tumeur a atteint le point limite de  $2\text{ cm}^3$  chez le groupe injecté avec Hepa-vecteur, les souris ont été sacrifiées, les masses tumorales ont été récoltées et les tissus préparés pour fin d'analyse subséquente. Les résultats indiquent que les cellules Hepa-Vecteur et Hepa-R105KSOCS1 ont une forte croissance tumorale par rapport aux cellules Hepa-SOCS1 chez les souris NSG (Figure IV. 2).

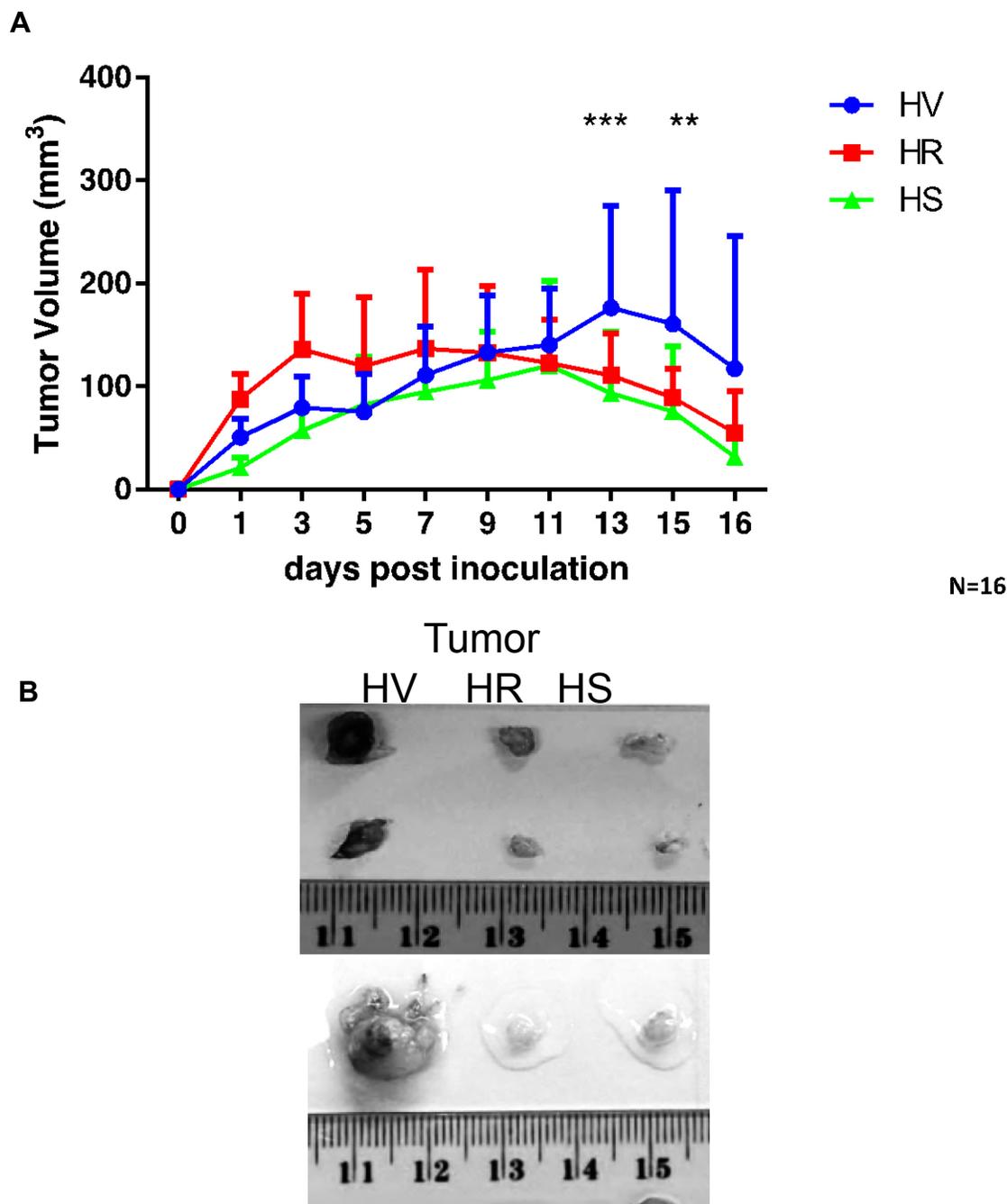


**Figure IV. 2. La croissance tumorale chez les souris NOD.scid.gamma (NSG).**

Les cellules Hepa-Vecteur, Hepa-R105KSOCS1 et Hepa-SOCS1 ont été injectées en sous-cutanés à des souris NSG ( $5 \times 10^6$  cellules/souris ; n=4 souris pour chaque groupe). La croissance tumorale a été mesurée tous les deux jours jusqu'à 25 jours et les volumes tumoraux ont été récoltés. Ainsi, la différence de croissance entre les cellules Hepa-vecteur et celle des Hepa-R105KSOCS1 est non significative alors que la croissance entre les cellules Hepa-vecteur et Hepa-SOCS1 est significative (\*\*  $p < 0.01$ ).

### 3. Croissance tumorale chez les souris C57BL/6

Afin d'étudier le potentiel de SOCS1 à stimuler le système immunitaire contre la tumeur,  $5 \times 10^6$  cellules Hepa-Vecteur, Hepa-R105KSOCS1, Hepa-SOCS1 ont été injectées en sous-cutané à trois groupes de 4 souris syngéniques et immunocompétentes C57BL/6. La croissance des cellules tumorales a été mesurée tous les deux jours. Au bout de 16 jours, les souris ont été sacrifiées et les masses tumorales ont été récoltées pour former des blocs de paraffines et servir à l'analyse histologique. Les résultats montrent une croissance tumorale significativement réduite des cellules Hepa-SOCS1 par rapport au Hepa-Vecteur, chez les souris C57BL/6 (Figure IV. 3. A). Cette croissance est comparable à celle observée chez les souris NSG. Par contre, les cellules Hepa-R105KSOCS1, qui montrent une croissance robuste semblable aux cellules Hepa-Vecteur chez les souris NSG, montrent une croissance intermédiaire entre celle des cellules Hepa-Vecteur et celle des cellules Hepa-SOCS1 chez les souris C57BL/6 (Figure IV. 3. A). La Figure IV. 3. B illustre un exemple des différentes tailles des tumeurs où l'on observe clairement que les cellules Hepa-SOCS1 ont une taille moins importante comparée à celle des cellules Hepa-Vecteur, alors que les cellules Hepa-R105KSOCS1 ont une taille intermédiaire.



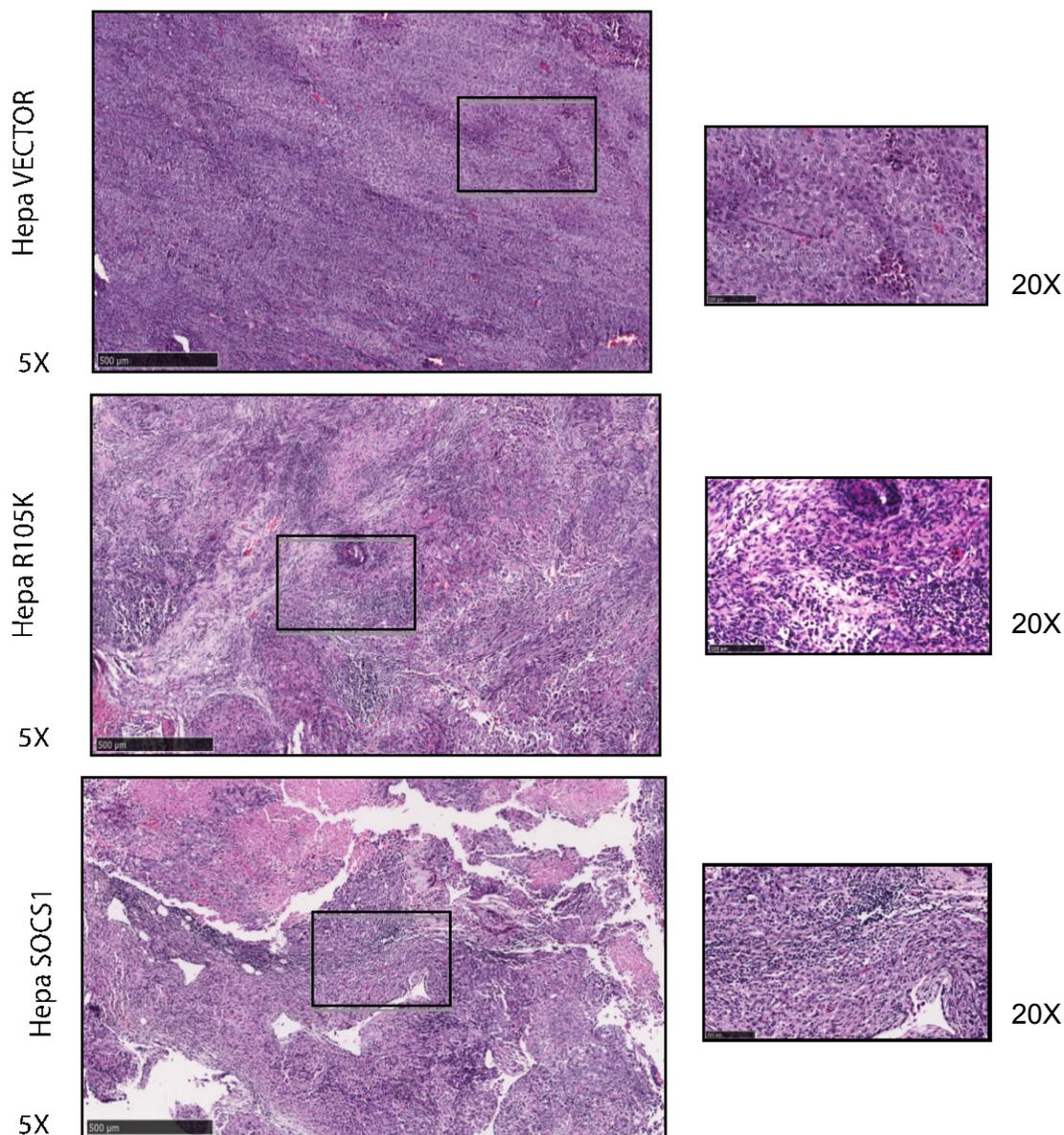
**Figure IV. 3. La croissance tumorale chez les souris C57BL/6.**

Les cellules Hepa-Vecteur, Hepa-R105KSOCs1 et Hepa-SOCs1 ont été injectées en sous cutanés à des souris C57BL/6 ( $5 \times 10^6$  cellules/souris ; n=4 souris dans chaque groupe pour 4 expériences indépendantes rassemblées). (A) La croissance tumorale a été mesurée tous les deux jours jusqu'à 16 jours et les volumes tumoraux ont été calculés et comparés par ONE WAY ANOVA test. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . (B) Photos représentant les trois types de tumeur. (HV) Hepa-vecteur, (HR) Hepa-SOCs1R105K, (HS) Hepa-SOCs1. Les panels de haut et de bas représentent les masses tumorales prélevées des souris de deux groupes différents.

Afin d'étudier la capacité des tumeurs à recruter les cellules immunitaires, les masses tumorales générées suite à l'implantation des souris C57BL/6 avec les cellules Hepa-Vecteur, Hepa-R105KSOCS1 ou Hepa-SOCS1 ont été récoltées et les tissus ont été fixés et enrobés de paraffine. L'analyse des coupes des masses tumorales issues des souris inoculées avec les cellules Hepa-R105KSOCS1 et les cellules Hepa-SOCS1 relève des zones plus fortement colorées qui sont caractérisées par un infiltrat de cellules immunitaires (cellules à noyau prédominant). Ces résultats indiquent que les cellules possédant le SOCS 1 induisent une forte infiltration des cellules mononuclées au niveau de la masse tumorale (Figure IV. 4).

La neutralisation de la croissance tumorale ne semble pas seulement médiée par le domaine SH2 muté mais encore par le domaine SOCS Box qui est resté intact chez les cellules tumorales mutantes Hepa R105KSOCS1.

En effet, ce mutant nous a permis de mettre la lumière sur la fonction du domaine SOCS Box et de distinguer la répression induite en réponse à une ubiquitination (médiée par le domaine SOCS Box), par rapport à la répression de la signalisation des cytokines pro-inflammatoires (médiée par le domaine SH2 de SOCS1).



