

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11
FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHÂTENAY-MALABRY

ECOLE DOCTORALE :
INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ
PÔLE : SIGNALISATION CELLULAIRE

ANNÉE 2008 – 2009

SÉRIE DOCTORAT N° 1025

THÈSE

Présentée

À L'UNITÉ DE FORMATION ET DE RECHERCHE
FACULTE DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY
UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

par

Lyne VALENTINO

Titre de la thèse :

ROLE DE LA PROTEINE SOCS-1 DANS LA PROGRESSION TUMORALE COLIQUE

soutenue le : 30 Septembre 2009

JURY :	Pr. Christian POÛS	Président
	Pr. Olivier COQUERET	Rapporteur
	Dr. Serge ROCHE	Rapporteur
	Dr. Muriel JACQUIER-SARLIN	Examinatrice
	Dr. Josiane PIERRE	Directrice de thèse

LISTE DES ABBREVIATIONS.....	4
INDEX DES FIGURES :.....	6
AVANT-PROPOS.....	7
INTRODUCTION.....	9
A/ SIGNALISATION ET REGULATION DES EFFETS DES CYTOKINES.....	10
A.1 SIGNALISATION DES CYTOKINES.....	10
A.1.1 Récepteur de cytokine.....	10
A.1.2 Voies de signalisation activées par les cytokines.....	11
A.1.3 La voie JAK/STAT dans les cancers.....	21
A.2 REGULATION NEGATIVE DE LA SIGNALISATION DES CYTOKINES.....	23
A.2.1 Les phosphotyrosines phosphatases (SHPs, CD45).....	23
A.2.2 Les protéines PIAS (Protein Inhibitor of Activated STAT).....	26
A.2.3 Les protéines de la famille SOCS (et la protéine CIS).....	27
Conclusion.....	30
B/ SOCS-1 : FONCTIONS ET REGULATION.....	31
B.1 LES FONCTIONS BIOLOGIQUES DE LA PROTEINE SOCS-1.....	31
B.1.1 Régulation de la voie de signalisation JAK/STAT par la protéine SOCS-1.....	31
B.1.2 La protéine SOCS-1, régulateur clé des signaux induits par l'IFN- γ	35
B.1.3 La protéine SOCS-1 inhibe l'activité d'oncogènes variés.....	38
B.1.4 SOCS-1 participe à la dégradation protéasomale de protéines.....	40
B.1.5 La protéine SOCS-1 et le trafic intracellulaire.....	44
B.1.6 La protéine SOCS-1 dans l'immunité.....	45
B.1.7 Evaluation des partenaires de la protéine SOCS-1.....	46
B.2 REGULATION DE L'EXPRESSION DE LA PROTEINE SOCS-1.....	49
B.2.1 La méthylation de l'ADN génomique.....	49
B.2.2 La régulation transcriptionnelle.....	51
B.2.3 La répression traductionnelle.....	52
B.2.4 La stabilisation de la protéine.....	53
B.3 LES AUTRES PROTEINES DE LA FAMILLE SOCS.....	54
B.3.1 La protéine SOCS-3.....	54
B.3.2 Les protéines CIS et SOCS-2.....	56
B.3.3 Les protéines SOCS-4 et SOCS-5.....	57
B.3.4 Les protéines SOCS-6 et SOCS-7.....	58
B.4 L'EXPRESSION DES PROTEINES DE LA FAMILLE SOCS CHEZ LES AUTRES ESPECES.....	59
Conclusion.....	61
C/ LE CANCER COLORECTAL.....	62
C.1 LA PAROI COLORECTALE : STRUCTURE ET HOMEOSTASIE.....	62
C.1.1 Structure de la paroi colorectale.....	62
C.1.2 Homéostasie de l'épithélium intestinal.....	62
C.2 CANCEROGENESE COLIQUE : HISTOLOGIE ET EVENEMENTS MOLECULAIRES.....	64
C.2.1 Les lésions précancéreuses du colon.....	64
C.2.2 Les modèles de cancérogenèse colique.....	65
C.2.3 Les principales voies de signalisation impliquées dans la cancérogenèse colorectale.....	68
Conclusion.....	71
C.3 FORMATION DES METASTASES ET MODELE DE L'EMT.....	72
C.3.1 Le processus métastatique.....	72
C.3.2 Origine des métastases.....	77
C.4. LES MECANISMES D'INHIBITION DE L'EXPRESSION DE LA E-CADHERINE DANS LES CANCERS.....	81
C.4.1 Mutations génétiques et méthylation de l'ADN.....	82
C.4.2 Régulation transcriptionnelle et MicroRNAs.....	82
C.4.3 Régulations post-traductionnelles.....	83
RESULTATS.....	86
PRESENTATION DU TRAVAIL DE THESE.....	87

ARTICLE 1	89
ARTICLE 2	101
RESULTATS COMPLEMENTAIRES	123
DISCUSSION	131
REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DU GENE Socs-1 EN REponse A L'IFN- γ	132
<i>Comparaison structurale du promoteur humain et du promoteur murin du gène Socs-1 :</i>	132
<i>Les facteurs de transcription de la famille SP</i>	133
<i>Mécanisme d'action du facteur Sp2 sur le promoteur humain du gène Socs-1</i>	134
REEXPRESSION DE LA PROTEINE SOCS-1 ET TRANSFORMATION DU PHENOTYPE	
METASTATIQUE	135
<i>Répression de l'expression du gène Socs-1 dans les cellules SW620 et conséquences de la réexpression de la protéine</i>	136
<i>L'hypothèse d'une perturbation du trafic post-golgien dans les cellules SW620</i>	137
<i>Un rôle de la p120^{cas}?</i>	139
<i>Perspectives expérimentales</i>	142
CONCLUSION.....	144
ANNEXE.....	149
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	160

LISTE DES ABBREVIATIONS

GH: Growth Hormone

PRL: Prolactine

LIF: Leukemia Inhibitory Factor

EPO: érythropoïétine

IL-: Interleukine

CNTF: Ciliary neurotrophic factor

GM-CSF: Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor

G-CSF: Granulocytes Colony Stimulating Factor

OSM: Oncostatin M

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase

aa: acide aminé

ATP: adénosine triphosphate

JAK: Janus Kinase

JH: Janus Homology

STAT: Signal Transducers and Activators of Transcription

SH2: Src homology 2

CDK: Cyclin-dependant kinase

PI3K: Phosphoinositide 3 Kinase

IRS: Insulin Receptor Substrat

ERK: Extracellular signal Regulated Signal

JNK: c-Jun N-terminal Kinase

SOCS: Suppressor Of Cytokine Signalling

PIAS: Protein Inhibitors of Activated Stat

CIS: cytokine-inducible SH2 protein

IFN: Interferon

PTP: Protein Tyrosine Phosphatase

PGDF: Platelet-Derived-Growth-Factor

EGF: Epidermal Growth Factor

IGF: insulin-like growth factor

ABL: Abl protein Tyrosine Kinase

MTOC: Microtubule-organizing center

FERM: Four-point-one ezrin, radixin, moesin
HGF: Hepatocyte Growth Factor
FGF: Fibroblast Growth Factor
ESS: Extended SH2 Subdomain
KIR: Kinase Inhibitory Region
FAP: Familial Adenomatous Polyposis
TGF- β : Transforming Growth Factor bêta
BDNF: Brain-Derived Neurotrophic Factor
LPS: LipoPolySaccharide
SCF: Stem Cell Factor
GEF: Guanine Exchange Factor
FAK: Focal Adhesion Kinase
TLR: Toll Like Receptor
UTR: UnTranslated Region
ORF: Open Reading Frame
NF κ B: Nuclear Factor κ B
EMT: Epithelial to Mesenchymal Transition
MET: Mesenchymal to Epithelial Transition
MEC: Matrice Extra-Cellulaire
RTK: Receptor Tyrosine Kinase
PCM 1: Pericentriolar material 1
ETV6: Ets translocation variante gene 6
MSP: PCR Méthylation Spécifique
TGN : Trans Golgi Network
PGC : Post Golgi Carriers
NEM : N-EthylMaleïmide
NES : Nuclear export signal
NLS : Nuclear-localization signal
PTHrP : parathyroid-hormone-related protein
CCR : Cancer ColoRectal

Index des figures :

- Figure 1** : Structure des protéines de la famille JAK
Figure 2 : Structure des protéines de la famille STATs
Figure 3 : Mécanismes d'activation de la voie JAK/STAT
Figure 4 : Spécificité d'association des kinases JAK avec les récepteurs de cytokine
Figure 5 : Les mutations de la protéine kinase JAK2 dans les cancers
Figure 6 : Structure des protéines PIAS
Figure 7A : Structure et fonctions de la protéine SOCS-1
Figure 7B : Régulation de la voie JAK/STAT par la protéine SOCS-1
Figure 8 : Les étapes de l'ubiquitination
Figure 9 : L'interaction entre le domaine SOCS-box et les élongines B et C
Figure 10 : Les partenaires de la protéine SOCS-1
Figure 11 : La méthylation de l'ADN
Figure 12 : Structure du gène *Socs-1*
Figure 13 : Schéma de la région 5'UTR du gène *Socs-1*
Figure 14 : L'homologie de séquence entre les membres de la famille de protéines SOCS
Figure 15 : Mécanismes d'actions comparées des protéines SOCS-1 et SOCS-3
Figure 16 : Structure tridimensionnelle de la protéine SOCS-2
Figure 17 : Structure tridimensionnelle de la protéine SOCS-4
Figure 18 : Arbre phylogénétique des protéines SOCS-1 et JAK-2
Figure 19 : Structure de la paroi colrectale
Figure 20 : Mécanismes de l'homéostasie intestinale
Figure 21 : Progression histologique et moléculaire des adénocarcinomes coliques
Figure 22 : La voie de signalisation Wnt
Figure 23 : Le processus métastatique
Figure 24 : Modèle dynamique de l'EMT
Figure 25 : Structure de la région promotrice proximale du gène *Cdh-1* et ses éléments de régulation
Figure 26 : Trafic intracellulaire de la E-cadherine et localisation de différentes protéines de la famille des GTPases Rab
Figure 27 : Modèle d'inhibition de l'activation de la kinase FAK par la protéine SOCS-1
Figure 28 : Comparaison de la région proximale du promoteur humain et du promoteur murin du gène *Socs-1*
Figure 29 : Structure des facteurs de transcription de la famille Sp
Figure 30 : Structure la protéine p120 catenine
Figure 31 : Mécanismes impliquant l'inflammation dans la cancérogenèse

Tableau 1 : Conséquences de l'inactivation des gènes codants pour les facteurs STATs dans le modèle murin

Tableau 2 : Induction de l'expression des protéines de la famille SOCS et leurs implications dans la régulation des voies de signalisation des cytokines

Tableau 3 : Les troubles relevés chez les souris *Socs-1*^{-/-}

Tableau 4 : Les partenaires de la protéine SOCS-1

AVANT-PROPOS

La signalisation cellulaire permet normalement une régulation fine de mécanismes cellulaires fondamentaux comme la différenciation et la prolifération cellulaire. L'intégration des signaux biochimiques par les cellules permet de maintenir un équilibre physiologique dans les différents ensembles tissulaires. Ces signaux activent un ensemble de voies de signalisation qui doivent normalement s'inter-réguler de façon coordonnée. La signalisation débute par la fixation d'un ligand sur son récepteur membranaire. Cette liaison provoque l'activation du récepteur puis le recrutement de seconds messagers et conduit à une cascade biochimique dont résulte l'activation de la cellule (apoptose, prolifération, migration, entrée en cycle...). Par différents mécanismes (expression de récepteurs membranaires altérés, surexpression de récepteurs natifs, mutations génétiques...) la cancérogenèse s'appuie largement sur la dérégulation de voies de signalisation (la voie Ras-MAPK, la voie Wnt...).

Schématiquement, la cancérogenèse compte en trois étapes. La lésion définitive de l'ADN qui sera transmise aux cellules filles marque l'initiation. Suit, l'étape de promotion. Il s'agit de la période de prolifération clonale des cellules initiées sous l'action de promoteurs tumoraux (agents chimiques, hormones stéroïdiennes, inflammation chronique...). Le cancer entre ensuite dans une phase dite de progression. Les cellules acquièrent alors progressivement des caractéristiques de plus en plus malignes. Le phénotype transformé qui en résulte est propre aux cellules cancéreuses. Il est défini par 6 modifications physiologiques majeures : la résistance à l'apoptose, indépendance vis-à-vis des facteurs de croissances, insensibilité aux antimitotiques, capacité d'invasion locale et métastatique, aptitude à la prolifération illimitée et capacité d'angiogenèse (Hanahan and Weinberg, 2000).

Les métastases sont les principales responsables de la morbidité des cancers. Pourtant notre connaissance des mécanismes d'invasion et de dissémination des cellules tumorales est incomplète. Des résultats récents viennent remettre en cause la vision traditionnelle de l'invasion tumorale à partir d'une tumeur primaire. Ces nouvelles données impliquent la possibilité d'une dissémination métastatique qui aurait en fait lieu tout au long du développement de la tumeur primaire. Cette suggestion soulève de très nombreuses questions sur les mécanismes mis en jeu, les phénotypes cellulaires engendrés, la chronologie des événements... (Weinberg, 2008). Il est donc certain que la caractérisation de la progression tumorale requière encore de très nombreuses investigations.

L'introduction de ce mémoire de thèse portera sur les mécanismes de transduction et de régulation des signaux provenant des cytokines. La voie de signalisation JAK/STAT et sa régulation négative y seront particulièrement traitées. L'étude bibliographique se concentrera ensuite sur les fonctions biologiques de la protéine SOCS-1. Dans un troisième temps, je présenterai certains mécanismes fondamentaux de la cancérogenèse colique. Cette partie insistera sur la problématique des métastases.

La présentation du travail de thèse et des résultats expérimentaux sera suivie d'une discussion.

INTRODUCTION

A/ SIGNALISATION ET REGULATION DES EFFETS DES CYTOKINES

Sécrétées par de nombreux types cellulaires, les cytokines ont des cibles très diverses et sont à l'origine d'effets biologiques importants. Ces effets passent par la liaison d'une cytokine à un récepteur membranaire spécifique et l'activation de plusieurs cascades de signalisation.

A.1 Signalisation des cytokines

A.1.1 Récepteur de cytokine

A cause de leur homologie de séquence, les récepteurs membranaires de nombreuses cytokines et de facteurs de croissance hématopoïétiques sont désignés sous le terme générique de « récepteurs de cytokines » (Wang et al., 2009b). Cette famille regroupent les récepteurs hormonaux (GH, PRL, CNTF), les récepteurs du GM-CSF, du G-CSF, du LIF, de l'EPO, de l'oncostatine M et les récepteurs de facteurs de croissance hématopoïétiques (IL-2, IL-3, IL-9...) (Ihle, 1995).

Les récepteurs de cytokines ont une structure complexe. Ils contiennent souvent plusieurs chaînes polypeptidiques codées par des gènes distincts. Les récepteurs se forment par oligomérisation de plusieurs chaînes polypeptidiques. Certains récepteurs ont une ou plusieurs chaînes polypeptidiques en commun. Par exemple, la chaîne gp130 est partagée par les récepteurs de l'IL-6, du LIF, du CNTF, de l'oncostatine M et de l'IL-11 (Boulanger and Garcia, 2004). Ce partage des chaînes polypeptidiques est à l'origine d'une certaine redondance dans les voies de signalisation activées en aval et par conséquent, des effets biologiques des cytokines. Mis à part le récepteur du CNTF qui est ancré à la membrane via un glycosylphosphatidylinositol (GPI), les récepteurs de cytokine présentent tous un domaine transmembranaire unique (Ozaki and Leonard, 2002). Des analogies structurales sont aussi observées au niveau des domaines extracellulaires. Ces derniers comportent tous un module de 210 acides aminés relativement conservés et en particulier au niveau de la séquence WSXWS (Trp-Ser-acide aminé- Trp-Ser), proche du domaine transmembranaire. Dans la région N-terminale, deux paires de cystéines engagées dans des liaisons disulfures intra-chaînes participent à la liaison du ligand. Un certain nombre de récepteur présentent des modules structuraux supplémentaires (duplication du module de 210 aa, répétitions de type fibronectine...) mais ils ne sont pas impliqués dans la fixation du ligand. Les récepteurs de cytokines ne possèdent pas de site de fixation pour l'ATP. La séquence de leur domaine intra-

cytoplasmique ne présente aucune homologie avec les protéines serine/thréonine kinases ou tyrosines kinases.

A.1.2 Voies de signalisation activées par les cytokines

A.1.2.1 La voie de signalisation JAK/STAT

La liaison d'une cytokine à son récepteur membranaire spécifique entraîne la multimérisation de ce récepteur. A cette occasion, les protéines kinases JAK (Janus Kinase) qui y sont associées se trans-phosphorylent, et phosphorylent ensuite des résidus tyrosine spécifiques du domaine intra-cytoplasmique des chaînes du récepteur. Des sites d'ancrage (docking domains) qui permettent le recrutement d'autres protéines de signalisation contenant des domaines SH2 (Src Homology Domain 2), sont ainsi créés.

Les facteurs de transcription de la famille STATs (Signal Transducers and Activators of Transcription) possèdent un domaine SH2. Ces protéines sont recrutées au niveau du récepteur activé. Elles sont à leur tour phosphorylées par les JAKs. Elles quittent ensuite le récepteur pour former des dimères dans le cytoplasme et transloquer dans le noyau où elles vont réguler l'expression de gènes cible (Rawlings et al., 2004b).

Pour un type cellulaire donné, les cytokines induisent des réponses spécifiques via la voie JAK/STAT. Cette précision est essentiellement assurée par la spécificité des récepteurs membranaires et la combinatoire des protéines JAKs et des protéines STATs activées (Murray, 2007).

- les protéines de la famille JAK (Janus Kinase)

La famille des protéines JAK compte quatre membres : JAK1, JAK2, TYK2 et JAK3. L'expression de JAK3 est restreinte aux cellules hématopoïétiques (cellules NK, thymocytes, cellules T et B, cellules myéloïdes) alors que JAK1, JAK2 et TYK2 sont d'expression ubiquitaire (Gurniak and Berg, 1996) (Darnell et al., 1994).

Les protéines JAKs sont constituées de sept domaines conservés appelés JAK Homology (JH), et numérotés de 1 à 7 en partant du domaine C-terminal (**figure 1**).

- Le **domaine JH1** est le domaine catalytique. Il contient les résidus aminés tyrosine conservés et impliqués dans l'autorégulation de l'activité kinase. La phosphorylation de ces tyrosines est nécessaire à l'activation de JAK1, JAK2 et TYK2 (Liu et al., 1997).

- le **domaine JH2** est le domaine pseudo-kinase. Il ne possède pas d'activité catalytique propre mais il est néanmoins nécessaire à la fonction catalytique des JAKs (Rane and Reddy,

2000) (Saharinen et al., 2000). En absence du domaine JH2, l'activité kinase des JAKs est fortement augmentée (Frank et al., 1994) (Feener et al., 2004). Ces observations supposent donc un rôle inhibiteur du domaine JH2. D'autre part, le domaine JH2 de JAK1, JAK2 et JAK3 s'associe avec les facteurs de transcription de la famille STATs (Arora et al., 2003) (Clevenger, 2004).

- Les **domaines JH3 à JH7** forment le domaine N-terminal et sont impliqués dans l'association des JAKs aux récepteurs des cytokines. Ils permettent aussi le recrutement d'autres substrats. Les domaines JH4 à JH7 forment un motif FERM (Four-point-one, Ezrin, Radixin, Moesin). Les motifs FERM sont impliqués dans des interactions protéine/protéine et notamment dans les interactions avec les récepteurs (Giordanetto and Kroemer, 2002). Ce motif semble ainsi être impliqué dans l'interaction entre JAK1 et la chaîne gp130 de certains récepteurs de cytokines tels que le récepteur à l'IL-6 (Hilkens et al., 2001).



Figure 1 : Structure des protéines de la famille Janus Kinase (JAK)

Les protéines JAKs sont constituées de 7 domaines d'homologie caractéristiques appelés domaines JH. Ils sont numérotés à partir de l'extrémité carboxy-terminale. Le domaine JH1 est le domaine kinase. Il contient la tyrosine phosphorylable qui permet l'activation de la protéine. Le domaine JH2 est le domaine pseudo-kinase, il permet l'interaction des protéines JAK avec les protéines STATs. Enfin, les domaines JH3 à JH7 permettent des interactions avec d'autres protéines, notamment les chaînes des récepteurs de cytokines.

Généralement, les protéines de la famille JAK sont présentes dans le cytoplasme sous forme inactive. La liaison du ligand provoque l'oligomérisation du récepteur. Les JAKs constitutivement associées au récepteur sont alors activées.

L'agrégation des JAKs provoque leur auto- ou transphosphorylation et augmente leur activité kinase. Les protéines STATs sont des substrats préférentiels des kinases JAKs activées (Darnell, 1997).

- les protéines de la famille STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription)

Les protéines STATs sont des facteurs de transcription. Chez les mammifères, les protéines de la famille STAT sont au nombre de 7 (en dehors des épissages alternatifs et des modifications post-traductionnelles): STAT-1, STAT-2, STAT-3, STAT-4, STAT-5A, STAT-5B et STAT-6

(Ihle et al., 1997). Bien que codées par des gènes différents, toutes les protéines de la famille STAT présentent une forte homologie de séquence et partagent une structure protéique commune (Levy and Darnell, 2002). Les protéines STATs se caractérisent par trois domaines fonctionnels conservés (**figure 2**).



Figure 2 : Structure des protéines de la famille STATs

Les protéines de la famille STAT comportent trois principaux domaines fonctionnels. Le domaine de liaison à l'ADN (DBD) permet à ces facteurs de transcription de se lier spécifiquement à l'ADN. Le domaine SH2 permet le recrutement des protéines STATs au récepteur puis la formation des dimères de STATs activées. Dans la région C-terminale se trouvent des éléments nécessaires à la régulation de l'activité des STATs : le domaine de transactivation et le résidu aminés tyrosine conservé phosphorylé par les protéines JAKs (**Y**).

- Le DBD (DNA Binding Domain) :

Le DBD permet l'interaction des protéines STAT avec l'ADN. Les membres de la famille STAT se fixent sur une séquence palindromique consensus de type TTCN₍₃₋₄₎GAA (où N est une base quelconque). Ces séquences sont appelées séquences GAS (Gamma Activated Sequence) (Darnell, 1997).

- Le domaine SH2

Les domaines SH2 sont parmi les domaines fonctionnels les plus répandus dans les protéines. En reconnaissant de manière spécifique des résidus aminés tyrosine phosphorylés, les domaines Src homology 2 permettent la formation de complexes protéiques pendant les cascades de signalisation intercellulaire (Machida and Mayer, 2005). Le domaine SH2 permet aux protéines de la famille STAT d'interagir avec les tyrosines phosphorylées du récepteur de cytokine activé ou avec les protéines JAK phosphorylées. Il participe aussi à la formation de dimères de protéines STAT (Hebenstreit et al., 2006). L'interaction entre le résidu tyrosine phosphorylé d'une première protéine STAT avec le domaine SH2 d'une seconde permettant la formation d'homo ou d'hétérodimères. Les travaux de Chen et al suggèrent que le domaine SH2 pourrait aussi intervenir dans la stabilisation de la liaison STAT/ADN (Chen et al., 1998).