**Figure IV. 4. Infiltration par les cellules mononucléaires du tissu tumoral des souris C57BL/6 injectées avec les cellules Hepa exprimant SOCS1 ou SOCS1R105K.**

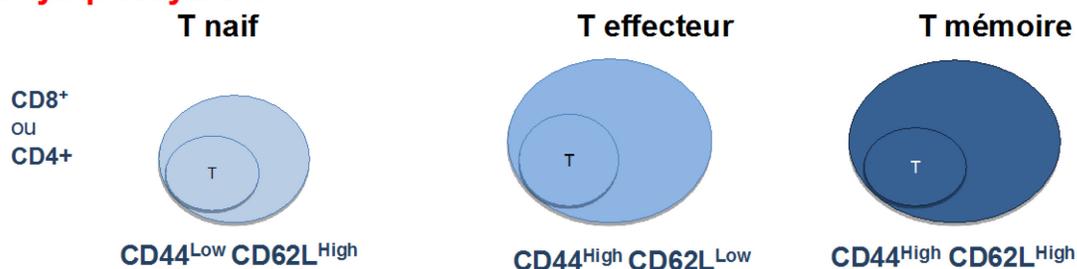
Les souris C57BL/6 inoculées avec Hepa-Vecteur, Hepa-R105KSOCS1 ou Hepa-SOCS1 (4 souris par groupe) ont été sacrifiées le jour 16. Une partie de chaque masse tumorale a été fixée en formaline et enrobée de paraffine. Des coupes de 5 µm d'épaisseur ont été réalisées et colorées à l'hématoxyline et éosine. Les images représentatives des différents tissus tumoraux sont montrées à la magnification 5X (à gauche). Les images de tumeurs Hepa-SOCS1 et Hepa-SOCS1R105K à la magnification 20X (à droite) illustrent l'infiltrat cellulaire.

## II. CARACTERISATION DES LEUCOCYTES RECRUTÉS AU NIVEAU DE LA TUMEUR ET DES GANGLIONS DRAINANTS ET NON DRAINANTS.

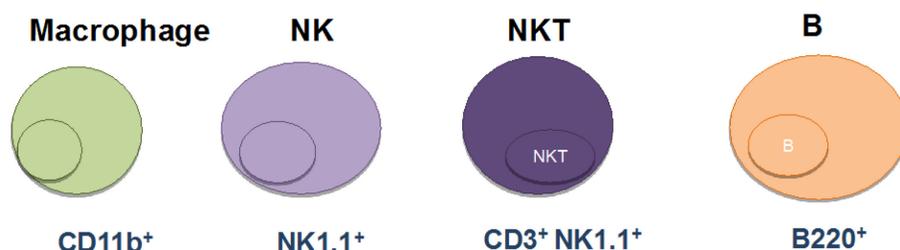
### 1. Caractérisation des cellules lymphocytaires recrutées au niveau de la tumeur et des ganglions drainants et non drainants

Afin d'étudier les populations leucocytaires recrutées au niveau de la tumeur, nous avons isolé les cellules infiltrant la tumeur (TILs) et nous avons procédé à un marquage des antigènes de surface. Pour caractériser les cellules T infiltrant la tumeur ainsi que ceux présents au niveau des ganglions, nous avons utilisé deux mélanges d'anticorps, le premier mélange comprend les anticorps anti-CD4 et anti-CD8 ainsi que des anticorps contre des marqueurs qui caractérisent l'état d'activation des cellules T tels que l'anti-CD44 et l'anti-CD62L. Les sous-populations de cellules T CD8 et T CD4 et leurs sous populations sont définis comme suit : naïves - CD44<sup>Low</sup> CD62L<sup>high</sup>, effectrices - CD44<sup>high</sup> CD62L<sup>Low</sup> et mémoires - CD44<sup>high</sup> CD62L<sup>high</sup>. Pour étudier d'autres populations leucocytaires, le deuxième mélange d'anticorps que nous avons utilisé s'est restreint aux anticorps anti-NK1.1 et anti-CD3 pour identifier la population de cellules NK et NKT, les anticorps contre le marqueur C11b<sup>+</sup> pour les macrophages et contre le marqueur B220<sup>+</sup> pour caractériser la population de lymphocytes B (Figure IV.5). La même stratégie a été utilisée pour étudier les cellules T et d'autres populations leucocytaires au niveau des ganglions drainants (DLN) du côté où la tumeur a été implantée. Les ganglions non-drainants (NDLN) provenant du flanc non injecté ont été utilisés comme contrôle. Un exemple d'identification de sous-populations de cellules T est présenté au niveau de la figure IV.6.

## Les lymphocytes T



## Les leucocytes

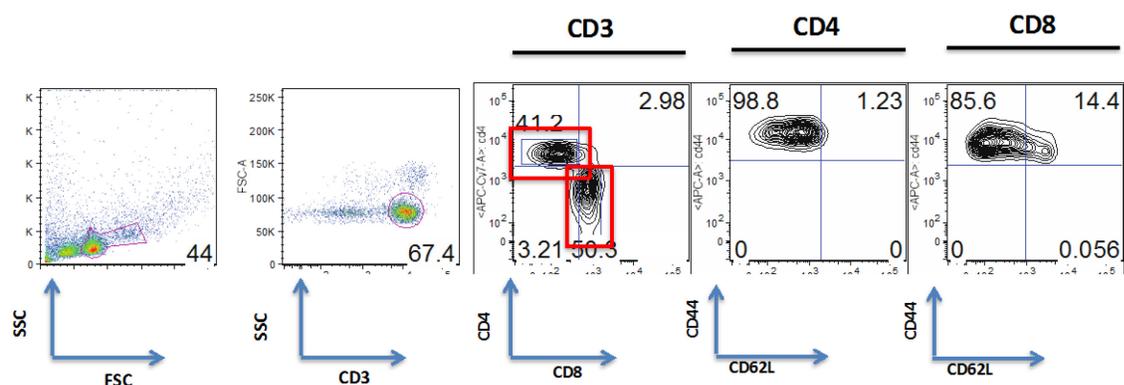


**Figure IV.5. Stratégie d'identification de la population de leucocytes recrutée au niveau des tumeurs et des ganglions.**

Les populations lymphocytaires recrutées au niveau des tumeurs et des ganglions des souris C57BL/6 implantées par les cellules tumorales Hepa (Hepa-Vecteur, Hepa-R105KSOCS1 et Hepa-SOCS1) ont été caractérisées comme suit : à partir des populations T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup>, nous avons classé leurs sous-populations selon le niveau d'expression de CD44 et CD62L : cellules naïves - CD44<sup>Low</sup> CD62L<sup>High</sup> ; cellules effectrices - CD44<sup>High</sup> CD62L<sup>Low</sup> ; cellules mémoires - CD44<sup>High</sup> CD62L<sup>High</sup>. D'autres populations leucocytaires ont été identifiées suivant les marquages avec les anticorps anti- NK1.1<sup>+</sup> et anti-CD3 pour les cellules NK et NKT, le marqueur C11b<sup>+</sup> pour les macrophages et le marqueur B220<sup>+</sup> pour caractériser la population de lymphocytes B.

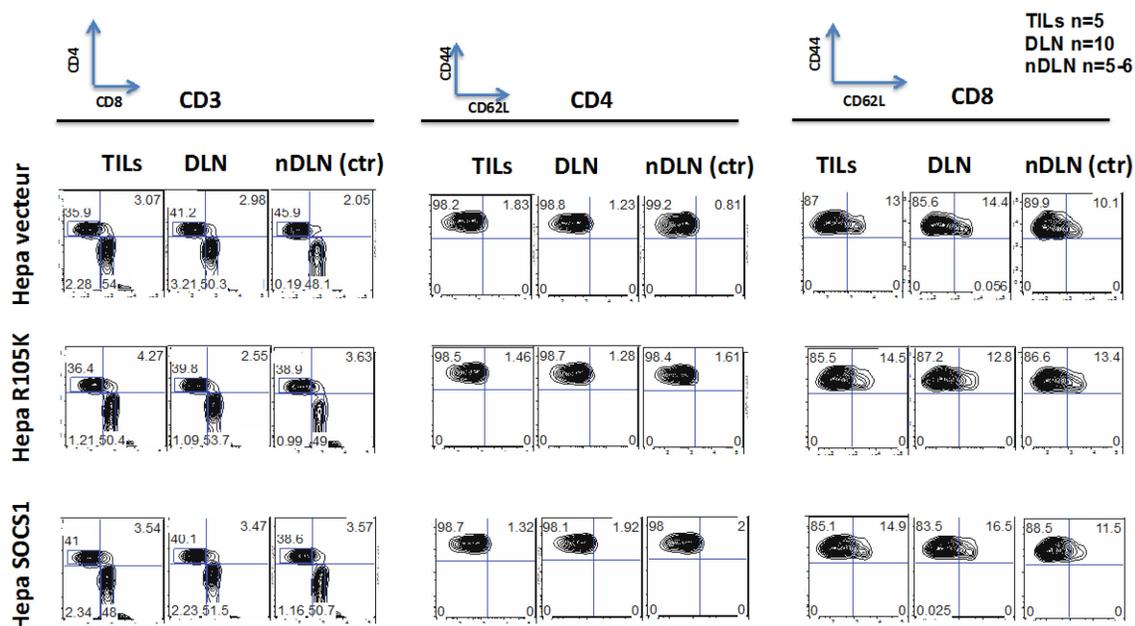
L'évaluation des TILS isolés des tumeurs Hepa-vector, Hepa-SOCS1 et Hepa-SOCS1R105K provenant de souris C57BL/6 ainsi que les cellules isolées à partir des ganglions drainants et non-drainants de ces souris a montré des fréquences de sous-populations T lymphocytaires similaires (Figures IV.7), ce qui suggèrent que l'expression de SOCS1 n'affecte pas la fréquence des cellules T recrutées au niveau des masses tumorales ainsi qu'au niveau des ganglions drainants. Ainsi, nous avons calculé le nombre absolu de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et T CD4<sup>+</sup> totaux et leurs sous-populations (naïves, effectrices et mémoires) à partir des fréquences des populations recrutées au

niveau de la tumeur des souris injectées avec les cellules tumorales Hepa (Hepa-Vecteur, Hepa-R105KSOCS1 et Hepa-SOCS1) (Figure. IV. 8). Les résultats montrent une tendance d'augmentation non significative du nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> totaux, effecteurs et mémoires, ainsi que du nombre de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> mémoires recrutés au niveau des tumeurs hepa-SOCS1 et Hepa-R105KSOCS1 en comparaison avec les résultats observés chez les tumeurs contrôles (Hepa-vecteur) des souris C57BL/6 (Figure. IV. 8).



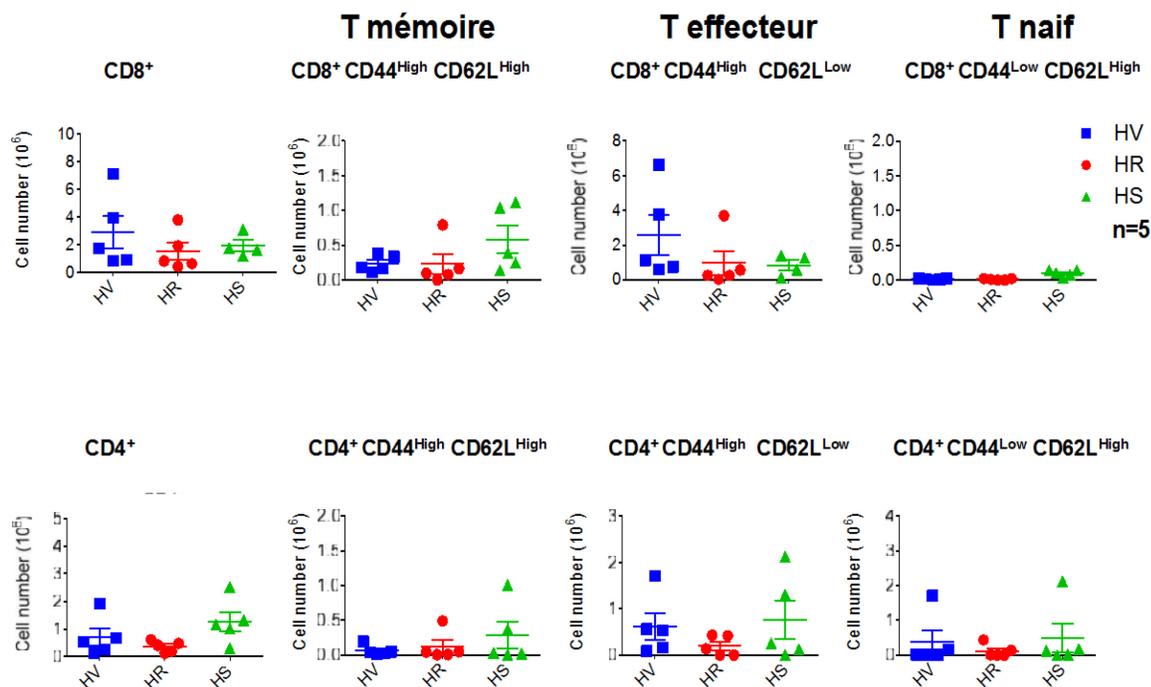
**Figure IV.6. Stratégie de sélection des populations T lymphocytaires.**

Basé sur paramètres “Forward Scatter” (FSC) et “side scatter” (SSC), les lymphocytes ont été sélectionnés. À partir de la population CD3 positive, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ou le CD8<sup>+</sup> ont été identifiés suivant le double marquage CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> ou CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>, à partir duquel les cellules positives pour les marqueurs CD44 et CD62L ont été identifiées afin de caractériser les sous-populations T CD4<sup>+</sup> ou T CD8<sup>+</sup> naïves (CD44<sup>Low</sup> CD62L<sup>high</sup>) effectrices (CD44<sup>high</sup> CD62L<sup>Low</sup>) et mémoires (CD44<sup>high</sup> CD62L<sup>high</sup>).