- Le TAD (domaine de transactivation)

Situé en C-terminal, le TAD permet le recrutement des co-activateurs transcriptionnels CBP/p300 et/ou NCoA (Gingras et al., 1999) (Litterst and Pfitzner, 2002) (Wojciak et al., 2009). La région C-terminale des protéines STAT-1, STAT-3, STAT-4 et STAT-5 comporte un motif conservé: Pro Met Ser Pro. Cette séquence permet une régulation *in-vitro* de STAT-1 et STAT-3 par les protéines MAPs kinases (David et al., 1995b). Le résidu Serine (Ser 727 pour STAT-1 et STAT-3) de ce motif peut aussi être phosphorylé en réponse aux cytokines (Zhu et al., 1997). Cette phosphorylation en sus de la phosphorylation sur tyrosine permettrait d'activer la fonction transcriptionnelle des dimères de protéines STATs de façon maximale (Wen and Darnell, 1997). Quelques auteurs rapportent que la phosphorylation sur ce résidu serine est également associée à une répression directe (Chung et al., 1997b) ou indirecte (Jain et al., 1998) (Sengupta et al., 1998) de l'activation des STATs par phosphorylation sur tyrosine. La phosphorylation sur résidu serine pourrait donc avoir plusieurs rôles en fonction des contextes mais les mécanismes sont encore mal connus.

- le domaine d'oligomérisation

Le domaine N-terminal des STATs, via un motif coiled-coil, serait impliqué dans des interactions avec d'autres protéines et dans la formation de tétramères de protéines STATs (Xu et al., 1996) (Levy and Darnell, 2002). Le domaine N-terminal participerait à l'organisation spatiale des tétramères de STATs. En son absence, les dimères de protéines STATs ne peuvent pas s'associer (Chen et al., 2003a).

Le rôle crucial des facteurs STATs dans l'expression des gènes activés par les cytokines a été largement démontré (Calo et al., 2003). Le facteur STAT-2 est connu pour être activé en réponse à l'IFN- α , STAT-4 est activé par l'IL-12 ainsi que l'IFN- α et STAT-6 est lui, seulement activé par l'IL-4 et l'IL-13. Les facteurs STAT-1, STAT-3, STAT-5A et STAT-5B, par contre, peuvent être activés par de nombreuses cytokines. Le facteur STAT-3 est activé par les cytokines de la famille de l'IL-6, par l'EGF et la leptine. Initialement il a été montré que STAT-1 était activé par l'IFN- α et l'IFN- γ . Depuis, d'autres études biochimiques ont démontrés que le facteur STAT-1 est aussi activé en réponse à une large gamme de cytokines dont l'IL-6, le PGDF, l'IL-2 et le GM-CSF. Par ailleurs, la GH, l'EPO, le GM-CSF, l'IL-2 et l'IL-3 activent les facteurs STAT-5A et STAT-5B (Bromberg and Darnell, 2000) (Ihle and Kerr, 1995). Mais plusieurs autres stimuli peuvent provoquer la phosphorylation des facteurs STATs sur résidus tyrosine. Les facteurs STATs peuvent être activés en réponse à la fixation

de facteurs de croissance sur leur récepteur (EGF, PGDF) (David et al., 1996). Les facteurs STATs peuvent aussi être phosphorylés par des kinases qui ne sont pas des récepteurs. Ces kinases sont souvent d'origines virales ou issues de réarrangement chromosomiques. Par exemple, les facteurs STAT-3 et STAT-5 sont des cibles privilégiées des kinases v-Src et BCR-Abl (Bowman et al., 2000; Danial and Rothman, 2000).

Les fonctions biologiques des protéines STATs ont été mises en évidence grâce à des expériences d'inactivation de gène chez la souris (Akira, 1999) (Bromberg and Darnell, 2000) (**tableau 1**). Ces travaux démontrent l'implication des STATs dans des mécanismes cellulaires fondamentaux (différenciation, prolifération...)

Gène inactivé	Conséquences chez la souris KO
STAT-1	Altération de la réponse aux interférons Sensibilisation aux infections virales et bactériennes (Durbin 1996, Meraz 1996)
STAT-4	Altération de la prolifération des lymphocytes T activés en réponse à l'IL-12 (Thierfelder 1996)
STAT-6	Altération de la prolifération des lymphocytes T activés en réponse à l'IL-4 (Kaplan 1996)
STAT-5A	Défauts de développement de la glande mammaire et de la lactation pendant la gestation (Liu 1997)
STAT-5B	Expression génique dismorphique au niveau du foie (Udy 1997)
STAT-5A et STAT-5B	Femelles stériles Altération de la fonction immunitaire (Teglund 1998)
STAT-2	Léthal (Kimura 1996)
STAT-3 KO conditionnel	Léthal (Takeda 1997) <u>Dans les cellules T</u> : inhibition de l'apoptose induite par l'IL-6 Altération de la prolifération régulée par l'IL-2 et l'IL-6 <u>Dans les macrophages</u> : Augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, TNF- α , IFN- γ) <u>Dans les neutrophiles</u> : Absence de la réponse anti-inflammatoire induite par l'IL-10 Pas d'inhibition de la production de cytokine en réponse à l'IL-10 Entérocolite chronique

Tableau 1 : Conséquences de l'inactivation des gènes codants pour les protéines STATs dans le modèle murin.

Les effets des protéines STATs reposent sur leur capacité à réguler l'expression de nombreux gènes. Pour cela, les facteurs STATs doivent transloquer dans le noyau. Il a été démontré que l'intégrité du seul résidu leucine 407 du facteur STAT-1 est indispensable à sa relocalisation nucléaire. La protéine mutante STAT-1 Leu407Ala, bien qu'activable en réponse aux

interférons et capable de se fixer à l'ADN (*in-vitro*) ne transloque jamais dans le noyau (McBride et al., 2002). En fait, le résidu Leu407 est le site de liaison de l'importine- $\alpha 5$, responsable de l'import nucléaire du facteur STAT-1 (Melen et al., 2003). La comparaison des structures cristallographiques des monomères de protéine STAT-1 et des dimères associés à l'ADN a permis de mettre en évidence le mécanisme d'activation de la translocation nucléaire du facteur. Dans les dimères non activés, les monomères de STAT-1 sont en position antiparallèle et le résidu Leu407 masqué. Ils ne peuvent donc pas être reconnus par l'importine- $\alpha 5$. La phosphorylation du facteur STAT-1 provoque un changement de conformation des monomères. Le résidu tyrosine phosphorylé de l'un interagissant avec le domaine SH2 de l'autre, et inversement. Cette configuration permet la fixation de l'importine- $\alpha 5$ et l'import nucléaire (Chen et al., 1998; Mao et al., 2005). Les acides aminés basiques Arg409 et Lys415 du domaine de liaison à l'ADN du facteur STAT-2 semblent aussi être impliqués dans des interactions avec l'importine- $\alpha 5$ (Melen et al., 2003). Par contre, les protéines STAT-2 ne formant pas d'homodimères, la présence du facteur STAT-1 est indispensable à l'accumulation nucléaire de STAT-2. Une fois activés, la conformation des hétérodimères permet la fixation de l'importine- $\alpha 5$ (Banninger and Reich, 2004). Contrairement au facteur STAT-1 dont la translocation nucléaire n'intervient qu'après phosphorylation sur tyrosine, le facteur STAT-2 non-activé peut aussi être nucléaire. Cette relocalisation dépend d'une interaction avec le facteur de transcription IRF-9. La protéine IRF-9 présente dans sa portion amino-terminale, une NLS reconnue par les importines $\alpha 3$, $\alpha 4$ et $\alpha 7$. Ainsi, en absence du facteur IRF-9 ou en cas d'inhibition de l'interaction IRF-9/STAT2, la protéine STAT-2 non-activée demeure cytoplasmique (Banninger and Reich, 2004). Le facteur STAT-3 semble entrer et sortir du noyau de manière constitutive et indépendamment de son statut de phosphorylation (Liu et al., 2005). La protéine présente des séquences NLS et NES intrinsèques. Les domaines d'import nucléaires de la protéine STAT-3 sont spécifiquement reconnus par les importines $\alpha 3$ et $\alpha 6$. L'inhibition de l'expression de l'importine- $\alpha 3$ par interférence ARN provoque une accumulation du facteur STAT-3 à l'extérieur de la membrane nucléaire (Liu et al., 2005). Parallèlement, les monomères de protéine STAT-3 peuvent s'hétérodimériser avec des monomères de STAT-1 activés. Ce phénomène pourrait augmenter la quantité de protéine STAT-3 présente dans le noyau après une stimulation par certains facteurs de croissance ou hormones (OSM, IFN, EGF...) (Reich and Liu, 2006). Après sa phosphorylation, le facteur STAT-5B s'accumule dans le noyau selon le même mécanisme que le facteur STAT-1 (Zeng et al., 2002). A l'instar de la protéine STAT-3, le facteur STAT-5 non-activé navigue constitutivement entre le noyau et le

cytoplasme. Cette propriété dépend d'une ou plusieurs séquences non précisément caractérisée(s) du domaine N-terminal (Zeng et al., 2002).

Naturellement après avoir régulé l'expression génique, les facteurs STATs ressortent du noyau. D'autres mécanismes, dits d'export nucléaires sont alors mis en jeu (Reich and Liu, 2006). Les séquences NES des protéines STATs sont alors souvent reconnues par la protéine CRM1 (Reich and Liu, 2006). Étonnement peu d'éléments concernant le transport nucléaire du facteur de transcription STAT-6 sont disponibles à ce jour.

La question de la régulation des facteurs de transcription de la famille STAT par méthylation reste ouverte. En effet, un modèle dans lequel la méthylation du facteur STAT-1 sur son résidu Arg31 est nécessaire à sa régulation négative par les protéines PIAS et TcPTP a été proposé par l'équipe de Mowen et al (Mowen et al., 2001; Zhu et al., 2002). De la même façon, il a été rapporté que la méthylation sur résidu argine participerait à la régulation de la fonction du facteur STAT-6 (Chen et al., 2004). Pourtant en utilisant des techniques en parties identiques (inhibiteurs de la méthylation, protéines mutantes, anticorps dirigé contre le résidu Arginine méthylé) l'équipe de Behrmann n'a pas réussi à mettre en évidence la méthylation des facteurs STAT-1 ou STAT-3 (Komyod et al., 2005).

La dégradation des facteurs STAT par le protéasome pourrait être un mécanisme de régulation de leur activité transcriptionnelle. Mais à ce jour, ce phénomène n'a été observé que pour les facteurs STAT-1 et STAT-2 dans des cellules infectées par certains virus (Precious et al., 2005). Les conséquences de ce phénomène sur l'activité transcriptionnelle des facteurs STAT n'a pas été mesuré et sa relevance physiopathologique n'a pas été mise en évidence.

Les gènes cibles des facteurs STATs ont été mis en évidence par l'utilisation de mutants dominants actifs (Bromberg, 2002). Il a ainsi été démontré que STAT-3 régule l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL (de la famille Bcl-2), de la cycline D1 et du facteur de transcription c-Myc (Bromberg and Darnell, 1999) (Kiuchi et al., 1999). Récemment, il a été rapporté que la présence du facteur STAT3 était nécessaire à la transformation cellulaire par l'oncogène Ras. Cette fonction s'appuierait non pas sur la fonction transcriptionnelle du facteur STAT-3, mais sur sa capacité de se localiser au niveau de la mitochondrie où il régulerait l'activité métabolique (Gough et al., 2009).

Une régulation de l'expression de la cycline D1 par le facteur STAT-5 a aussi été observée dans des cellules dérivées de leucémies (de Groot et al., 2000). Avec trois séquences GAS dans sa région promotrice, le gène codant pour la protéine inhibitrice du cycle cellulaire

p21Waf/CIP1, est régulée par les facteurs STAT-1 et STAT-3 (Barre et al., 2003) (Bellido et al., 1998).

En s'associant avec les protéines Cdk4 ou Cdk6, la cycline D1 contrôle la progression du cycle cellulaire de la phase G1 à la phase S (Malumbres and Barbacid, 2009). Avec la protéine Bcl-2, la protéine Bcl-X1 intervient dans l'inhibition de la voie apoptotique à départ mitochondrial (Kim et al., 2006). Le facteur de transcription c-myc régule à la fois la prolifération cellulaire et la survie cellulaire. Et bien qu'il soit associé à un arrêt du cycle cellulaire, un niveau élevé de la protéine p21 est observé dans certaines tumeurs (Sparrow et al., 1998). Il semble que la protéine p21 puisse participer à la formation des complexes cyclineD1/CDK en tant que protéine échafaudage. Les gènes codants pour les protéines p21, cycline D1 et Bcl-X1 ne sont pas les seules cibles des facteurs STATs. Mais elles reflètent la manière dont la voie JAK/STAT peut intervenir dans l'inhibition de l'apoptose et l'activation du cycle cellulaire dans un contexte de cancérogenèse.

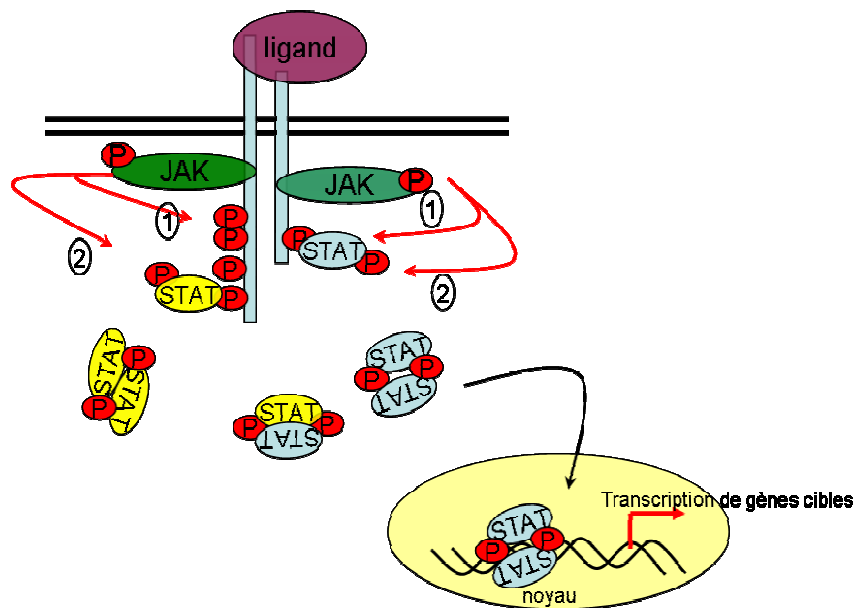


Figure 3 : Mécanismes d'activation de la voie JAK/STAT

La voie de signalisation JAK/STAT est initiée lorsqu'un ligand tel qu'une cytokine vient se lier à son récepteur membranaire et active ce dernier.

Les kinases JAKs associées au récepteur se trans-phosphorylent et permettent le recrutement puis l'activation des facteurs STAT. Ces derniers vont ensuite réguler l'expression de gènes cibles dans le noyau.

A.1.2.2 La spécificité d'activation de la voie JAK/STAT

En 2007, Murray J évaluait à environ 38, le nombre de récepteur de cytokines (avec le jeu des combinaisons de chaînes). Ces récepteurs permettraient la transduction de signaux provenant d'environ 38 cytokines (dont les interférons) (Murray, 2007). L'expression différentielle de ces récepteurs en fonction des types cellulaires et tissulaires permet un premier niveau de spécificité dans l'activation de la voie JAK/STAT par rapport au microenvironnement.

A un moment donné, une cellule doit pouvoir intégrer des signaux provenant de plusieurs récepteurs. Il a été démontré que les différentes classes de récepteurs de cytokine s'associent préférentiellement avec certaines kinases JAK (O'Shea et al., 2002). Ainsi, la chaîne γ c utilise les kinases JAK1 et JAK3 alors que les récepteurs impliqués dans le développement et la prolifération des cellules hématopoïétiques utilisent la protéine JAK2. La majorité des autres récepteurs sont associés à la kinase JAK1. **(Figure 4)**

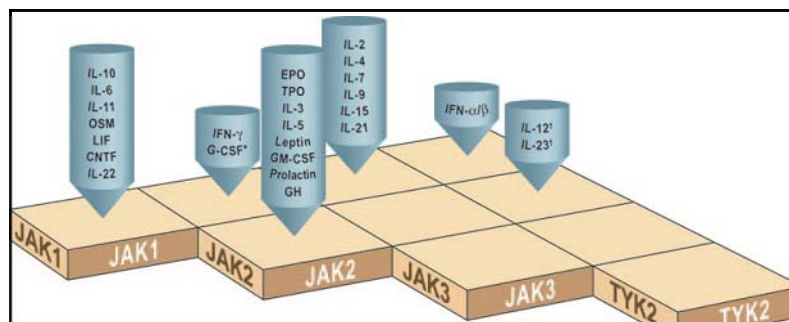


Figure 4 : Spécificité d'association des kinases JAK avec les récepteurs de cytokine
La majorité des récepteurs de cytokine sont associés à des combinaisons de protéines JAK.
On remarque que la protéine JAK1 est très utilisée, à l'inverse de la kinase TYK2.
(Murray 2007)

La relative spécificité d'association entre une chaîne de récepteur et une kinase JAK ne rend pas compte de la spécificité des réponses biologiques observées après une stimulation par une cytokine. En fait, une grande partie de la spécificité du signal repose sur la séquence du domaine cytoplasmique du récepteur et en particulier du peptide contenant les résidus tyrosine phosphorylables par les kinases JAK. Ces résidus permettent le recrutement spécifique de facteurs de transcription de la famille STAT au niveau du récepteur puis leur activation. Plusieurs kinases JAK peuvent donc activer le même facteur STAT. La spécificité d'activation des protéines STATs par une cytokine repose sur son association spécifique, via son domaine SH2, au récepteur activé (Lin et al., 1995) (Pellegrini and Dusanter-Fourt, 1997). Plusieurs études rapportent l'action sélective de certains facteurs STAT en réponse à une cytokine donnée. Par exemple STAT-1 en réponse à l'interféron- γ ou le facteur STAT-6 en

réponse à l'IL-4. D'autre part, une protéine STAT peut être activée par deux cytokines différentes, sans pour autant avoir une action redondante (Ozaki and Leonard, 2002). Dans les cellules B/T ou dans les macrophages, l'activation du facteur STAT-6 en réponse à l'action des kinases JAK1 et JAK3 via le récepteur IL-4R n'entraîne pas l'expression des mêmes gènes (Chtanova et al., 2001).

Le facteur STAT-3 illustre la complexité du système. Dans les macrophages, une stimulation par l'IL-6 ou l'IL-10 active la voie JAK1/STAT-3. La fonction principale de l'IL-10 est de réguler négativement la réponse inflammatoire des macrophages et des cellules dendritiques (DC). Et bien qu'elle active le facteur STAT-3, l'IL-6 n'entraîne pas de réponse anti-inflammatoire (El Kasmi et al., 2006). D'autre part, un récepteur à l'Epo transformé pour activer le facteur STAT-3 et non plus le facteur STAT-5 est lui capable d'induire une réponse anti-inflammatoire identique à celle de l'IL-10R (El Kasmi et al., 2006). Une hypothèse émergente quant au mécanisme sous-jacent de cette spécificité est l'intervention d'autres protéines suite à l'activation du facteur STAT-3 par le récepteur IL-6R. Différents pools de facteur STAT-3 seraient ainsi formés. A ce jour, les supports de la spécificité des voies JAK/STAT ne sont pas encore tous élucidés.

A.1.2.3 Autres voies de signalisation activées par les cytokines

Certaines sous-unités des récepteurs de cytokines (chaîne gp130, γc ...) peuvent recruter d'autres intermédiaires de signalisation en plus des kinases JAKs. De nombreuses cytokines (IL-9, IL-4, IL-7, IL-21, IL-6, IL-11...) et facteurs de croissance (OSM, LIF, CTNF...) activent ainsi d'autres voies de signalisation que la voie JAK/STAT (Hirano et al., 1997) (Knoops and Renaud, 2004). Les trois principales autres voies de signalisation activées par les cytokines sont les voies MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinase), la voie PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase) et la voie IRS1/2.

Les mécanismes d'activation des voies MAPKs par chaque cytokine n'est pas connu précisément. Il semble que l'activation de ces voies par les cytokines passe par le recrutement de protéines adaptatrices telles que Shc au niveau du récepteur activé. Cette interaction entraîne le recrutement de protéines régulatrices des petites protéines G (Ras et Rac) et induit les voies MAPKs, p38, ERK 1/2 et JNK (Nelms et al., 1999).

Les protéines IRS1 et IRS2 sont des substrats phosphorylés lors d'une stimulation par l'insuline ou l'IGF-1 (Sun et al., 1995). Ils peuvent aussi être phosphorylés en réponse à des stimulations par certaines cytokines (interférons, IL-2, IL-4...) (Sun et al., 1995) (Hirano et al., 1997). Les protéines IRS sont des intermédiaires de signalisation impliqués dans

l'activation de la voie Akt (Butler et al., 1998). Dans certains cas, les IRS sont aussi associés à l'activation de la PI3K (Hirano et al., 1997). Par exemple, en réponse à une stimulation par l'IL-4, l'interaction entre la sous-unité p85 de la PI3K et IRS1 phosphorylé provoque l'activation de la sous-unité catalytique (p110) de la PI3K (Dhand et al., 1994). Les phosphoinositides générés par la PI3K pourraient participer à l'activation de plusieurs autres kinases (PKC, Akt...) et jouer un rôle clé dans la survie cellulaire (Kirwan and del Aguila, 2003).

A.1.3 La voie JAK/STAT dans les cancers

A.1.3.1 Les mutations de la protéine JAK-2

Chez la drosophile, l'activité constitutive de la kinase hopscotch (homologue des kinases JAK) induit la formation de néoplasmes de type leucémie via une activation aberrante des protéines STATs (Hou et al., 1996). Chez l'homme, les altérations de la protéine JAK2 sont impliquées dans des néoplasmes myéloprolifératifs chroniques (Tefferi, 2007).

La translocation chromosomale t(9 ;12) amène le facteur de transcription TEL à fusionner avec la protéine kinase JAK2. La protéine de fusion TEL-JAK2 qui en résulte a une activité kinase constitutive. Cette dernière est retrouvée chez les patients atteints de leucémies myéloïdes chroniques (CML) ou de leucémies lymphoblastiques aiguës (ALL) (Lacronique et al., 1997). D'autres réarrangements chromosomiques fusionnent le domaine JH1 et/ou JH2 de JAK2 aux protéines PCM1 et BCR, et aboutissent aussi à l'expression de protéines de fusion à activité kinase constitutive (Griesinger et al., 2005) (Reiter et al., 2005). Les protéines PCM1-JAK2 et BCR-JAK2 sont ainsi respectivement associées à des AMLs (leucémie myéloïde aiguë) et des CMLs (leucémie myéloïde chronique) (Smith and Fan, 2008). La présence de la protéine mutée JAK2V617F à activité kinase constitutive est décrite dans certains troubles myéloprolifératifs (polycythémia vera, thrombocytosemie essentielle, la myélofibrose) (Levine et al., 2007) (Morgan and Gilliland, 2008). Cette mutation située au niveau du domaine JH2 de JAK2 provoque un changement de conformation de la protéine et inhibe la régulation du domaine JH1 par le domaine JH2 (Kralovics et al., 2005). Les cellules exprimant la protéine JAK2V617F sont donc hypersensibles aux cytokines. Récemment plus d'une vingtaine d'autres mutations de la protéine JAK2 ont été rapportées, en plus ou indépendamment de la substitution V617F, chez des patients atteints de polycythémia vera ou de thrombocytosemie essentielle (Yoo et al., 2009). Des analyses de biologie moléculaire et de biochimie sont actuellement en cours pour caractériser les conséquences les conséquences de ces mutations et éventuellement détecter de nouvelles anomalies génétiques.