**Figure IV.7. Fréquence des sous-populations de lymphocytes T recrutées au niveau des tumeurs et des ganglions.**

Les cellules isolées à partir des tumeurs (TILs) et des ganglions DLN et NDLN provenant des souris injectées avec les cellules tumorales Hepa ont été caractérisées par la cytométrie de flux. Les pourcentages des populations T CD4<sup>+</sup> et des T CD8<sup>+</sup> ont été obtenus à partir de la population CD3<sup>+</sup>. A partir de chacune de ces deux populations T CD4<sup>+</sup> et des T CD8<sup>+</sup>, les pourcentages de leurs sous-populations naïves, effectrices et mémoires ont été obtenus en fonction de l'expression des marqueurs CD44 et CD62L.



**Figure IV. 8. Nombre total des sous-populations T lymphocytaires au niveau des tumeurs induites chez les souris C57BL/6 injectées avec les cellules Hepa.**

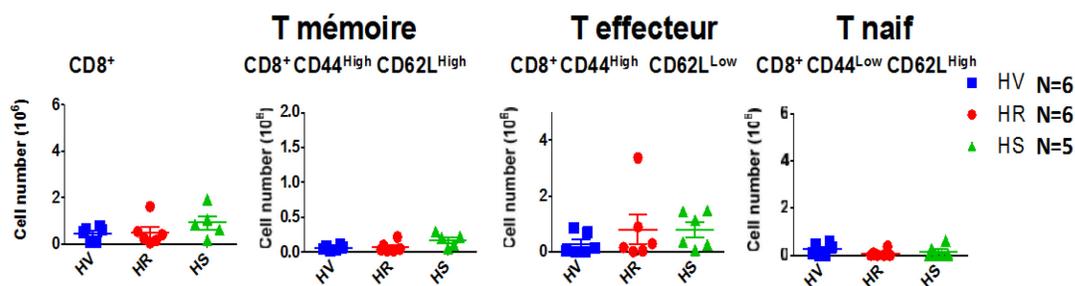
A partir des fréquences des populations T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> et leurs sous-populations rapportées au niveau des masses tumorales, le nombre des lymphocytes T a été calculé en se référant au nombre de cellules non marquées. Les résultats cumulatifs de 4 souris par groupe sont montrés où Hepa-Vecteur constitue le contrôle.

Les populations lymphocytaires activées retrouvées dans les tumeurs Hepa-SOCS1 et Hepa-SOCS1R105K suggèrent qu'elles ont subies une activation préalable par les antigènes tumoraux retrouvés dans les ganglions drainant. Nous avons donc comparé le nombre de lymphocytes T au niveau des ganglions drainants (du côté du site de l'injection des cellules tumorales) et au niveau des ganglions non drainants. Bien que les valeurs obtenues ne soient pas significatives, les résultats révèlent que les ganglions ont une tendance à recruter plus de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> en réponse à l'implantation des cellules Hepa-SOCS1 en comparaison avec le contrôle (cellules Hepa-Vecteur). La sous population T CD8<sup>+</sup> lymphocytaire recrutée en réponse à l'inoculation des cellules Hepa-SOCS1 est constituée majoritairement de T CD8<sup>+</sup> effecteurs et mémoires en comparaison avec le contrôle (Figure IV. 9). Les sous

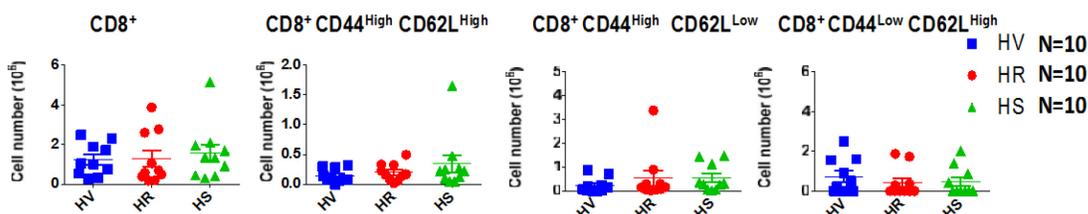
populations lymphocytaires T CD4<sup>+</sup> mémoires et effectrices ont également tendance à être plus élevés (non-significatif) dans les ganglions des souris C57BL/6 implantées avec les cellules Hepa exprimant SOCS1 (Figure IV.10).

La forte infiltration, par des cellules monoclonées, observée au niveau des tissus tumoraux (figure IV. 4) illustre la réduction de la croissance tumorale chez les souris injectées avec les cellules tumorales Hepa ayant le SOCS1 (exogène). Cette réduction de la taille de la masse tumorale correspond à un recrutement de cellules immunitaires qu'on a pu suivre par la technique de marquage extracellulaire. Bien que le nombre de souris ne soit pas suffisant pour démontrer une quelconque signification néanmoins on a pu déceler une légère tendance observée au niveau des figures IV.8 et figures IV.10. Cette tendance pourrait s'expliquer par le fait que la reconstitution de SOCS1 semblerait contribuer à une amélioration de la réponse anti-tumorale. Ceci en recrutant des cellules leucocytaires effectrices clés soit les cellules T CD4<sup>+</sup> qui sont nécessaires à l'activation des lymphocytes cytotoxiques T CD8<sup>+</sup>. Du fait que ces cellules T CD4<sup>+</sup> aident à améliorer le signal de costimulation des T CD8<sup>+</sup> suite à l'interaction avec les cellules présentatrices d'antigènes .

### NDLN: ganglions non drainants



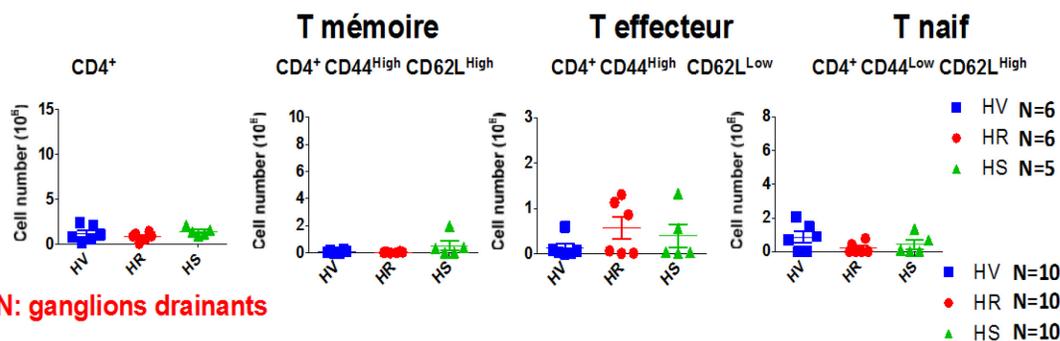
### DLN: ganglions drainants



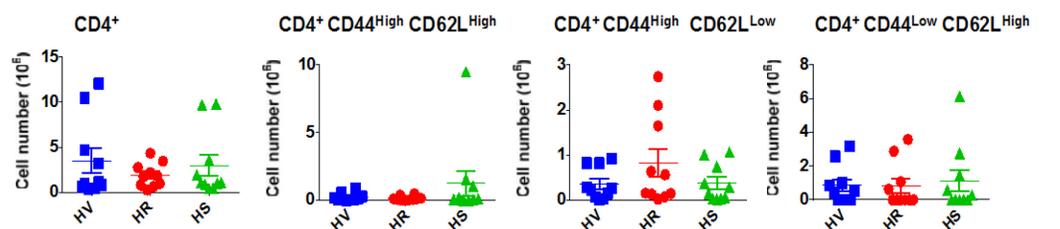
**Figure IV.9. Nombre total des sous-populations lymphocytaires T CD8<sup>+</sup> au niveau des ganglions chez les souris C57BL/6 injectées avec les cellules Hepa.**

À partir des fréquences des populations T CD8<sup>+</sup> et de leurs sous-populations rapportées au niveau des ganglions drainants et non drainants des souris injectées avec les cellules Hepa-Vecteur, Hepa-R105KSOCS1 ou Hepa-SOCS1, le nombre des lymphocytes T a été calculé en se référant au nombre de cellules non marquées.

### NDLN: ganglions non drainants



### DLN: ganglions drainants



**Figure IV.10. Nombre total de la sous-population lymphocytaire T CD4<sup>+</sup> au niveau des ganglions chez les souris C57BL/6 injectées avec les cellules Hepa.**

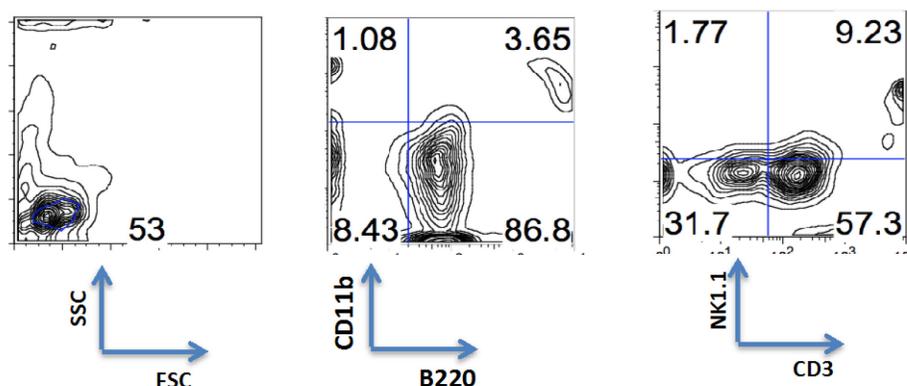
A partir des fréquences des populations T CD4<sup>+</sup> et leurs sous-populations rapportées au niveau des ganglions drainants et non drainants des souris injectées avec les cellules Hepa-Vecteur, Hepa-R105KSOCS1 ou Hepa-SOCS1, le nombre des lymphocytes T a été calculé, en se référant au nombre de cellules non marquées.

En résumé, la fréquence des différentes populations lymphocytaires semble être similaire au niveau des ganglions et de la tumeur. Par ailleurs, on remarque une tendance, bien que non significative, à recruter plus de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> au niveau des ganglions drainant qu'au niveau de la tumeur, avec une prédominance des populations T<sub>EM</sub> (CD44<sup>high</sup> CD62L<sup>Low</sup>) et T<sub>CM</sub> (CD44<sup>high</sup> CD62L<sup>high</sup>).

## 2. Caractérisation des cellules leucocytaires recrutées au niveau de la tumeur et des ganglions drainants et non drainants

Bien que les lymphocytes T constituent les cellules du système adaptatif impliqués dans l'immunité anti-tumorale, les cellules NK et NKT forment la première ligne de défense contre le cancer (Seki et al. 2000; Smyth et al. 2000). De plus, les

macrophages modulent aussi la réponse anti-tumorale (Biswas & Mantovani 2010; Quail & Joyce 2013). Ainsi, nous avons analysé ces cellules par cytométrie de flux en utilisant un mélange d'anticorps ciblant les marqueurs CD11b, B220, NK1.1 et CD3 et afin d'identifier respectivement les macrophages et les cellules B, NK et NKT (Figure IV.11).