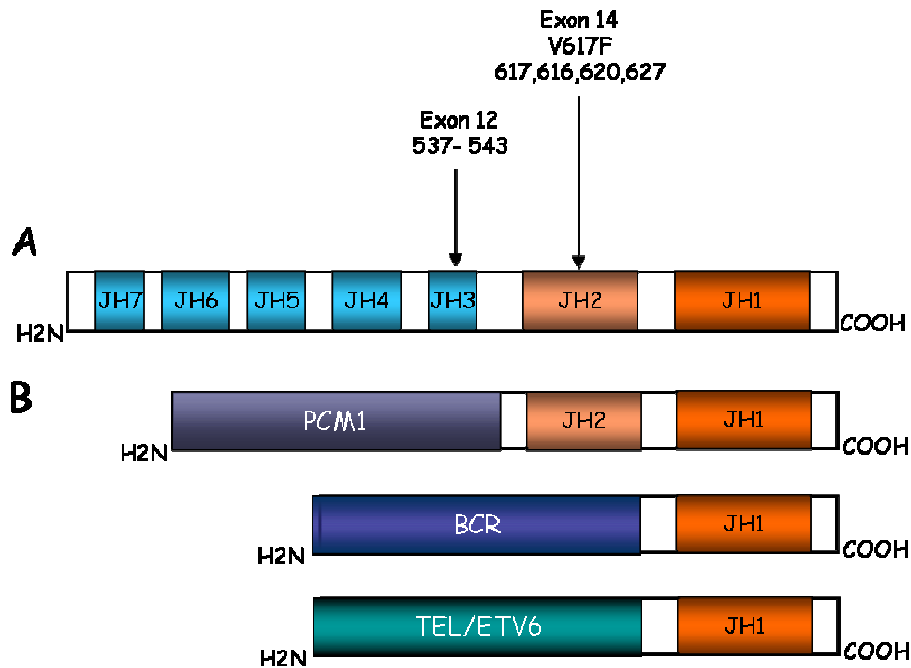


Figure 5 : Les mutations de la protéine JAK2 dans les cancers

A : Les mutations ponctuelles et les délétions impliquées dans les divers troubles myéloprolifératifs et les leucémies aiguës sont situées dans l'exon 12 et 14.

B : Les protéines de fusion PCM1-JAK2, TEL/ETV6-JAK2 et BCR-JAK2 sont retrouvées dans les leucémies lymphoïdes et myéloïdes.

A.1.3.2 Activation constitutive des protéines STATs dans les tumeurs

Dans le contexte physiologique, l'activation des protéines STAT est rapide et transitoire. Par contre, dans les tumeurs, les protéines STATs sont souvent sur-activées. Elles participent alors à la progression tumorale.

Dans les tumeurs du sein, de la tête et du cou, mais aussi dans certains cas de leucémies et de lymphomes, l'activité du facteur STAT-1 est dérégulée (Lin et al., 2000). L'implication de cette protéine dans la cancérogenèse est complexe. Différentes fonctions de la protéine sont mises en jeu, notamment ses capacités d'inhibition de l'apoptose et de la croissance cellulaire (Khodarev et al., 2009; Sahni et al., 2001).

La voie JAK2/STAT-5 est primordiale dans le développement des glandes mammaires (Miyoshi et al., 2001). Chez les souris transgénique il a été démontré que l'activation constitutive du facteur STAT-5 induit la transformation des cellules mammaires et l'apparition de tumeurs sporadiques (Iavnilovitch et al., 2004). Ce phénomène favoriserait l'échappement des cellules tumorales à l'apoptose et une croissance cellulaire indépendante des facteurs de croissance (Wagner and Rui, 2008). Il a aussi été montré que le facteur

STAT-5 était activé dans un certain nombre de leucémies et de désordres myéloprolifératifs (Lewis and Ward, 2008).

L'activation constitutive du facteur STAT-3 dans les cancers est un phénomène très décrit. En plus des protéines JAKs, de nombreux oncogènes peuvent activer ce facteur. C'est le cas par exemple, pour les oncogènes de la famille Src (Turkson et al., 1998), Abl (Carlesso et al., 1996) et Ras (Garcia et al., 1997).

In-vivo, l'expression du mutant dominant actif de la protéine STAT-3 (STAT3-C) provoque des tumeurs spontanées. Chez l'homme l'activation aberrante du facteur STAT-3 est observée dans de très nombreux types tumoraux (myélomes, carcinomes, lymphomes...) (Bowman et al., 2000). Le facteur STAT-3 est d'ailleurs une cible thérapeutique privilégiée. Plusieurs équipes travaillent au développement de peptides pouvant bloquer soit l'activation du facteur STAT-3 en amont (inhibition de l'activité catalytique de protéines kinases activant STAT-3) soit la fonction transcriptionnelle de la protéine (blocage du domaine SH2) (Costantino and Barlocco, 2008).

A.2 Régulation négative de la signalisation des cytokines

Les processus fondamentaux régulés par les cytokines et les effets néfastes de l'activation constitutive de la voie JAK/STAT mettent en évidence l'importance des mécanismes de régulation. Normalement, la voie JAK/STAT est finement régulée par trois familles de protéines : les SOCS (Suppressors of Cytokine Signalling), les PIAS et les phosphotyrosines phosphatases. De manière intéressante, dans certaines tumeurs, l'expression de ces protéines est inhibée (Wormald and Hilton, 2004).

A.2.1 Les phosphotyrosines phosphatases (SHPs, CD45)

Plusieurs protéines à activité phosphatase interviennent pour limiter la cascade de phosphorylations de la voie JAK/STAT. Elles agissent soit au niveau des kinases JAKs, soit au niveau du récepteur activé ou des facteurs STATs (Espert et al., 2005).

Les protéines de la famille SHP (SH2-domain containing phosphatases) ne sont que deux. L'expression de SHP-1 est quasi exclusivement restreinte au système hématopoïétique, alors que l'expression de SHP-2 est ubiquitaire. Les SHP sont constituées de deux domaines SH2 consécutifs et d'un domaine PTP (Protein Tyrosine Phosphatase) (Tonks and Neel, 2001). Les

domaines SH2 permettent aux SHPs de s'associer aux tyrosines phosphorylées des récepteurs activés mais aussi à des molécules de signalisation comme IRS-1 ou les kinases JAKs (Yu et al., 2000). Cette association entre domaine SH2 et résidus tyrosine phosphorylés induit l'activation enzymatique des SHPs et la déphosphorylation des protéines associées (Neel et al., 2003). Les protéines SHP interrompent ainsi la voie JAK/STAT en aval du récepteur en inhibant le recrutement des facteurs STATs. D'autres modèles d'inactivation plus complexes font intervenir des protéines adaptatrices et d'autres molécules de signalisation (Chong and Maiese, 2007). La protéine SHP-1 est exprimée principalement dans les cellules de type hématopoïétiques (Qu, 2000). En absence de cette protéine, une stimulation par l'IFN- γ ou l'EPO conduit respectivement à une hyperphosphorylation des kinases JAK-1 ou JAK-2 (Klingmuller, 1997) (David et al., 1995a). Dans certains lymphomes et leucémies, le gène *shp-1* est hyperméthylé et considéré comme suppresseur de tumeur (Reddy et al., 2005).

Pour sa part, la protéine SHP-2 est d'expression ubiquitaire (Qu, 2000). Elle est un puissant inhibiteur de la signalisation de l'IL-6 et de l'activation des récepteurs associés à la chaîne gp130 (Fischer et al., 2004) (Xu and Qu, 2008). Chez l'Homme, le point d'ancrage de la phosphatase SHP-2 sur la chaîne gp 130 est le résidu tyrosine P-Y759. Chez la souris, il s'agit du résidu tyrosine P-Y757. Dans ce modèle, lorsque cette tyrosine est mutée en phénylalanine, on observe de nombreuses pathologies dont une lympho-adénopathie, une splénomégalie et une augmentation de la réponse en phase aiguë (Kamimura et al., 2003). La phosphatase SHP-2 est impliquée dans la régulation des voies de signalisation activées par plusieurs facteurs de croissance (PGDF, EGF, IGF-1), des cytokines (IL-2 et IL-3), mais aussi l'insuline et l'interféron- γ (Chong and Maiese, 2007). Toutefois, des études démontrent aussi que la protéine SHP-2 peut aussi être un régulateur positif de la voie JAK-STAT. En réponse à une stimulation par la PRL, la protéine SHP-2 stabiliserait la kinase JAK2 en inhibant sa dégradation par la protéine SOCS-1 (Ali et al., 2003).

De nombreuses études rapportent aussi la participation de la phosphatase SHP-2 dans la transduction de signaux notamment dans les voies MAPKs et PI3K. Plusieurs mécanismes semblent pouvoir permettre à la phosphatase SHP-2 de favoriser l'activation de la protéine Ras. SHP-2 interviendrait directement en interagissant avec l'adaptateur Grb2 et en favorisant le recrutement du complexe Grb2/Sos. Parallèlement SHP-2 inhiberait le recrutement de la protéine inhibitrice RasGAP. La phosphatase SHP-2 serait aussi capable de déphosphoryler certaines protéines régulatrices de la protéine kinase Src. Elle activerait ainsi les voies MAPK de façon indirecte en favorisant l'activation de la protéine Ras par la kinase

Src (Dance et al., 2008). Des travaux menés dans différents types cellulaires rapportent que la phosphatase SHP-2 est indispensable à l'activation de la PI3K en réponse au TPO à l'EGF et au BDNF (Matsumoto et al., 1999; Miyakawa et al., 2001; Wu et al., 2001). Il semble que le domaine SH2 amino-terminal de la protéine SHP-2 soit l'élément qui lui permette d'assurer cette fonction d'intermédiaire de signalisation (Wu et al., 2001). Chez la souris, l'inactivation du gène *PTPN11* (qui code pour la protéine SHP-2) est létal (Saxton et al., 1997). Chez l'homme, les mutations germinales du gène *PTPN11* sont à l'origine du syndrome de Noonan et du syndrome LEOPARD. Ces maladies génétiques rares se manifestent par des malformations cutanées, faciales et cardiaques (Porciello et al., 2008) (Noonan, 2006). Ces syndromes s'accompagnent parfois de déficits intellectuels et sont associés à un risque accru de leucémie et de lymphome (Wang et al., 2009a) (Lo et al., 2008). Parallèlement, les mutations somatiques du gène *PTPN11* sont aussi observées dans des hémopathies telles que les leucémies myélo-monocytaires juvéniles (Chan et al., 2008).

La protéine transmembranaire CD45 est exclusivement exprimée dans les cellules hématopoïétiques (Trowbridge and Thomas, 1994). Une délétion du gène CD45 conduit à une hyperactivation des protéines JAK-1, JAK-2 et JAK-3 et s'accompagne d'une perte de la réponse aux antigènes dans les cellules B et T (Yamada et al., 2002).

Les kinases JAK-2 et TYK-2 sont les substrats de la phosphatase PTP1B (phosphoTyrosine Phosphatase 1B) (Myers et al., 2001). On observe une hyper-phosphorylation de la kinase JAK-2 dans les fibroblastes de souris dont le gène codant pour la protéine PTP1B a été invalidé (Myers et al., 2001). Par ailleurs, la surexpression de PTP1B inhibe l'activation des gènes cibles des interférons.

La protéine TC-PTP (T Cell ProteinTyrosine Phosphatase) est surtout exprimée dans les cellules hématopoïétiques (Simoncic et al., 2002). Elle s'associe directement aux kinases JAK-1 et JAK-3. Les phosphatases PTP1B et TC-PTP reconnaissent spécifiquement un motif centré sur un tandem de résidus tyrosine à l'intérieur de la séquence peptidique. Pour les kinases de la famille JAK, ces séquences se situent dans le domaine d'auto-activation. La protéine TC45 est une isoforme nucléaire de TC-PTP. Elle est responsable de la déphosphorylation nucléaire des facteurs STAT-1, STAT-3 et STAT-5 (ten Hoeve et al., 2002) (Aoki and Matsuda, 2002).