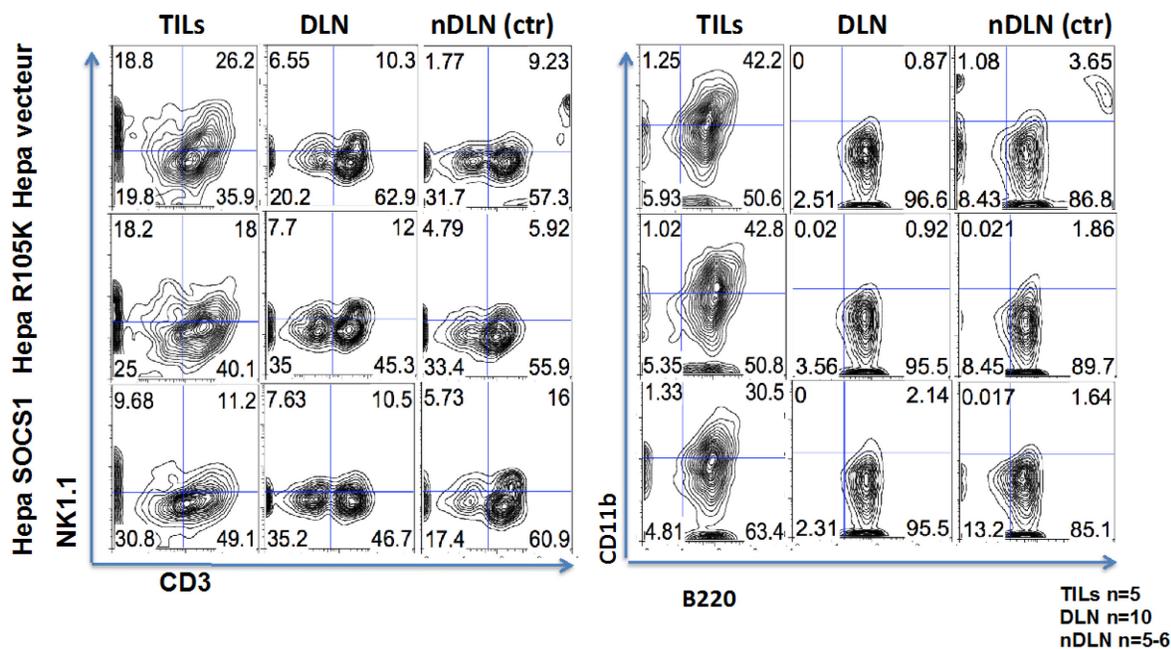


**Figure VI.11 Stratégie de sélection des populations leucocytaires.**

Les leucocytes totaux isolés à partir des ganglions et des tumeurs de souris C57BL/6 implantées avec les cellules tumorales Hepa (Hepa-Vecteur, Hepa-R105KSOCS1, Hepa-SOCS1) ont été sélectionnées selon les paramètres "forward Scatter" (FSC) et "side scatter" (SSC). La stratégie de sélection utilisée, nous a servis à identifier les lymphocytes B et macrophages par les marqueurs B220 et CD11b. Les cellules NK et NKT ont été identifiées par les marqueurs NK1.1 et CD3.

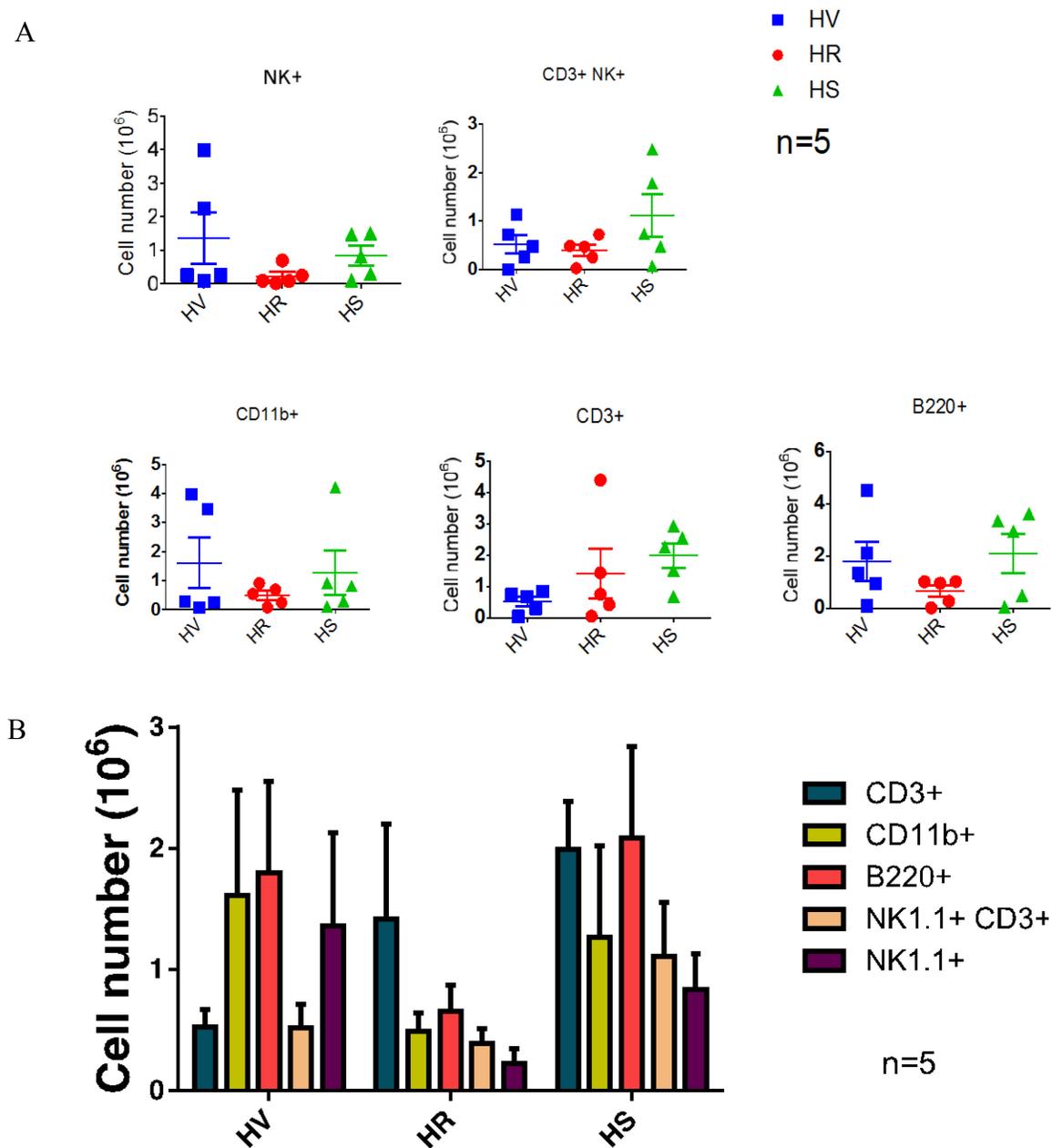
Cette stratégie d'identification des populations leucocytaires d'intérêt a été appliquée aux cellules infiltrant les masses tumorales et des ganglions des souris C57BL/6 implantées avec les cellules Hepa-Vecteur, Hepa-R105KSOCS1 ou Hepa-SOCS1 (Figure IV.12). Les résultats montrent une fréquence moins importante de cellules T totaux chez les souris implantées avec les cellules Hepa-R105KSOCS1 et Hepa-SOCS1 par rapport aux cellules Hepa-Vecteur aux niveaux des ganglions drainants. Cependant les cellules Hepa-SOCS1 semblent recruter plus de lymphocytes B par rapport à celles recrutées par les cellules contrôles (Hepa-Vecteur) aux niveaux des tumeurs (Figure IV.13). Toutefois, les nombres totaux des cellules montrent une tendance non significative à recruter plus de lymphocytes NKT, de T et de B au niveau des tumeurs Hepa-SOCS1 par rapport aux tumeurs Hepa-Vecteur. Par ailleurs, les

tumeurs Hepa-R105KSOCS1 montrent une légère augmentation non significative du recrutement des lymphocytes T par rapport au contrôle (Hepa-Vecteur) (Figure IV.13). En résumé, nos résultats illustrent une tendance à recruter plus de lymphocytes T, de B et de NKT et moins de CD11b et de NK au niveau des tumeurs Hepa-SOCS1 par rapport aux tumeurs Hepa-vecteur.



**Figure IV.12. Profil des populations leucocytaires au niveau de la tumeur et des ganglions.**

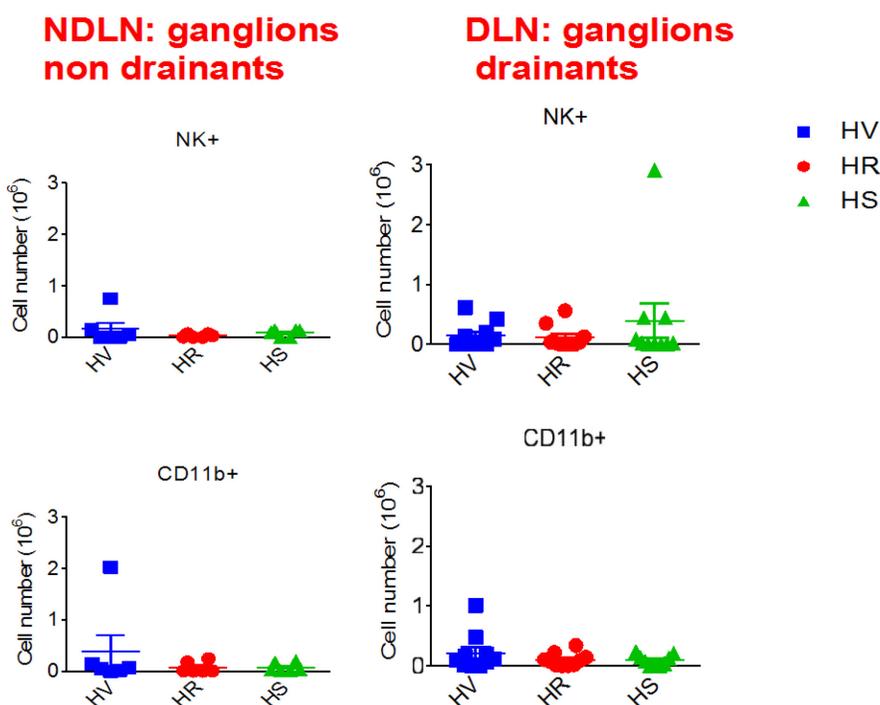
Les cellules isolées à partir des tumeurs et des ganglions en provenance des souris injectées avec les cellules tumorales Hepa ont été marquées avec les anticorps indiqués et analysés par la cryométrie de flux. Les pourcentages des cellules NK (NK1.1<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>), NKT (NK1.1<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>) et T (NK1.1<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>), lymphocytes B (B220<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>) et macrophages (CD11b<sup>+</sup>) sont indiqués.



**Figure IV.13. Nombre total des leucocytes au niveau des tumeurs induites chez les souris C57BL/6 injectées avec les cellules tumorales Hepa.**

À partir des fréquences des populations NK ( $\text{NK1.1}^+\text{CD3}^-$ ), NKT ( $\text{NK1.1}^+\text{CD3}^+$ ) macrophages ( $\text{CD11b}^+$ ), lymphocytes T ( $\text{CD3}^+\text{NK1.1}^-$ ), et lymphocytes B ( $\text{B220}^+$ ) rapportées au niveau des tumeurs Hepa-Vecteur (HV), Hepa-R105KSOCS1 (HR) et Hepa-SOCS1 (HS), les nombres des cellules leucocytaires ont été calculés. Les données des souris individuelles (A) et cumulative (mean+SD) (B) sont montrés.

Du fait que les cellules recrutées au niveau du site tumoral sont acheminées par la circulation lymphatique, nous avons voulu retracer la trajectoire des leucocytes. Ceci est réalisé en identifiant les cellules présentes au niveau des ganglions en réponse à l'inoculation des trois types cellulaires Hepa aux souris C57BL /6. La comparaison du nombre des cellules NK et des macrophages au niveau des ganglions drainants et non drainants des souris implantées avec les cellules Hepa-R105KSOCS1 et Hepa-SOCS1 par rapport aux cellules Hepa-Vecteur (contrôles) révèle une tendance (non significative) des cellules Hepa-SOCS1 à induire un nombre plus élevé de NK au niveau des ganglions (Figure IV.14).

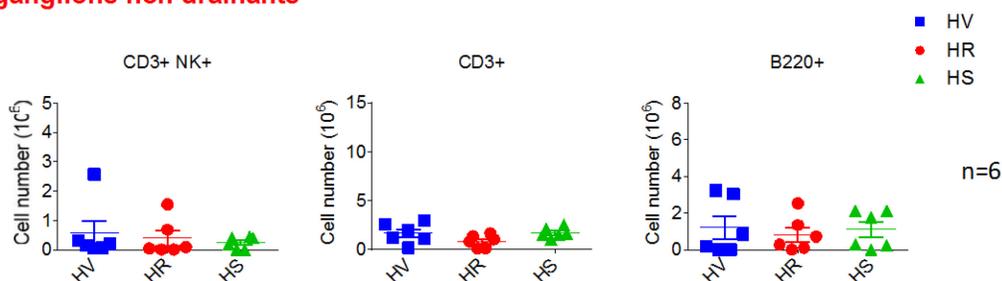


**Figure IV.14. Nombre total des cellules NK et des macrophages au niveau des ganglions drainants de souris C57BL/6 injectées avec les cellules tumorales Hepa.**

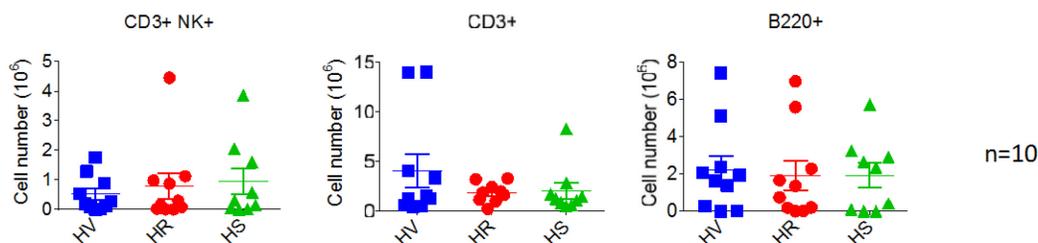
À partir des fréquences des populations macrophages (CD11b<sup>+</sup>) et NK (NK1.1<sup>+</sup>) rapportées au niveau des ganglions drainants et non drainants, le nombre des leucocytes a été calculé en se référant au nombre de cellules non marquées dans les ganglions non-drainants (NDLN) et drainants (DLN).

L'évaluation du nombre de lymphocytes NKT, T et B au niveau des ganglions des souris C57BL/6, inoculées par les cellules Hepa-Vecteur, Hepa-R105KSOCS1 ou Hepa-SOCS1 a été effectuée. Les souris implantées avec des cellules Hepa-SOCS1 montrent une tendance plus élevée, mais non-significative, à recruter les cellules NKT au niveau des ganglions drainants par rapport aux ganglions non drainants ainsi qu'en comparaison avec les cellules Hepa-vecteur. Par ailleurs, l'implantation des tumeurs Hepa exprimant SOCS1 ou SOCS1R105K n'affecte pas le recrutement des lymphocytes B et T au niveau des ganglions drainants en comparaison avec les cellules contrôles, Hepa-Vecteur (Figure IV.15).

#### NDLN: ganglions non drainants



#### DLN: ganglions drainants



**Figure IV.15. Nombre total des lymphocytes (NKT, T et B) recrutés au niveau des ganglions de souris C57BL/6 injectées avec les cellules tumorales Hepa.**

À partir des fréquences des populations de lymphocytes T ( $CD3^+$ ), NKT ( $CD3^+ NK1.1^+$ ) et LB ( $B220^+$ ) rapportées au niveau des ganglions drainants et non drainants, le nombre de ces lymphocytes a été calculé en se référant au nombre de cellules non marquées et en comparant par rapport aux cellules Hepa-Vecteur.

En résumé, les cellules Hepa-SOCS1 implantées chez les souris immunocompétentes C57BL/6 génèrent plus de cellules T  $CD8^+$  mémoires et de cellules NKT, mais moins de lymphocytes B, de cellules NK et de macrophages. Cet effet n'est

pas observé chez les souris implantées avec des cellules Hepa-R105K (Tableau IV.1). De plus, les ganglions drainants des souris implantées avec les cellules Hepa-SOCS1 montrent une augmentation des cellules CD8 T mémoires mais pas des cellules effecteurs.

**Tableau IV.1. Tableau récapitulatif montrant les cellules recrutées au niveau des masses tumorales de souris implantées avec les cellules Hepa-vecteur, Hepa-SOCS1 ou Hepa-SOCS1R105K.**

	Hepa-vecteur	Hepa-R105K	Hepa-SOCS1
 T CD8 <sup>+</sup> mémoire	T CD8 <sup>+</sup> CD44 <sup>High</sup> CD62L <sup>High</sup>	- T CD8 <sup>+</sup> CD44 <sup>High</sup> CD62L <sup>High</sup>	++ T CD8 <sup>+</sup> CD44 <sup>High</sup> CD62L <sup>High</sup>
 T CD8 <sup>+</sup> effecteur	T CD8 <sup>+</sup> CD44 <sup>High</sup> CD62L <sup>Low</sup>	- T CD8 <sup>+</sup> CD44 <sup>High</sup> CD62L <sup>Low</sup>	- T CD8 <sup>+</sup> CD44 <sup>High</sup> CD62L <sup>Low</sup>
 L B	L B	- L B	L B
 T CD3 <sup>+</sup>	T CD3 <sup>+</sup>	+ T CD3 <sup>+</sup>	++ T CD3 <sup>+</sup>
 NKT	NKT	NKT	+ NKT
 NK	NK	-- NK	- NK
 Macrophages	Macrophages	-- Macrophages	- Macrophages

## Chapitre V. Discussion

De part sa capacité à réguler la signalisation cellulaire JAK-STAT, la protéine SOCS1, a suscité beaucoup d'intérêt, et ce, peu de temps après sa découverte par 3 équipes de recherches (Starr et al. 1997; Endo et al. 1997; T Naka et al. 1997). Par la suite, les chercheurs ont observé que le gène codant SOCS1 était réprimé dans plusieurs cancers selon un mécanisme épigénétique (Sasi et al. 2014). L'analyse des échantillons de biopsies de patients atteints de HCC montrent que jusqu'à 65% de ceux-ci possèdent au moins un allèle réprimé du gène SOCS1 (Yoshikawa et al. 2001). Le SOCS1 se retrouve tantôt réprimé tantôt surexprimé. Un double rôle d'oncogène et de suppresseur de tumeur lui a été attribué en fonction du type de cancer. L'expression du gène SOCS1 est parfois augmentée tel qu'observé chez les cellules du cancer du sein et du cancer colorectale (Evans et al. 2007; Tobelaim et al. 2015). Les mécanismes impliqués dans la surexpression de SOCS1 ne sont pas bien élucidés. La surexpression pourrait s'expliquer par des modifications touchant les microARNs (miARNs) ou encore par l'enclenchement d'une cascade de signalisation menant à la phosphorylation constitutive des motifs tyrosines kinase de STATs. La phosphorylation des molécules STATs sera, par conséquent, réprimée par SOCS1.

SOCS1 possède deux domaines qui peuvent contribuer à la suppression de tumeurs. Le premier domaine a été nommé SH2 (SRC Homology 2 Domain) (Rottapel et al. 2002; Alexander 2002) et le deuxième domaine est appelé SOCS Box. Ce dernier est impliqué dans l'ubiquitination des protéines tumorales (De Sepulveda et al. 2000, Kamizono S et al 2000, Kile BT et al, 2002, Elliott J et al 2008, Piessevaux J et al, 2008).

Le carcinome hépatocellulaire, constitue la seconde cause de décès de cancer dans le monde (Jemal et al. 1999). Ceci est dû en grande partie au fait que ce type de cancer est souvent décelé tardivement, et que les moyens de traitement mis à la disposition des patients sont limités et peu efficaces (Llovet 2005). Récemment, et avec l'avancement des recherches en immunothérapie, plusieurs nouvelles pistes de

traitement du HCC ont été envisagées. Parmi celles-ci on retrouve la vaccination avec des cellules dendritiques reconnaissant les antigènes tumoraux, l'inhibition des cellules immunosuppressives qui interfèrent avec une réponse anti-tumorale optimale et le transfert adoptif de cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques, (Couzin-Frankel 2013; Lizée et al. 2013). Certains de ces traitements, dont la vaccination avec les cellules dendritiques et le transfert de cellules T CD8<sup>+</sup> préalablement activées, sont présentement utilisés en phase pré-clinique ou clinique pour traiter le HCC (Sprinzl & Galle 2013; Hong et al. 2015).

Dans ce travail nous avons étudié le rôle de SOCS1 dans l'immunogénicité, ce qui diffère des fonctions des autres inhibiteurs connus de la voie de signalisation JAK-STAT (Sasi et al. 2014). En effet, SOCS1 peut réguler les fonctions du gène suppresseur de tumeur p53 (Calabrese et al. 2009), il est impliqué dans l'inhibition de la voie de signalisation des facteurs de croissance (Gui et al. 2015) ainsi que dans la protection contre le potentiel oncogénique de p21 (Yeganeh et al. 2016). Ceci est dû au fait que SOCS1 cible plusieurs onco-protéines et molécules de signalisation via la dégradation protéosomale (Ilangumaran, Ramanathan & Rottapel 2004). Ce processus de dégradation génère des peptides immunogènes apprêtés par les molécules de CMH-I et présentés aux CTLs (Lymphocytes T cytotoxiques) (Yewdell et al. 2003). Il est donc logique de penser que SOCS1 contribue au processus d'apprêtement des antigènes tumoraux afin de promouvoir l'immunité anti-tumorale. En effet, nos résultats utilisant la lignée de souris C56BL/6 chez qui on a implanté des cellules tumorales HCC exprimant SOCS1 (Hepa-S) soutiennent l'idée que SOCS1 favorise l'immunogénicité des cellules tumorales.

### 1. Le domaine SH2 est responsable de la répression de la signalisation des cytokines inflammatoires

Nous avons étudié la capacité de la protéine SOCS1 à moduler la signalisation induite par la cytokine IL-6. Les résultats montrent deux profils distincts : chez les cellules Hepa-vecteur (SOCS1 endogène est sous exprimé) ainsi que les cellules Hepa-R105KSOCS1 (mutantes pour le domaine SH2) on observe un niveau élevé de phosphorylation des résidus tyrosines de STAT3 tandis que les cellules ayant le SOCS1

restauré présentent une phosphorylation moins importante. Ces résultats confirment les travaux précédents qui ont démontré la capacité de SOCS1 à inhiber la signalisation induite par les cytokines pro-inflammatoires et les facteurs de croissance chez les cellules tumorales (Neuwirt et al. 2009; Gui et al. 2015) (Figure IV.1).

La capacité de SOCS1 à réprimer la voie de signalisation JAK-STAT est médiée premièrement par le domaine SH2 de la protéine SOCS1 qui se lie aux résidus phosphotyrosines sur les kinases JAK, les molécules STATs et les récepteurs des cytokines et facteurs de croissance (Trenigove & Ward 2013; Julhash U. Kazi et al. 2014). Ceci tend à atténuer la signalisation des cytokines et facteurs de croissance via une boucle de rétrocontrôle négatif. Dans cette étude, les cellules exprimant le SOCS1 sauvage inhibent la signalisation des cytokines et facteurs de croissance mais ceci n'est pas le cas des cellules ayant le domaine SH2 muté (SOCS1R105K). Il a été démontré que la surexpression du SOCS1 exogène au niveau du HCC conduit au même effet inhibiteur (Gui et al. 2015). Cependant, ces travaux ne permettaient pas de distinguer si l'inhibition de la croissance tumorale est due à la boucle de rétrocontrôle négatif assurant le blocage de la signalisation des cytokines/facteurs de croissance ou si elle est médiée par l'induction de l'immunité anti-tumorale. De plus, cette deuxième possibilité n'a jamais été explorée étant donné que les recherches précédentes utilisaient des cellules tumorales humaines inoculées à des souris immuno-déficientes nude ou NOD.scid gamma (NSG).

Dans ce travail, nous avons choisi d'utiliser les cellules Hepa 1-6 du fait que ces cellules tumorales dérivent des souris C57BL/6, ce qui nous permet d'approfondir nos études dans un modèle syngénique et immunocompétent. La génération de plusieurs types cellulaires impliquant la surexpression du SOCS1 sauvage ou encore du domaine SH2 mutant (SOCS1R105K) permet de distinguer l'immunogénicité tumorale médiée par SOCS1 de ses fonctions inhibitrices de croissance médiées par son domaine SOCS Box.

## 2. La croissance tumorale chez les souris immunodéficientes NSG et chez les souris C57BL/6

La croissance tumorale réduite des cellules hepa-SOCS1 comparée à celle des cellules Hepa-vecteur chez les souris NSG (Figure IV. 2) est en accord avec les travaux précédents qui ont démontré une répression de la signalisation des cytokines proinflammatoires et facteurs de croissances (tel que le HGF) par SOCS1 (Gui et al. 2015). Par ailleurs, nos résultats indiquant que les cellules Hepa-R105KSOCS1 et Hepa-vecteur ont la même cinétique de croissance tumorale chez les souris NSG (Figure IV. 2) confirment l'incapacité du mutant R105K à réprimer la signalisation cellulaire induite par les cytokines et les facteurs de croissance.

Les profils de croissance tumorale (des cellules Hepa-vecteur) chez les souris C57BL/6 (Figure IV. 3) et chez les souris NSG (Figure IV. 2) montrent une cinétique de croissance tumorale similaire. Ces résultats pourraient s'expliquer par le fait que le SOCS1 est réprimé chez les lignées de carcinome hépatocellulaire (Yoshikawa H, et al, 2001). Au contraire, les cellules tumorales Hepa-SOCS1 ont une croissance réduite qui pourra être expliquée par le rôle de SOCS1 à réguler la voie de signalisation JAK-STAT (Trenrove & Ward 2013).

La comparaison de la croissance tumorale des cellules hepa-R105KSOCS1 chez les souris immunocompétentes C57BL/6 (Figure IV. 3) avec celle observée chez les souris immunodéficientes NOD.SCID.Gamma (Figure IV. 2) nous a permis de mettre en évidence le rôle immunogène de la protéine SOCS1. En effet, le niveau de croissance tumorale intermédiaire observé avec les cellules tumorales hepa-SOCS1R105K (mutant), qui n'ont pas la capacité d'inhiber la voie de signalisation des cytokines/facteurs de croissance uniquement chez le modèle immunocompétent de souris C57BL/6 indique que SOCS1 médie une fonction anti-tumorale qui nécessite la présence des lymphocytes. Les lymphocytes T cytotoxiques sont les médiateurs les plus probables de la suppression des tumeurs surexprimant SOCS1, et ceci peut se produire indépendamment de son domaine SH2. Comme indiqué précédemment, SOCS1 est un adaptateur pour l'ubiquitination de nombreux substrats protéiques qui incluent des

oncoprotéines et des protéines de signalisation ce qui mène à leur dégradation ultérieure par le protéasome (De Sepulveda et al. 2000; Ilangumaran, Ramanathan & Rottapel 2004). Il est à noter que certaines de ces protéines interagissent avec SOCS1 d'une manière indépendante de sa phosphorylation sur le résidu tyrosine. Il est probable que les épitopes antigéniques générés à partir de ces protéines activent les lymphocytes T cytotoxiques qui participent à la réduction de la croissance tumorale des cellules Hepa-SOCS1R105K chez des souris C57BL6 (Figure IV. 3).