A.2.2 Les protéines PIAS (Protein Inhibitor of Activated STAT)

La protéine PIAS-3 est le membre fondateur de la famille PIAS. Elle a été caractérisée comme un répresseur de l'activité transcriptionnelle du facteur STAT-3 ; d'où son nom (Chung et al., 1997a). Chez les mammifères, la famille des protéines PIAS compte 4 membres : PIAS1, PIAS3, PIASX, PIASY (Arora et al., 2003). Ces protéines partagent une structure commune avec plusieurs domaines conservés (**figure 6**). Les domaines SAP sont souvent présents dans les protéines qui agissent sur la structure chromatinienne mais aussi dans des protéines régulatrices de la transcription (Cen et al., 2004). Les protéines PIAS contiennent aussi un domaine RING, comparable à celui des enzymes E3-ligases. Grâce à ce domaine, les protéines PIAS sont douées d'une activité E3 SUMO-ligase (Small Ubiquitin Modifier) (Sharrocks, 2006). De nombreuses cibles des protéines PIAS ont été identifiées (p53, c-Jun, LEF-1, IRF-1, STAT-1... (Jackson, 2001). Le modèle le plus largement admis suggère que les PIAS sont des adaptateurs qui favorisent les interactions entre l'enzyme de conjugaison et le substrat (Sharrocks, 2006). Les travaux de Takahaschi supposent que le domaine RING en association avec le motif PINIT pourrait former un module à activité E3-ligase (Takahashi and Kikuchi, 2005).



Figure 6 : Structure des protéines PIAS

Les protéines PIAS possèdent un domaine SAP, une structure en doigt de zinc (RING) et une région C-terminale riche en sérine et thréonine (absente pour PIASY). Les motifs PINIT et RING forment le domaine E3 ligase.

Toutes les protéines de la famille PIAS peuvent réguler l'expression de gènes de manière positive ou négative, principalement au niveau de la transcription. Bien que leur mécanisme d'action diffère selon leur cible, elles semblent principalement agir en relocalisant des régulateurs transcriptionnels dans différents sous-compartiments cellulaires (Arora et al., 2003). Par exemple, il a été montré que la protéine PIAS1 provoque la relocalisation du facteur de transcription Msx1 à la périphérie nucléaire (Lee et al., 2006a).

Les PIAS sont des protéines constitutivement exprimées, mais elles ne se lient qu'aux formes activées des facteurs STATs (Liu et al., 1998). Il existe d'autre part une certaine sélectivité de reconnaissance des facteurs STATs par les protéines PIAS. Ainsi, les protéines PIAS1, PIASY et PIASX sont capables d'interagir spécifiquement avec le facteur STAT-1, la

protéine PIAS3 avec STAT-3 et PIASY avec les protéines STAT-4 et STAT-1 (Chung et al., 1997a) (Espert et al., 2005). Pour inhiber la voie JAK/STAT, les protéines PIAS utilisent différents mécanismes. Les protéines PIAS1 et PIAS3 se lient respectivement aux dimères de STAT-1 et de STAT-3 activés, et inhibent leur fixation à l'ADN. Ce n'est pas le cas pour PIASX et PIASY (Wormald and Hilton, 2004). Il a été montré que la protéine PIASX se comporte en corépresseur transcriptionnel. Elle modifierait la structure chromatinienne en recrutant des histones déacétylases (Arora et al., 2003). La protéine PIASY, elle, délocaliserait des partenaires, comme le facteur de transcription LEF-1, au niveau de corps nucléaire (Sachdev et al., 2001).

L'effet inhibiteur des protéines PIAS peut être modulé par des modifications post-traductionnelles de leurs cibles. La méthylation du facteur STAT-1 sur un résidu aminé Arginine conservé pourrait inhiber son interaction avec la protéine PIAS-1. Ce phénomène augmenterait alors la capacité de liaison à l'ADN des dimères de facteur STAT-1 et par conséquent, leur capacité à activer les gènes cibles (Mowen et al., 2001) (Liao et al., 2000). La protéine STAT-1 est la seule protéine de la famille STAT pour laquelle une SUMOylation (par les protéines PIAS1 et PIASX) a été observé. Mais la fonction de cette modification n'a pas été caractérisée (Ungureanu et al., 2003).

A.2.3 Les protéines de la famille SOCS (et la protéine CIS)

Les membres de la famille SOCS (Suppressors of cytokine signalling) sont impliqués dans une boucle de rétrocontrôle négatif de la signalisation induite par les cytokines (Alexander, 2002) (Crocker et al., 2008). Les gènes codants pour les protéines de cette famille sont des cibles de la voie JAK/STAT (Fujimoto and Naka, 2003). L'expression de certaines protéines SOCS peut être induite par des stimuli autres que les cytokines (LPS, insuline, SCF, EGF, lipopolysaccharide) dont les voies de régulation n'impliquent ni les JAKs ni les STATs (De Sepulveda et al., 1999). Par contre, à l'état basal, les protéines SOCS ne sont pas ou peu exprimées dans la cellule.

Principaux signaux inducteurs	Protéine	Principales voie régulées
IL-2, IL-3, IL-6, IL-9, IL-10 IFN- α , GH, PRL, EPO, TNF- α , GM-CSF	CIS	GH, PRL, IL-2, EPO, leptin, IGF-1, IL-3
IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-13, IFN β α , TNF- α , LIF, G-CSF, M-CSF, GM-CSF, GH, insuline, PRL, LPS, CNTF, EPO	SOCS-1	IFN- γ , IL-2 γ c, IL-4
IL-6, IFN- γ , IFN- α , LIF, GH, PRL, insuline, CNTF	SOCS-2	GH, LIF
IL-1, IL-2, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, GM-CSF, IFN- γ , IFN- α , GH, PRL, insuline, CNTF, leptine, LPS, EPO	SOCS-3	G-CSF, IL-6, LIF, IL-23, leptine
	SOCS-4	EGF
IL-6	SOCS-5	IL-4, EGF
insuline	SOCS-6	insuline
insuline	SOCS-7	Insuline, GH, PRL, leptine

Tableau 2 : Induction de l'expression des protéines de la famille SOCS et leurs implications dans la régulation des voies de signalisation des cytokines

L'expression des différentes protéines de la famille SOCS peut être induite par une large variété de cytokines, d'hormones et de facteurs de croissance. En retour, les protéines SOCS sont souvent des régulateurs négatifs clés de ces voies de signalisation.

(D'après Naka T 2003, Alexander WS 2004, Crocker B 2008)

Le premier membre de la famille, CIS-1 (Cytokine-Inducible SH2 domain containing protein), a été découvert en 1995 (Yoshimura et al., 1995). On compte à l'heure actuelle 8 membres dans cette famille : SOCS-1 à 7 et la protéine CIS (Krebs and Hilton, 2001). Les membres de la famille SOCS sont caractérisés par une structure commune très conservée avec deux domaines fonctionnels importants :

- un domaine SH2

Un domaine SH2 permet aux protéines SOCS de se lier aux résidus tyrosine phosphorylés des récepteurs ou à ceux des protéines JAKs activées. De cette façon, les protéines SOCS agissent soit en bloquant par compétition le recrutement des facteurs STATs aux motifs tyrosine phosphorylés du récepteur ou des JAKs, soit en inhibant directement l'activité catalytique des JAKs en bloquant les tyrosines de leur domaine d'auto-activation. Pour les protéines SOCS-1 et SOCS-3, deux autres régions en N-terminale du domaine SH2 ont été décrites. Leur intégrité est indispensable à la fonction de SOCS-1. La première est un domaine ESS (extended SH2 subdomain), le second est appelé domaine KIR (Kinase Inhibitory Region) (Sasaki et al., 1999).

- un motif SOCS-box

Les protéines de la famille SOCS se caractérisent aussi par la présence d'un motif caractéristique en C-terminal. Ce domaine très conservé d'environ 40 acides aminés est appelé « socs-box » ou motif SC (Kile and Alexander, 2001). Ce domaine est aussi retrouvé dans quatre autres familles de protéines non rattachées aux protéines SOCS (Kamura et al., 1998) (Starr et al., 1997).

Le domaine SOCS-box s'associe aux élongines B et C. Cette interaction permet le recrutement des éléments du complexe d'ubiquitine ligase E3 et l'ubiquitination des protéines associées (Kamura et al., 1998). Les protéines SOCS peuvent donc entraîner la dégradation de leur cible par la voie du protéasome (Kile and Alexander, 2001). Dans le contexte de la régulation de la voie JAK/STAT, il a été montré que la protéine SOCS-1 provoque l'ubiquitination et la dégradation de la kinase JAK2 par le protéasome (Frantsve et al., 2001). Le domaine SOCS-box pourrait aussi participer à la reconnaissance des substrats par les protéines SOCS. A ce jour, le processus n'a été démontré que pour la protéine CIS. En effet la présence du motif SOCS-box est nécessaire à la reconnaissance des récepteurs de l'EPO et de la GH par la protéine CIS (Piessevaux et al., 2008).

Conclusion

Les effets biologiques pleïotropiques des cytokines reposent principalement sur l'activation de la voie de signalisation JAK/STAT. De cette manière, les cytokines régulent des fonctions cellulaires fondamentales (prolifération cellulaire, différenciation...). Les sous-unités de récepteurs gp130 et gamma permettent à certaines cytokines (IL-9, IL-4, IL-7, IL-21, IL-6, IL-11...) et facteurs de croissance (OSM, LIF, CTNF...) d'agir aussi sur les voies de signalisation MAPKs, PI-3K et la voie IRS1/2. Les altérations de la voie de signalisation JAK-STAT, et particulièrement les protéines JAK-2, STAT-5 et STAT-3 sont associées au développement de cancers.

Les phosphotyrosines phosphatases, les protéines de la famille PIA5 et de la famille SOCS assurent la mise au repos des voies JAK/STAT après stimulation. Les protéines phosphotyrosines phosphatases et les protéines PIA5 sont constitutivement exprimées. Ce sont donc des inhibiteurs rapidement disponibles après une activation des récepteurs de cytokine. A l'inverse, les protéines de la famille SOCS sont faiblement exprimées à l'état basal. Mais leur expression est rapidement induite en réponse à de nombreux stimuli. D'ailleurs, l'expression de plusieurs protéines SOCS peut être induite par une même cytokine. La complémentarité fonctionnelle des protéines phosphotyrosines phosphatases, des protéines PIA5 et des protéines SOCS permet de réguler la voie JAK/STAT à chacune de ses étapes clés.

B/ SOCS-1 : FONCTIONS ET REGULATION

Après la protéine CIS (Cytokine Inductible SH2-containing protein) (Yoshimura et al., 1995), la protéine SOCS-1 a été le deuxième membre de la famille à avoir été cloné. Il a été identifié en 1997 par trois équipes indépendantes. Endo TA et ses collaborateurs la nommèrent JAB pour JAK Binding Protein (Endo et al., 1997). L'équipe de Naka, l'identifia lors d'un screening par homologie de séquence avec le domaine SH2 du facteur STAT-3 et l'appela SSI-1 pour STAT induced STAT inhibitor-1 (Naka et al., 1997). Enfin, l'équipe de Starr a identifié la protéine SOCS-1 comme un inhibiteur de la signalisation induite par l'IL-6 (Starr et al., 1997). Par conséquent, pendant un temps, différentes nomenclatures se sont côtoyées dans la littérature, mais elle est aujourd'hui harmonisée et la nomenclature SOCS a été conservée.

B.1 Les fonctions biologiques de la protéine SOCS-1

B.1.1 Régulation de la voie de signalisation JAK/STAT par la protéine SOCS-1

Les études structure/fonction menées sur la protéine SOCS-1 ont démontré que cette protéine peut être impliquée dans deux types d'interactions (Johnston, 2004). Les premières concernent des résidus tyrosines phosphorylés reconnus par les domaines SH2, ESS et KIR. Les secondes concernent des protéines cibles variées et sont supportées par le domaine SOCS-box. Ces interactions permettent à la protéine SOCS-1 d'assurer plusieurs fonctions dont la régulation de la voie JAK/STAT (Nicholson et al., 1999).

Après une stimulation par une cytokine, l'activation des protéines de la famille JAK se traduit par la phosphorylation du résidu tyrosine 1007 de la boucle d'activation du domaine JH1 (Yasukawa et al., 1999b). Des expériences de mutagenèse dirigée ont démontré que ce résidu est spécifiquement reconnu par le domaine SH2 de la protéine SOCS-1. Cette dernière interagit de cette façon avec les kinases JAK2, JAK1 et TYK2 (Ungureanu et al., 2002; Yasukawa et al., 1999b; Zhou et al., 1997). Le motif protéique FLVRDS permet à la protéine SOCS-1, de reconnaître spécifiquement les résidus tyrosine phosphorylés à la surface de son domaine SH2. La substitution du résidu argine (R105) par une lysine provoque une inhibition de l'interaction avec les kinases JAK2, JAK1 et TYK2 (Narazaki et al., 1998) (Nicholson et al., 1999; Yasukawa et al., 1999b).

L'interaction avec le résidu P-Y1007 dépend aussi de l'intégrité du domaine ESS (aa 68 à 79) de la protéine SOCS-1 (Giordanetto and Kroemer, 2003; Yasukawa et al., 1999b). Deux acides-aminés (Ile68 et Leu75) sont conservés dans le domaine ESS (Extended SH2 domain) des protéines SOCS-1, SOCS-3, SOCS-4 et SOCS-5. La mutation de ces deux acides aminés diminue la liaison de la protéine SOCS-1 au résidu P-Y1007 et son effet régulateur sur la voie de signalisation JAK/STAT.

Le domaine KIR (Kinase Inhibitory Region) est situé en N-terminal du domaine ESS (aa 56 à 67). En absence de celui-ci, la reconnaissance du domaine JH1 des kinases JAKs par la protéine SOCS-1 est diminuée, bien que l'affinité de la protéine SOCS-1 pour le résidu P-Y1007 reste inchangée. Ces résultats supposent que le domaine KIR permet à la protéine SOCS-1 de reconnaître le domaine JH1 au niveau d'une région différente de la tyrosine Y1007 mais avec une grande affinité (Giordanetto and Kroemer, 2003). Une synergie entre le domaine SH2 et le domaine KIR est, en effet nécessaire pour l'inhibition de l'activité kinase de JAK2 par la protéine SOCS-1 (Flowers et al., 2004; Narazaki et al., 1998). Le domaine KIR est un analogue structural de la boucle d'activation des protéines JAKs (Waiboci et al., 2007). Il permet à la protéine SOCS-1 d'agir en pseudo-substrat non phosphorylable. Après une stimulation par une cytokine, la protéine SOCS-1 vient se loger dans la boucle d'activation de la kinase JAK2 et par compétition, bloque l'arrivée de l'ATP et/ou des substrats, au niveau du site catalytique de la protéine (Yasukawa et al., 1999b). Par conséquence, l'activation des facteurs STATs est inhibée.

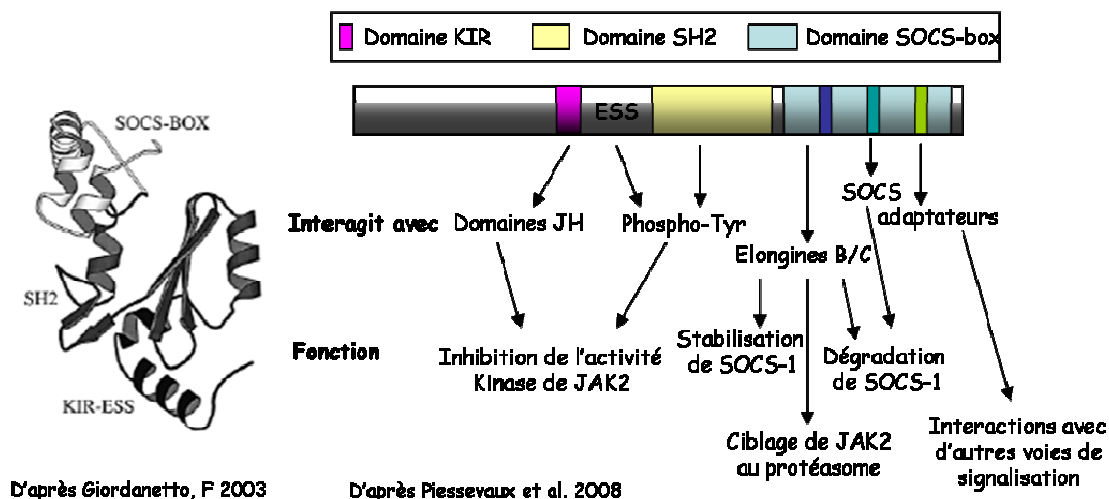


Figure 7A : Structure de la protéine SOCS-1

A gauche : Modèle tridimensionnel de la protéine SOCS-1 (Giordanetto and Kroemer, 2003).

A droite : Fonctions et interactions supportées par les domaines structuraux de la protéine SOCS-1 (Piessevaux et al., 2008).

Parallèlement, la phosphorylation de la protéine JAK2 sur son résidu Y-1007 augmente sa poly-ubiquitination et induit sa dégradation par le protéasome (Ungureanu et al., 2002). Dans des cellules COS-7 traitées avec des inhibiteurs du protéasome, il a été possible d'observer des complexes JAK2/SOCS-1 (Ungureanu et al., 2002). Ces résultats suggèrent que la protéine SOCS-1 peut aussi réguler la quantité de protéine JAK activée dans la cellule en participant à sa dégradation protéolytique.

Le rôle du domaine SOCS-box dans régulation de la signalisation des cytokines par la protéine SOCS-1 a longtemps été débattu. Dans un premier temps, les expériences *in-vitro*, n'ont démontré qu'un faible impact de ce motif sur la transduction des signaux des cytokines. Pourtant, en absence du domaine SOCS-box, la demi-vie de la protéine SOCS-1 est augmentée (Kamura et al., 1998; Narazaki et al., 1998). Par contre, *in-vivo*, Zhang et ses collaborateurs ont mis en évidence l'importance physiologique de la SOCS-box dans la régulation de la réponse à l'IFN- γ (Zhang et al., 2001). Pour leurs investigations, les expérimentateurs ont généré des souris transgéniques exprimant une protéine SOCS-1 dont la région correspondant au domaine SOCS-box a été tronquée. Comparées à des souris sauvages et à des souris *socs1*^{-/-}, ces animaux présentent un temps de réponse à l'IFN- γ intermédiaire. Dans les modèles de surexpression, il semble que les interactions entre la protéine SOCS-1 et les kinases JAKs via le domaine SH2, soient suffisantes pour inhiber la cascade de signalisation JAK/STAT. Par contre, *in-vivo*, la dégradation de la protéine JAK-2 par le protéasome grâce au domaine SOCS-box joue un rôle important dans la terminaison du signal (Kile et al., 2002; Zhang et al., 2001).

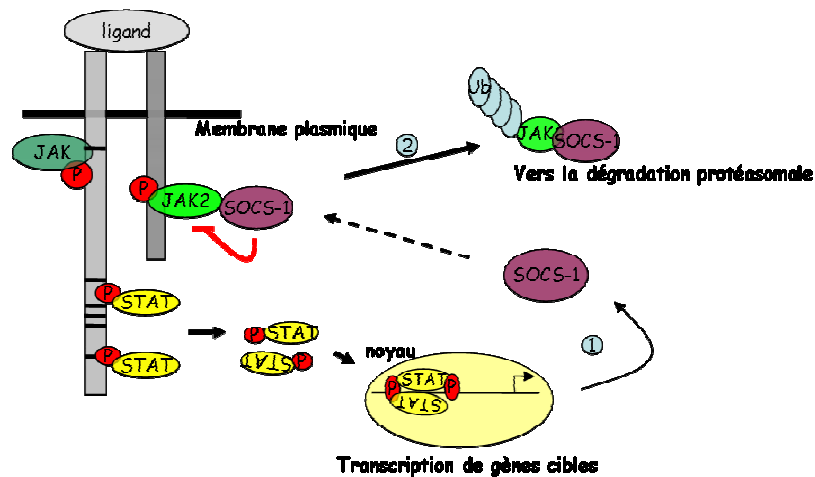


Figure 7B : Régulation séquentielle de la kinase JAK-2 par la protéine SOCS-1

- 1 : La protéine SOCS-1, dont l'expression est induite par l'activation de la voie JAK/STAT va bloquer l'activité catalytique de la kinase JAK2.
- 2 : Dans un deuxième temps la protéine SOCS-1 recrute la kinase JAK2 au niveau d'un complexe à activité ubiquitine ligase et participe à sa dégradation.

La régulation de la voie JAK-STAT par la protéine SOCS-1 serait à l'origine d'une inhibition de l'apoptose induite par le stress oxydatif (Oh et al., 2009). Dans des cellules Jurkat et des splénocytes de souris, en réponse à une stimulation par du TNF- α ou du H₂O₂, les protéines kinases JAK1 et JAK2 ainsi que les facteurs STAT-2 et STAT-5 sont activés. L'activation des kinases JAK dans ce contexte provoquerait l'activation de la voie p38-MAPK qui régule l'apoptose induite par le stress oxydatif. Dans les cellules surexprimant la protéine SOCS-1, ce phénomène d'apoptose en réponse au TNF- α ou du H₂O₂ est inhibé. Il semble que l'activité anti-apoptotique de la protéine SOCS-1 ne repose pas seulement sur une inhibition des kinases JAKs. La protéine SOCS-1 maintiendrait aussi l'activité catalytique de certaines protéines phosphatases (SHP-1 et CD45) en provoquant l'augmentation de la quantité de thioredoxine dans la cellule. Cette protéine protégeant les phosphatases d'une inactivation causée par les ROS (reactive oxygen species). Cette étude est la première à rapporter une action anti-apoptotique de la protéine SOCS-1 reposant sur une régulation du système PTP-thioredoxine. Mais elle ne décrit pas le mécanisme de régulation de l'expression de la thioredoxine en présence de la protéine SOCS-1. Les auteurs suggèrent soit régulation transcriptionnelle du gène codant pour la thioredoxine soit une stabilisation de la protéine (Oh et al., 2009).

Les protéines de la famille SOCS sont cytoplasmiques. D'ailleurs leurs actions inhibitrices sur les voies JAK/STAT nécessitent leur recrutement à proximité du récepteur membranaire. Pourtant, la protéine SOCS-1 peut aussi être observée dans le noyau. Une analyse bioinformatique complétée par des expériences de mutagénèse dirigée ont récemment permis de localiser une NLS bipartite entre le domaine SH2 et le domaine SOCS-box de la protéine SOCS-1 (Baetz et al., 2008). Cette dernière semble être la seule de la famille à posséder une telle séquence. La présence d'une séquence NLS pourrait permettre à la protéine SOCS-1 d'assurer une fonction importante dans la signalisation des glucocorticoïdes (GC) (Haffner et al., 2008). Les récepteurs de GC (GR) sont protéines cytoplasmiques qui une fois activées (fixation des GC) transloquent dans le noyau où elles agissent en facteurs de transcription. Dans des cellules COS-7, des analyses de co-immunoprécipitation indiquent que le domaine SH2 de la protéine SOCS-1 peut interagir avec le récepteur des GC (GR), aussi bien en absence qu'en présence de ligand. Parallèlement, il a été observé qu'un traitement par les GC provoquait une augmentation de la quantité de protéine SOCS-1 dans le noyau. Les auteurs ont analysé les conséquences des modulations de l'expression de la protéine SOCS-1 sur la transcription des gènes cibles des GR, et de manière intéressante, ils ont constaté que la

protéine SOCS-1 est à l'origine d'une inhibition de la transcription de certains gènes régulés par les GR (Haffner et al., 2008).

B.1.2 La protéine SOCS-1, régulateur clé des signaux induits par l'IFN- γ

B.1.2.1 Activation de la voie de signalisation JAK/STAT par IFN- γ

Les interférons forment une famille multi-génique de cytokines dotée d'une activité anti-virale, immuno-modulatrice et anti-proliférative. Ces protéines sont impliquées dans la régulation de la réponse immunitaire et de l'apoptose (Schroder et al., 2004). En fonction de leur origine cellulaire et de leurs propriétés biologiques, on distingue les interférons de type 1 (IFN- α et IFN- β) et de type 2 (IFN- γ).