### 3. Étude de la structure des tissus tumoraux prélevés chez souris injectées avec les cellules Hepa

À la lumière des résultats obtenus chez les souris immunocompétentes, nous avons investigué le rôle de SOCS1 dans l'immunogénicité. Pour ce faire, nous avons récolté les masses tumorales des souris implantées avec les cellules tumorales Hepa-vecteur, Hepa-R105KSOCS1 et Hepa-SOCS1 (Figure.IV.3) et caractérisé l'immunogénicité de la tumeur, en étudiant l'infiltrat cellulaire du tissu tumoral par histochimie. Ainsi, la forte infiltration leucocytaire observée dans les tissus tumoraux Hepa-R105KSOCS1 et Hepa-SOCS1 (figure IV. 4) suggère que les cellules hepa-SOCS1 ayant le domaine SOCS Box intact, contribuent à recruter plus de cellules immunitaires, et ce, probablement dû à la capacité de ce domaine SOCS Box à ubiquitiner plusieurs oncoprotéines.

Ce que nous avons démontré par cette expérience est la corrélation entre la présence du domaine SOCS Box, dont la fonction est d'ubiquitiner le substrat, et la forte infiltration leucocytaire. En effet, l'ubiquitination des substrats entraîne leur fragmentation menant à leur apprêtement et présentation comme antigène à la surface de la cellule tumorale. Ce qui attire plus de cellules immunitaires (représentées par l'infiltration) en vue de lyser ces cellules tumorales. D'où l'observation de la forte infiltration (figure IV. 4) menant à la réduction de la taille de tumeur (figure IV. 3). Alors que, si le SOCS Box était non fonctionnel on observerait un profil d'infiltration comparable au profil obtenu chez les souris C57BL/6 inoculées avec les cellules tumorales Hepa-vecteur.

Celles-ci peuvent être apprêtées sur les molécules de CMH-I, pour être présentées aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques (Nicchitta C V, et al, 2003, Schreiber RD, et al, 2011). Il est probable que cet événement génère la production de chimiokines par les cellules activées, ce qui attire encore plus de cellules T, d'où la forte augmentation de l'infiltrat leucocytaire qui concorde avec la réduction du volume des masses tumorales.

Ces résultats appuient donc notre hypothèse qui stipule que SOCS1 pourrait être impliqué dans l'augmentation de l'immunogénicité qui se manifeste par le recrutement accru de lymphocytes T au niveau du site tumoral afin de limiter son expansion.

#### 4. Populations lymphocytaires au niveau des tumeurs induites chez les souris C57BL/6 injectées avec les cellules Hepa

Nous avons poussé nos recherches plus loin afin d'étudier les populations cellulaires recrutées au niveau des différents tissus tumoraux par un marquage d'antigènes cellulaires nous permettant de différencier les différentes sous-populations de leucocytes. La figure IV.8 montre une tendance à recruter un nombre plus élevé de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> mémoires, en réponse à l'implantation des souris avec les cellules hepa-SOCS1, en comparaison avec les cellules Hepa-vecteur (contrôle).

Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que le domaine SOCS Box de la protéine SOCS1 est apte à ubiquitiner des protéines spécifiques de la tumeur (Elliott J et al 2008). En effet, un substrat lié au domaine SH2 ou par d'autres régions de la protéine SOCS1 va être stabilisé par le recrutement de plusieurs autres unités qui vont former un complexe E3 ubiquitine ligase dont le but est d'insérer des groupements ubiquitines aux substrats à dégrader (Kamizono S et al 2000, Kile BT et al, 2002, Elliott J et al 2008, Piessevaux J et al, 2008). Ainsi, la cellule va, grâce au protéasome, réduire en petits fragments peptidiques ces substrats. Les fragments peptidiques vont être apprêtés sur les molécules de CMH de classe I des cellules tumorales, ce qui va permettre aux cellules T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques de les reconnaître et de les lyser (Schreiber RD, et al,

2011). Il a déjà été reporté par l'équipe de Meunier et al, (2005), qu'une interaction d'une cellule T avec un seul antigène tumoral pouvait neutraliser l'expansion d'une tumeur solide. Cette équipe de recherche a réalisé ses travaux sur un modèle de mélanome, qui est un cancer plus agressif que le carcinome hépatocellulaire. De plus, il a été démontré que la vaccination avec des antigènes associés aux tumeurs est très efficace pour prévenir les rechutes chez les patients atteints de carcinome hépatocellulaire (Hiroishi et al, 2009). À cet effet, Il serait intéressant d'identifier les protéines qui ont été ubiquitinées suite avec leur interaction avec le domaine SOCS Box afin d'en savoir plus quant à l'implication de SOCS1 dans l'induction de la réponse immunitaire.

Par ailleurs, nous avons observé une augmentation non significative du nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> totaux, mémoires et effecteurs suite à l'implantation des souris avec les cellules Hepa-SOCS1, en comparaison avec le contrôle (souris implantées avec les cellules Hepa-vecteur) et les cellules Hepa-R105KSOCS1 (ayant le domaine SH2 muté) implantées dans les souris B6 (Figure IV. 8). La mutation Arginine vs Lysine a abolit le fixation des motifs kinases phosphorylés par le domaine Src homologie 2, et a donc abolit la répression de la signalisation cellulaire des cytokines ayant des récepteurs tyrosine kinases (Yasukawa et al. 1999). Il serait intéressant d'utiliser plusieurs autres marqueurs en vue d'identifier les différentes sous-populations de lymphocytes TCD4<sup>+</sup>. En effet, la présence de chaque type de populations cellulaires pourrait être associé à différents profils évolutifs de la tumeur.

En effet, la présence de populations Th1 au niveau du site tumoral pourrait contribuer à la régression du volume tumoral, de part les cytokines qu'elles secrètent comme l'INF $\gamma$  qui empêche la formation de tumeurs spontanées ou encore aide à éliminer celles déjà établies (Dighe et al. 1994; Kim et al. 2007; Quail & Joyce 2013). De plus, cette panoplie de cytokines pro-inflammatoires secrétées par la population de cellules Th1 conduit à la polarisation des macrophages de type M1 qui jouent un rôle anti-tumoral (Biswas S K et Mantovani A, 2010).

En contre partie, la population Th2 secrète des cytokines anti-inflammatoires. Elle contribuerait à la résistance de la tumeur et à la promotion de métastases, grâce à la sécrétion d'IL-4, IL-5, IL8, IL-10. En effet, il a été démontré que le développement de métastases au niveau du HCC corrélait avec l'augmentation des cytokines anti-inflammatoires des cellules TH2 (Budhu et al. 2006).

Le recrutement de cellules suppressives T régulatrices (Treg) contribuerait à l'expansion tumorale en interférant avec l'action des cellules immunitaires pro-inflammatoires. Les Treg peuvent libérer dans le microenvironnement tumoral des cytokines comme le TGF- $\beta$  et l'IL-10 qui suppriment l'activation et la prolifération des cellules T (Chen & Mellman, 2013; Kim et al. 2007; Quail & Joyce, 2013).

#### 5. Nombre total des sous-populations T lymphocytaires au niveau des ganglions en réponse à l'implantation des cellules tumorales Hepa.

##### a) Nombre total de la sous-population lymphocytaire T CD8<sup>+</sup>

Il est connu que les ganglions constituent le carrefour de la circulation hémolympatique, où a lieu la rencontre des cellules immunitaires et leurs interactions avec les antigènes, ce qui optimise l'activation des lymphocytes T pour neutraliser les agents pathogènes. C'est en relation avec ce concept que nous nous sommes penchés sur l'étude des populations cellulaires recrutées au niveau des ganglions, et ce, en réponse à la présence de tumeurs.

Bien que les valeurs obtenues ne soient pas significatives, la tendance à recruter plus de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (majoritairement des T CD8<sup>+</sup> effecteurs et mémoires) en réponse à l'implantation des cellules Hepa-SOCS1, aux souris C57BL/6, en comparaison avec le contrôle (cellules Hepa-Vecteur) (Figure IV.9) suggère que les cellules SOCS1 contribuent à promouvoir l'activation des T CD8<sup>+</sup>, un résultat qui va dans le sens de notre hypothèse de recherche.

b) Nombre total de la sous-population lymphocytaire T CD4<sup>+</sup>

Le nombre de lymphocytes T CD4 mémoires et effecteurs a tendance à être plus important chez les cellules ayant le Hepa SOCS1 (avec un écart type allant jusqu' à  $1.5 \cdot 10^6$  de cellules) alors que les cellules Hepa ayant le domaine SH2 du SOCS1 muté révèlent une tendance à recruter un nombre plus important de T CD4<sup>+</sup> effecteurs (avec un écart type allant jusqu' à  $1 \cdot 10^6$  de cellules) chez les souris C57BL/6 implantées (Figure IV.10). Ceci pourrait être dû au fait que le SOCS1 est capable d'augmenter l'expression des CMH-II (Ilangumaran et al. 2002). Cette population de T CD4<sup>+</sup> peut jouer plusieurs fonctions selon le contexte inflammatoire. En effet, les cellules Th1 aident à améliorer l'efficacité des cellules T CD8<sup>+</sup> à acquérir un meilleur pouvoir cytotoxique (Krawczyk et al. 2007). D'autres groupes de recherche ont rapporté que les cellules Th2, contribuent aussi à la réponse des cellules T CD8<sup>+</sup> (EKKens M J et al, 2007). En effet, il a été démontré que l'activation des Th1 (par des antigènes intracellulaires) ou l'action des Th2 (avec un pathogène extérieur) génère des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> mémoires (EKKens M J et al, 2007). Cette équipe de recherche a démontré au moyen d'un test cytotoxique la capacité des cellules Th2 à activer les cellules T CD8<sup>+</sup>, à augmenter leur cytotoxicité et à développer une mémoire immunitaire vis à vis d'une infection portée à une souris et ce suite à une précédente reconnaissance de l'antigène chargé sur les DCs. Un processus similaire pourrait expliquer le nombre important de cellules T CD8<sup>+</sup> effectrices et mémoires recrutées en réponse à l'implantation des cellules Hepa-SOCS1.

Pris dans leur ensemble, nos résultats suggèrent que SOCS1 contribue à l'augmentation de l'immunogénicité premièrement par l'ubiquitination des oncoprotéines qui serviront à l'activation des T CD8<sup>+</sup> dont le rôle essentiel est de lyser les cellules cibles. Deuxièmement, suite au développement d'un nombre important de cellules T CD4<sup>+</sup> qui non seulement contribuerait à l'amélioration de la réponse des cellules T CD8<sup>+</sup> mais qui en plus (selon le sous type de sous-population recruté), contribuerait directement à neutraliser l'expansion tumorale par l'action des cytokines secrétées dans le microenvironnement tumoral.

## 6. Nombre total des populations leucocytaires au niveau des tumeurs induites chez les souris C57BL/6 injectées avec les cellules Hepa

Il est connu que plusieurs autres populations leucocytaires contribuent à la neutralisation de la croissance tumorale et à son élimination (Sinha et al. 2005; Chew et al. 2010; Quail & Joyce 2013). Nous nous sommes donc intéressés à l'étude des autres populations leucocytaires recrutées au niveau du tissu tumoral. Ainsi, nos résultats montrent une tendance à recruter plus de populations NKT, B et T au niveau des tumeurs générées suite à l'implantation des cellules Hepa-SOCS1 par rapport au contrôle (Figure IV.13). Par ailleurs, l'implantation des cellules Hepa-SOCS1 révèle une tendance à recruter plus de lymphocytes NKT et NK par rapport au contrôle (Hepa-Vecteur) au niveau des ganglions (Figure IV.14) ainsi qu'un nombre aussi important de lymphocytes B, résultant de l'implantation des cellules Hepa-SOCS1 par rapport au contrôle (Hepa-Vecteur) (Figure IV.15).

Les cellules NK sont les effecteurs de l'immunité anti-tumorale non spécifique les plus puissants. Il a été reporté que les cellules prédominantes au niveau de la tumeur portaient un phénotype  $CD56^+Ki-67^+CD3^-$  correspondant à la population NK. De plus, la présence de cette portion de cellules ainsi que les cellules T  $CD8^+$  corrélait de façon positive avec l'apoptose des cellules tumorales et l'inhibition de leur croissance (Chew et al. 2010).

Le recrutement important des NKT en réponse à l'implantation des cellules Hepa-SOCS1 pourrait expliquer la réduction de la masse tumorale chez les souris C57BL/6. En effet, les NKT sont impliquées dans l'élimination (mort par apoptose) des cellules tumorales (Zitvogel et al. 2008). Cependant, selon le contexte inflammatoire, ceci pourrait jouer en faveur de la croissance tumorale. En effet, les cellules NKT peuvent sécréter de l'IL-13 dont l'action inhibe la production de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS), essentiel à forte dose, pour la neutralisation des cellules tumorales. En effet, il a été reporté que la présence d'un niveau important d'iNOS corrèle avec la

cytotoxicité des cellules immunitaires, un effet anti-tumoral, une réduction de métastases, une régression de la masse tumorale (Vanini et al. 2015).

Il a été démontré qu'une combinaison des cellules NKT avec l'effet des cellules immunosuppressives est suffisante pour bloquer l'immunosurveillance vis à vis des métastases en orientant la polarisation des macrophages vers un phénotype M2 dans un contexte de cancer du sein (Sinha et al. 2005).

Enfin, les lymphocytes B dans notre système pourraient contribuer à la présentation antigénique puisqu'elles sont considérées comme des cellules présentatrices d'antigène professionnelles (Rodríguez-Pinto 2005; Linnebacher & Maletzki 2012). Le rôle des lymphocytes B consisterait donc à apprêter les fragments peptidiques générés par les cellules tumorales lysées par les cellules cytotoxiques. Les cellules B chargées d'antigène pourraient ensuite migrer au niveau des ganglions pour les présenter aux lymphocytes T, ce qui se traduirait par l'activation des lymphocytes et la génération de cellules T effectrices. Les cellules B reviendraient par la suite au site de la tumeur afin d'activer encore plus de lymphocytes T ce qui pourrait expliquer le nombre plus important de lymphocytes T au niveau de la masse tumorale par rapport aux ganglions. Les Lymphocytes B peuvent aussi contribuer à l'échappement de l'immunosurveillance antitumorale (Linnebacher & Maletzki 2012), et contribuerait donc à la croissance tumorale en orientant la polarisation des cellules Th1 vers un phénotype Th2 (Quail & Joyce 2013) .

## Chapitre VI. Conclusion

En conclusion, ce projet a permis de montrer le rôle du domaine SH2 de la protéine SOCS1 à réprimer la croissance tumorale et ceci en réprimant la signalisation cellulaire *in vitro* suite à la culture cellulaire et *in vivo* chez le modèle de souris NSG. En effet, nous avons pu observer une neutralisation de la croissance tumorale en absence du système immunitaire chez les souris implantées avec les cellules Hepa, ayant le SOCS1 exogène.

Les résultats des modèles expérimentaux (en absence et en présence du système immunitaire) nous ont permis de discerner un rôle immunogène de la protéine SOCS1. De plus, nous avons pu démontrer pour la première fois que la surexpression du gène SOCS1 permet une meilleure infiltration de cellules immunitaires au niveau du tissu tumoral.

Le marquage des antigènes spécifiques aux sous-populations leucocytaires nous a permis de déceler une certaine tendance, malheureusement non significative, mais qui soutient notre hypothèse du rôle de SOCS1 dans l'immunosurveillance. Ces résultats, bien que non-significatifs, illustrent néanmoins ce qui se passe réellement au sein de la masse tumorale, vue que l'infiltration du tissu tumoral par les lymphocytes T est bien visible par la technique d'histochimie.

Il serait vraiment intéressant de mieux caractériser les cellules immunitaires recrutées au niveau du tissu tumoral afin de bien appréhender le devenir de la croissance tumorale et de bonifier nos résultats. Il serait aussi nécessaire d'identifier les protéines ubiquitinées par ce système. Ceci pourrait constituer une nouvelle alternative thérapeutique afin de développer de nouvelles approches thérapeutiques pour le traitement du carcinome hépatocellulaire.

## Chapitre VII. Perspectives

En perspective, il serait intéressant d'augmenter le nombre de souris afin de pouvoir valider nos observations. Il serait aussi important de caractériser les différentes sous populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, ainsi que d'autres populations leucocytaires comme les macrophages.

Il serait aussi intéressant de tester si le transfert adoptif des cellules T isolées des souris immunisées avec Hepa-R105K ou Hepa-SOCS1 conférerait une protection contre les tumeurs générées par les cellules Hepa-vector.

Il serait aussi d'intérêt d'identifier les protéines ubiquitinées par le domaine SOCS Box afin d'avoir de plus amples connaissances sur les antigènes tumoraux reconnus par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>.

Nous pourrions aussi générer une réponse de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifique à un antigène connu: Pour ce faire nous pourrions transfecter des cellules Hepa avec la glycoprotéine (GP) du LCMV (lymphocytic choriomeningitis virus) et évaluer de leur habilité à stimuler les cellules P14 T CD8<sup>+</sup>, ayant un TCR transgénique spécifique à l'épitope gp33 (Ohashi et al. 1991). En effet, SOCS1 chez les cellules Hepa-SOCS1-Gp-33 serait capable d'ubiquitiner la protéine LCMV-GP et générer le peptide Gp-33 et de le présenter à leur surface ce qui permettrait une meilleure élimination de ces cellules tumorales par les cellules P14.

## Chapitre VIII. Liste des références

- Alexander, W.S., 2002. Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system. *Nature reviews. Immunology*, 2(6), pp.410–6.
- Alpini, G. et al., 1994. Recent advances in the isolation of liver cells. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 20(2), pp.494–514.
- Anon, 2013. Canadian Cancer Statistics Special topic : Liver cancer. *Canadian Cancer Statistics*, pp.1–114.
- Biswas, S.K. & Mantovani, A., 2010. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature immunology*, 11(10), pp.889–896.
- Bose, A. & Baral, R., 2007. IFNalpha2b stimulated release of IFNgamma differentially regulates T cell and NK cell mediated tumor cell cytotoxicity. *Immunology letters*, 108(1), pp.68–77.
- Budhu, A. et al., 2006. Prediction of venous metastases, recurrence, and prognosis in hepatocellular carcinoma based on a unique immune response signature of the liver microenvironment. *Cancer Cell*, 10(2), pp.99–111.
- Calabrese, V. et al., 2009. SOCS1 Links Cytokine Signaling to p53 and Senescence. *Molecular Cell*, 36, pp.754–767.
- Caldwell, S.H. et al., 2004. Obesity and hepatocellular carcinoma. In *Gastroenterology*.
- Catlett, I.M. & Hedrick, S.M., 2005. Suppressor of cytokine signaling 1 is required for the differentiation of CD4+ T cells. *Nat Immunol*, 6(7), pp.715–721.
- Chen, D.S. & Mellman, I., 2013. Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle. *Immunity*, 39(1), pp.1–10.
- Chew, V. et al., 2010. Inflammatory tumour microenvironment is associated with superior survival in hepatocellular carcinoma patients. *Journal of Hepatology*, 52(3), pp.370–379.
- Chu, P.Y. et al., 2010. Epigenetic alteration of the SOCS1 gene in hepatocellular carcinoma. *Swiss Medical Weekly*, 140(July), pp.1–5.
- Couzin-Frankel, J., 2013. Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy.

*Science (New York, N.Y.)*, 342(6165), pp.1432–3.

Damm, G. et al., 2013. Human parenchymal and non-parenchymal liver cell isolation, culture and characterization. *Hepatology International*, 7(4), pp.951–958.

Date, M. et al., 2000. Differential regulation of activin A for hepatocyte growth and fibronectin synthesis in rat liver injury. *Journal of hepatology*, 32(2), pp.251–60.

Day, C.P. & James, O.F., 1998. Steatohepatitis: a tale of two ‘hits’? *Gastroenterology*, 114(4), pp.842–5.

Dighe, a S. et al., 1994. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity*, 1(6), pp.447–56.

Doherty, D.G. & O’Farrelly, C., 2000. Innate and adaptive lymphoid cells in the human liver. *Immunological reviews*, 174, pp.5–20.

El-Serag, H.B., 2012. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 142(6), pp.1264–1273.

Emerit, J., Beaumont, C. & Trivin, F., 2001. Iron, free radicals, and oxidative injury. *Biomed Pharmacother*, 55, pp.333–339.

Endo, T. a et al., 1997. A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature*, 387(6636), pp.921–924.

Evans, M.K. et al., 2007. Expression of SOCS1 and SOCS3 genes is differentially regulated in breast cancer cells in response to proinflammatory cytokine and growth factor signals. , (April 2006), pp.1941–1948.

Evel-Kabler, K. et al., 2006. SOCS1 restricts dendritic cells’ ability to break self tolerance and induce antitumor immunity by regulating IL-12 production and signaling. *Journal of Clinical Investigation*, 116(1), pp.90–100.

Exley, M. a & Koziel, M.J., 2004. To be or not to be NKT: natural killer T cells in the liver. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 40, pp.1033–1040.

Farazi, P.A. & DePinho, R.A., 2006. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nature reviews.Cancer*, 6(9), pp.674–687.

Fausto, N., Campbell, J.S. & Riehle, K.J., 2006. Liver regeneration. *Hepatology*, 43(2 SUPPL. 1).

Fausto, N., Campbell, J.S. & Riehle, K.J., 2012. Liver regeneration. *Journal of*

- Hepatology*, 57(3), pp.692–694.
- Fiegel, H.C. et al., 2004. Stem-like cells in human hepatoblastoma. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*, 52(11), pp.1495–501.
- Forbes, S.J. & Rosenthal, N., 2014. Preparing the ground for tissue regeneration: from mechanism to therapy. *Nature medicine*, 20(8), pp.857–69.
- Forner, A., Llovet, J.M. & Bruix, J., 2012. Hepatocellular carcinoma. *The Lancet*, 379(9822), pp.1245–1255.
- Fujiyama, S. et al., 2001. Tumor markers for hepatocellular carcinoma. *Gan to kagaku ryoho. Cancer & chemotherapy*, 28(5), pp.723–732.
- García-Jiménez, C. et al., 2013. A new link between diabetes and cancer: Enhanced WNT/ $\beta$ -catenin signaling by high glucose. *Journal of Molecular Endocrinology*, 52(1).
- Gui, Y. et al., 2015. Regulation of MET receptor tyrosine kinase signaling by suppressor of cytokine signaling 1 in hepatocellular carcinoma. , 34(46), pp.5718–5728.
- Gui, Y. et al., 2011. SOCS1 controls liver regeneration by regulating HGF signaling in hepatocytes. *Journal of Hepatology*, 55(6), pp.1300–1308.
- Hanada, T. et al., 2003. Suppressor of cytokine signaling-1 is essential for suppressing dendritic cell activation and systemic autoimmunity. *Immunity*, 19(3), pp.437–450.
- Harimoto, H. et al., 2013. Inactivation of tumor-specific CD8<sup>+</sup> CTLs by tumor-infiltrating tolerogenic dendritic cells. *Immunology and cell biology*, 91(9), pp.545–55.
- Herath, N.I., Leggett, B. a & MacDonald, G. a, 2006. Review of genetic and epigenetic alterations in hepatocarcinogenesis. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 21(April 2005), pp.15–21.
- Hiroishi, K. et al., 2010. Strong CD8<sup>+</sup> T-cell responses against tumor-associated antigens prolong the recurrence-free interval after tumor treatment in patients with hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastroenterology*, 45(4), pp.451–458.
- Hong, Y.P. et al., 2015. Immunotherapy for hepatocellular carcinoma: From basic research to clinical use. *World J Hepatol*, 7(7), pp.980–992.
- Ilangumaran, S. et al., 2002. A positive regulatory role for suppressor of cytokine signaling 1 in IFN-gamma-induced MHC class II expression in fibroblasts. *Journal of*

- immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 169(9), pp.5010–20.
- Ilangumaran, S., Ramanathan, S., Rottapel, R., et al., 2004. Regulation of the immune system by SOCS family adaptor proteins. *Immunological Reviews*, 224(June), pp.351–365.
- Ilangumaran, S., Ramanathan, S. & Rottapel, R., 2004. Regulation of the immune system by SOCS family adaptor proteins. *Seminars in Immunology*, 16(6), pp.351–365.
- Ilangumaran, S. & Rottapel, R., 2003. Regulation of cytokine receptor signaling by SOCS1. *Immunological reviews*, 192, pp.196–211.
- Jemal, A., Bray, F. & Ferlay, J., 1999. Global Cancer Statistics: 2011. *CA Cancer J Clin*, 49(2), p.1,33-64.
- Jimenez-Lopez, J.M. & Cederbaum, A.I., 2005. CYP2E1-dependent oxidative stress and toxicity: role in ethanol-induced liver injury. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 1(4), pp.671–85.
- Kamizono, S. et al., 2001. The SOCS Box of SOCS-1 Accelerates Ubiquitin-dependent Proteolysis of TEL-JAK2. *Journal of Biological Chemistry*, 276(16), pp.12530–12538.
- Kazi, J.U. et al., 2014. SOCS proteins in regulation of receptor tyrosine kinase signaling. *Cell Mol Life Sci*, 71(17), pp.3297–3310.
- Kazi, J.U. et al., 2014. SOCS proteins in regulation of receptor tyrosine kinase signaling. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 71, pp.3297–310.
- Kim, R., 2007. Cancer Immunoediting: From Immune Surveillance to Immune Escape. In *Cancer Immunotherapy*. pp. 9–27.
- Kim, R., Emi, M. & Tanabe, K., 2007. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. , pp.1–14.
- Kinjyo, I. et al., 2002. SOCS1 / JAB Is a Negative Regulator of LPS-Induced Macrophage Activation. , 17, pp.583–591.
- Kohroki, J. et al., 2005. ASB proteins interact with Cullin5 and Rbx2 to form E3 ubiquitin ligase complexes. *FEBS Letters*, 579(30), pp.6796–6802.
- Korenaga, M. et al., 2005. Hepatitis C virus core protein inhibits mitochondrial electron transport and increases reactive oxygen species (ROS) production. *Journal of*

- Biological Chemistry*, 280(45), pp.37481–37488.
- Krawczyk, C.M., Shen, H. & Pearce, E.J., 2007. Memory CD4 T Cells Enhance Primary CD8 T-Cell Responses *Immunity*, 26(7), pp.3556–3565.
- Lee, J., Suh, W.I. & Shin, E.-C., 2010. T-cell dysfunction and inhibitory receptors in hepatitis C virus infection. *Immune network*, 10(4), pp.120–5.
- Linnebacher, M. & Maletzki, C., 2012. Tumor-infiltrating B cells: The ignored players in tumor immunology. *Oncoimmunology*, 1(7), pp.1186–1188.
- Lizée, G. et al., 2013. Harnessing the power of the immune system to target cancer. *Annual review of medicine*, 64, pp.71–90.
- Llovet, J.M., 2005. Updated treatment approach to hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastroenterology*, 40(3), pp.225–235.
- Marine, J.C. et al., 1999. SOCS1 deficiency causes a lymphocyte-dependent perinatal lethality. *Cell*, 98(5), pp.609–616.
- Martín-Fontecha, A. et al., 2004. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nature immunology*, 5(12), pp.1260–5.
- Melief, C.J.M., 2008. Cancer Immunotherapy by Dendritic Cells. *Immunity*, 29(3), pp.372–383.
- Meunier, M.-C. et al., 2005. T cells targeted against a single minor histocompatibility antigen can cure solid tumors. *Nature medicine*, 11(11), pp.1222–1229.
- Michalopoulos, G.K., 2007. Liver regeneration. *Journal of Cellular Physiology*, 213(2), pp.286–300.
- Moriya, K. et al., 2001. Oxidative Stress in the Absence of Inflammation in a Mouse Model for Hepatitis C. , (2007), pp.4365–4370.
- Naka, T. et al., 1997. Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature*, 387(6636), pp.924–929.
- Naka, T., Narazaki, M. & Hirata, M., 1997. Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. , 387(June), pp.924–929.
- Naugler, W.E. et al., 2007. Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. *Science (New York, N.Y.)*, 317(5834), pp.121–4. Available at: <http://science.sciencemag.org/content/317/5834/121.abstract>.
- Neuwirt, H. et al., 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. *The American journal of pathology*, 174(5), pp.1921–30.
- Nicchitta, C. V., 2003. Re-evaluating the role of heat-shock protein-peptide interactions in tumour immunity. *Nature reviews. Immunology*, 3(5), pp.427–32.
- Nishida, N. et al., 2008. Aberrant Methylation of Multiple Tumor Suppressor Genes in Aging Liver, Chronic Hepatitis, and Hepatocellular Carcinoma.
- O’Hara, S.P. et al., 2013. The dynamic biliary epithelia: Molecules, pathways, and disease. *Journal of Hepatology*, 58(3), pp.575–582.
- Ohashi, P.S. et al., 1991. Ablation of “tolerance” and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice. *Cell*, 65(2), pp.305–317.
- Orange, J.S., 2008. Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse. *Nature reviews. Immunology*, 8(9), pp.713–725.
- Palmer, D.C. & Restifo, N.P., 2009. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) in T cell differentiation, maturation, and function. *Trends in Immunology*, 30(12), pp.592–602.
- Papoulas, M. & Theocharis, S., 2009. Primary liver tumors: origin and target therapy. *Expert opinion on therapeutic targets*, 13(8), pp.957–965.
- Pons, F., Varela, M. & Llovet, J.M., 2005. Staging systems in hepatocellular carcinoma. *HPB: the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association*, 7(1), pp.35–41.
- Quail, D.F. & Joyce, J.A., 2013. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature Medicine*, 19(11), pp.1423–1437.
- Ram, P.A. & Waxman, D.J., 1999. SOCS/CIS protein inhibition of growth hormone-stimulated STAT5 signaling by multiple mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, 274(50), pp.35553–35561.
- Rodríguez-Pinto, D., 2005. B cells as antigen presenting cells. *Cellular Immunology*, 238(2), pp.67–75.
- Rottapel, R. et al., 2002. The tumor suppressor activity of SOCS-1. *Oncogene*, 21(28), pp.4351–4362.
- Ryo, A. et al., 2003. Regulation of NF- $\kappa$ B Signaling by Pin1-Dependent Prolyl

- Isomerization and Ubiquitin-Mediated Proteolysis of p65/RelA. *Molecular Cell*, 12(6), pp.1413–1426.
- Sachdeva, M., Chawla, Y.K. & Arora, S.K., 2015. Immunology of hepatocellular carcinoma. *World journal of hepatology*, 7(17), pp.2080–90.
- Sasi, W., Sharma, A.K. & Mokbel, K., 2014. The role of suppressors of cytokine signalling in human neoplasms. *Molecular biology international*, 2014(Table 1), p.630797.
- Schildberg, F.A., Sharpe, A.H. & Turley, S.J., 2015. ScienceDirect Hepatic immune regulation by stromal cells. *Current Opinion in Immunology*, 32, pp.1–6.
- Schluns, K.S. & Lefrançois, L., 2003. CYTOKINE CONTROL OF MEMORY T-CELL DEVELOPMENT AND SURVIVAL. , 3(April).
- Seki, S. et al., 2000. The liver as a crucial organ in the first line of host defense: the roles of Kupffer cells, natural killer (NK) cells and NK1.1 Ag+ T cells in T helper 1 immune responses. *Immunological reviews*, 174(9), pp.35–46.
- Sepulveda, P. De, Ilangumaran, S. & Rottapel, R., 2000. Suppressor of cytokine signaling-1 ( SOCS1 ) inhibits Vav function through protein degradation \*. , 1(416).
- De Sepulveda, P., Ilangumaran, S. & Rottapel, R., 2000. Suppressor of cytokine signaling-1 inhibits VAV function through protein degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 275(19), pp.14005–14008.
- Shen, L. et al., 2004. Silencing of SOCS1 enhances antigen presentation by dendritic cells and antigen-specific anti-tumor immunity. , 22(12).
- Shen, Y.C. et al., 2010. Adjuvant interferon therapy after curative therapy for hepatocellular carcinoma (HCC): A meta-regression approach. *Journal of Hepatology*, 52(6), pp.889–894.
- Shi, L. et al., 2014. Role of estrogen in hepatocellular carcinoma: is inflammation the key? *Journal of translational medicine*, 12(1), p.93.
- Shultz, L.D. et al., 2005. Human Lymphoid and Myeloid Cell Development in NOD/LtSz-scid IL2R null Mice Engrafted with Mobilized Human Hemopoietic Stem Cells. *Journal of Immunology*, 174(10), pp.6477–6489.
- Siegel, A.B. & Zhu, A.X., 2009. Metabolic syndrome and hepatocellular carcinoma: Two growing epidemics with a potential link. *Cancer*, 115(24), pp.5651–5661.

- Sinha, P., Clements, V.K. & Ostrand-Rosenberg, S., 2005. Interleukin-13-regulated M2 macrophages in combination with myeloid suppressor cells block immune surveillance against metastasis. *Cancer Research*, 65(24), pp.11743–11751.
- Smyth, M.J. et al., 2000. Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *The Journal of experimental medicine*, 191(4), pp.661–668.
- Soini, Y. et al., 1996. An aflatoxin-associated mutational hotspot at codon 249 in the p53 tumor suppressor gene occurs in hepatocellular carcinomas from Mexico. *Carcinogenesis*, 17(5), pp.1007–1012.
- Sprinzi, M.F. & Galle, P.R., 2013. Facing the dawn of immunotherapy for hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, 59(1), pp.9–10.
- Starr, R. et al., 1997. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature*, 387(6636), pp.917–21.
- Starr, R. et al., 2009. SOCS-1 binding to tyrosine 441 of IFN-gamma receptor subunit 1 contributes to the attenuation of IFN-gamma signaling in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 183, pp.4537–4544.
- Sun, C. et al., 2015. Natural killer cell dysfunction in hepatocellular carcinoma and NK cell-based immunotherapy. *Acta Pharmacologica Sinica*, 36(August 2014), pp.1191–1199..
- Swann, J.B. & Smyth, M.J., 2007. Immune surveillance of tumors. *Journal of Clinical Investigation*, 117(5), pp.1137–1146.
- Tian, Y. et al., 2016. Epigenetic Activation of Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in NAFLD-Associated Hepatocarcinogenesis. *Cancers*, 8(8), p.76.
- Trengove, M.C. & Ward, A.C., 2013a. Review Article SOCS proteins in development and disease. , 2(1), pp.1–29.
- Trengove, M.C. & Ward, A.C., 2013b. SOCS proteins in development and disease. *American journal of clinical and experimental immunology*, 2(1), pp.1–29.
- Um, T.H. et al., 2011. Aberrant CpG island hypermethylation in dysplastic nodules and early HCC of hepatitis B virus-related human multistep hepatocarcinogenesis. *Journal of Hepatology*, 54(5), pp.939–947.
- Vanini, F., Kashfi, K. & Nath, N., 2015. The dual role of iNOS in cancer. *Redox Biology*, 6, pp.334–343.

- Walther, Z. & Jain, D., 2011. Molecular pathology of hepatic neoplasms: classification and clinical significance. *Pathology research international*, 2011, p.403929.
- Wang, Z. et al., 2013. Adjuvant therapy for hepatocellular carcinoma: current situation and prospect. *Drug Discoveries & Therapeutics*, 7(4), pp.137–143.
- Wiesner, R.H., 2005. Patient selection in an era of donor liver shortage: current US policy. *Nature clinical practice. Gastroenterology & hepatology*, 2(1), pp.24–30.
- Yasukawa, H. et al., 1999. The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *The EMBO journal*, 18(5), pp.1309–1320.
- Yeganeh, M. et al., 2016. Suppressor of cytokine signaling 1-dependent regulation of the expression and oncogenic functions of p21(CIP1/WAF1) in the liver. *Oncogene*, (November 2015), pp.1–12.
- Yewdell, J.W., Reits, E. & Neefjes, J., 2003. Making sense of mass destruction: quantitating MHC class I antigen presentation. *Nature reviews. Immunology*, 3(12), pp.952–961.
- Yi, Y. et al., 2013. The functional impairment of HCC-infiltrating gammadelta T cells, partially mediated by regulatory T cells in a TGFbeta- and IL-10-dependent manner. *J Hepatol*, 58(5), pp.977–983.
- Yasukawa, H. et al., 1999. The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *The EMBO journal*, 18(5), pp.1309–1320.
- Ying, Y. & Tao, Q., 2009. Epigenetic disruption of the WNT/beta-catenin signaling pathway in human cancers. *Epigenetics: official journal of the DNA Methylation Society*, 4(5), pp.307–312.
- Yoshikawa, H. et al., 2001. SOCS-1, a negative regulator of the JAK/STAT pathway, is silenced by methylation in human hepatocellular carcinoma and shows growth-suppression activity. *Nature genetics*, 28(may), pp.29–35.
- Yoshimura, A. et al., 2003. Negative regulation of cytokine signaling influences inflammation. *Current Opinion in Immunology*, 15(6), pp.704–708.
- Yoshimura, A., Naka, T. & Kubo, M., 2007. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nature reviews. Immunology*, 7(6), pp.454–465.

- Yu, G.Y. et al., 2012. Hepatic Expression of HCV RNA-Dependent RNA Polymerase Triggers Innate Immune Signaling and Cytokine Production. *Mol Cell*, pp.1–22.
- Zhang, J. et al., 2012. Enhanced activation of human dendritic cells by silencing SOCS1 and activating TLRs simultaneously. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 61(10), pp.1653–1661.
- Zimmermann, A., 2004. Regulation of liver regeneration. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 19(SUPPL. 4).
- Zitvogel, L. et al., 2008. The anticancer immune response: Indispensable for therapeutic success? *Journal of Clinical Investigation*, 118(6), pp.1991–2001.