Pour exercer ses fonctions biologiques, l'IFN- γ se lie sur un récepteur spécifique et active principalement JAK/STAT (Stark et al., 1998). Les protéines IFNGR1 et IFNGR2 forment les deux des chaînes du récepteur de l'IFN- γ . Leurs domaines intracellulaires sont respectivement associés aux protéines kinases JAK1 et JAK2 (Leonard and O'Shea, 1998). En réponse à une stimulation par l'IFN- γ , les chaînes du récepteur s'oligomérisent et autorisent l'activation séquentielle de kinases de la famille JAK. En retour le domaine intra-cytoplasmique de la chaîne IFNGR1 est phosphorylée au niveau d'un résidu aminé tyrosine spécifique (Y440) contenu dans la séquence XGYDKPH. Grâce à leur domaine SH2, des monomères de STAT-1 sont alors recrutés au niveau du résidu P-Y440 et à leur tour activés (phosphorylation sur Y701) (Heim et al., 1995) (Wang et al., 2004). Dans le noyau, les homo-dimères de STAT-1 activés régulent l'expression génique en se liant à des séquences promotrices GAS (Gamma Activated Sequence) (Darnell, 1997). Il a été montré que l'activité transcriptionnelle de ces complexes est régulée par phosphorylation sur les résidus sérine en position 727. Cette modification permet une activation transcriptionnelle maximale des facteurs STATs (Wang et al., 2004).

L'activation de la voie JAK/STAT aboutit à une réponse aux interférons dite, primaire. Elle va néanmoins conduire à la modulation de l'expression de plus d'une centaine de gènes. Parmi ces gènes, on compte les facteurs de transcription de la famille IRF (Interferon-regulated Factor). Ces derniers régulent l'expression des gènes en se fixant aux séquences promotrices des ISGs (Interferon Stimulated Gene) (Tanaka et al., 1993). Ils induisent ainsi une réponse secondaire aux interférons (Tanaka and Taniguchi, 2000). L'expression du gène *irf-1* est induite par l'IFN- α et l'IFN- γ et régulée par le facteur de transcription STAT-1 (Haque and Williams, 1994). Cette réponse secondaire permet à l'IFN- γ de réguler

l'expression de très nombreux gènes (Sana et al., 2005). Parmi les gènes cibles de l'IFN- γ , se trouve aussi le gène *socs-1* (Sakamoto et al., 1998).

B.1.2.2 Effets de la signalisation IFN- γ en absence de la protéine SOCS-1

Le respect d'une fenêtre d'action des interférons autorise les effets immunologiques bénéfiques (action antivirale par exemple) et prévient les effets délétères d'une réponse incontrôlée (Matthys et al., 1995).

Les souris dont le gène *socs-1* a été inactivé meurent dans les trois premières semaines de leur vie avec un poids plus faible que les animaux sauvages au même âge. Ces souris souffrent aussi de pathologies complexes, qui touchent principalement le foie et le système immunitaire (Fujimoto et al., 2000; Marine et al., 1999; Naka et al., 1998; Starr et al., 1998b). (**Tableau 3**) Ces désordres complexes auraient pu être liés à des défauts de régulation des voies de signalisation de l'insuline et de la prolactine (Kawazoe et al., 2001; Lindeman et al., 2001). Mais la similarité des pathologies observées chez les souris *socs-1*^{-/-} et chez des souris sauvages traitées par l'IFN- γ à un stade néonatal, démontre que ces troubles seraient plutôt liés à une réponse excessive à cette cytokine. En effet, lorsque les souris *socs-1*^{-/-} sont traitées dès leur naissance avec un anticorps anti-IFN- γ , elles ne développent pas ce syndrome (Bullen et al., 2001). Pour leurs expérimentations, Alexander et ses collaborateurs ont utilisé des souris double knock-out *socs-1*^{-/-} *IFN- γ* ^{-/-}. Dans cette configuration, les animaux restent en bonne santé et ne développent aucune pathologie. Par contre, l'injection d'IFN- γ est fortement toxique chez les animaux nouveau-nés *socs-1*^{-/-} *IFN- γ* ^{-/-}, et entraîne les mêmes pathologies que celles observées spontanément chez les souris *socs-1*^{-/-} (Alexander et al., 1999).

Organes touchés	Description de la pathologie
Foie	dégénérescence du foie infiltration lymphocytaire avec formation d'agrégats de granulocytes, d'éosinophiles et de macrophages
pancréas, cœur, poumons	invasion de monocytes
sang périphérique	Nombre de polynucléaires neutrophiles augmenté Nombre de globules rouges, de polynucléaires éosinophiles, de lymphocytes et de plaquettes diminué
Rate	Nombre de lymphocytes diminué Absence de follicules lymphoïdes et présence de cellules immatures Augmentation du nombre de cellules en apoptose
Thymus	Diminution de la taille de l'organe reflétant une déplétion en thymocytes. Augmentation du nombre de cellules en apoptose

Tableau 3 : Les troubles relevés chez les souris *socs-1*^{-/-}

Le tableau suivant présente succinctement les désordres physiopathologiques relevés chez les souris *socs-1*^{-/-} et les principaux organes touchés.

Des analyses biochimiques *in-vitro*, ont permis de compléter l'analyse du rôle de la protéine SOCS-1 dans l'atténuation de la signalisation de l'IFN- γ (Brysha et al., 2001). Dans des cellules de foie de souris *socs-1*^{+/+}, après une stimulation par l'IFN- γ , la phosphorylation du facteur de transcription STAT-1 est observée au bout de 15 minutes. Cette phosphorylation est maintenue jusqu'à 2 heures avant de diminuer jusqu'à un niveau indétectable. Par contre, dans les cellules *socs-1*^{-/-}, après une stimulation par l'IFN- γ , la phosphorylation du facteur STAT-1 reste détectable pendant plus de 8 heures. Des expériences complémentaires menées dans des hépatocytes *socs-1*^{-/-} isolés *in-vitro* confirment non seulement une phosphorylation prolongée de la protéine STAT-1 en réponse à une stimulation par l'IFN- γ , mais démontrent aussi la présence de complexes STAT-1 spécifiquement fixés sur l'ADN de ces cellules (Brysha et al., 2001).

Plus récemment, l'équipe de Hanada T a démontré que des souris *socs-1*^{-/-} traitées par de l'IFN- γ développent des tumeurs colorectales de manière spontanée au bout de six mois (Hanada et al., 2006). Pour leurs expériences, les investigateurs ont utilisé des souris chez lesquelles le gène *socs-1* a été inactivé puis spécifiquement restauré dans les cellules T et B (souris *socs-1*^{-/-}Tg). L'apparition de tumeurs colorectales chez ces animaux traités par l'IFN- γ est associée à une hyper-activation du facteur de transcription STAT-1. Cette suractivation s'accompagne de l'induction de l'expression des enzymes de l'inflammation Cox-2 (cyclooxygénase-2) et i-Nos (nitric oxide synthase inductible). Ces résultats suggèrent

fortement qu'en régulant négativement la voie IFN- γ /STAT-1, la protéine SOCS-1 agit en anti-oncogène majeur de la carcinogénèse colique sur terrain inflammatoire.

Une seule étude rapporte un rôle positif direct de la protéine SOCS-1 dans la signalisation de l'IFN- γ . Les glycoprotéines CMH-II participent à la présentation des antigènes aux lymphocytes T CD4+ helper (Germain, 1994). En réponse à l'IFN- γ , l'expression des protéines CMH-II à la membrane est augmentée. Cette régulation par l'IFN- γ intervient au niveau transcriptionnel et post-traductionnel (Gonalons et al., 1998; Hobart et al., 1997). Les travaux menés par Ilangumaran rapportent aussi un effet agoniste de la protéine SOCS-1 dans l'expression des protéines CMH-II. Les expériences réalisées ont suggéré que SOCS-1 pourrait participer à la stabilisation et/ou au transport des protéines CMH-II à la membrane. Mais, le mécanisme de cette régulation n'a pas été caractérisé (Ilangumaran et al., 2002).

B.1.3 La protéine SOCS-1 inhibe l'activité d'oncogènes variés

B.1.3.1 Inhibition de l'activité du récepteur Kit et de la kinase Tec

Le gène *c-kit* code pour une protéine transmembranaire de 145 KDa de la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase. Cette protéine est exprimée par les progéniteurs hématopoïétiques, les mastocytes, les cellules germinales, certaines cellules intestinales mais aussi dans des cellules tumorales (Ronnstrand, 2004). L'inactivation du récepteur c-KIT ou de son ligand le plus connu, le facteur Steel (SLF) démontre que cette voie est impliquée dans la survie cellulaire, la prolifération cellulaire et la différenciation des précurseurs hématopoïétiques (Heinrich et al., 2002). La liaison du SLF au récepteur KIT entraîne la phosphorylation de très nombreux substrats qui sont souvent des kinases et qui servent à la transduction de signaux intracellulaires. Ainsi, une activation constitutive du récepteur c-KIT (mutations somatiques, activité paracrine et/ou autocrine) est à l'origine de nombreux cancers (ovariens, intestinaux, leucémies...).

Des travaux menés dans des cellules hématopoïétiques démontrent que la protéine SOCS-1 est capable d'inhiber le signal induit par l'activation du récepteur c-KIT. Cette inhibition ne repose pas sur une interaction directe entre la protéine SOCS-1 et le récepteur, mais sur une modulation de l'activité des intermédiaires de signalisation Vav et Grb2 (Rottapel et al., 2002). Grâce à son domaine SH2, la protéine SOCS-1 interagit avec le domaine de régulation du facteur Vav et grâce à un motif « proline rich » situé dans sa partie N-terminale, SOCS-1 reconnaît le domaine SH3 de la protéine adaptatrice Grb2 (De Sepulveda et al., 2000). En

bloquant les fonctions de ces intermédiaires de signalisation, la protéine SOCS-1 inhibe la transduction du signal en aval du récepteur KIT.

Dans les cellules hématopoïétiques stimulées par des cytokines, la protéine kinase TEC est activée et phosphorylée sur résidu tyrosine. Un screening par double hybride chez la levure a permis de démontrer que la protéine SOCS-1 s'associe avec la protéine TEC et bloque son activité kinase (Ohya et al., 1997). Ni le rôle de la kinase TEC, ni les mécanismes de transduction de ses signaux ne sont connus. La fonction biologique de l'inhibition de la kinase TEC par la protéine SOCS-1 n'a donc pas encore été caractérisée.

B.1.3.2 Inhibition des effets prolifératifs des protéines oncogéniques Tel/JAK2 et Bcr/ABL

L'expression de la protéine de fusion TEL-JAK2 induit une transformation cellulaire via une augmentation de l'activité de la voie p38MAPK et l'activation des facteurs de transcription STAT-5, STAT-1 et STAT-3 (Schwaller et al., 2000). Une expression constitutive de la protéine SOCS-1 dans les cellules TEL-JAK2 abolit complètement l'activation de ces facteurs de transcription. Il semble que les mécanismes d'action de la protéine SOCS-1 dans l'inhibition de TEL-JAK2 soient les mêmes que ceux mis en jeu lors de la régulation de la kinase JAK-2 (Rottapel et al., 2002; Yasukawa et al., 1999b). Des auteurs rapportent aussi l'ubiquitination et la dégradation de la protéine de fusion TEL-JAK2 en présence de la protéine SOCS-1 (Frantsve et al., 2001; Kamizono et al., 2001; Monni et al., 2001).

Le défaut génétique le plus associé à la leucémie myéloïde chronique est la translocation Philadelphia (Mauro and Druker, 2001). De ce réarrangement chromosomique résulte la protéine de fusion BCR/ABL. Comme pour la protéine chimère TEL-JAK2, la fusion provoque l'activation constitutive de la kinase ABL. Dans les cellules BaF3 transformées BCR-ABL, l'expression de la protéine SOCS-1 inhibe la prolifération cellulaire et la tumorigénicité des ces cellules chez la souris nude (Rottapel et al., 2002). Le mécanisme mis en jeu dans cette régulation n'a pas été identifié, mais dans ce modèle, la protéine SOCS-1 ne semble modifier ni le statut de phosphorylation ni le niveau d'expression de la protéine BCR-ABL.

La protéine v-ABL est une autre forme de l'oncogène ABL. Elle est le résultat d'une transduction rétro-virale et entraîne une leucémie des cellules pré-B chez les souris infectées. La protéine SOCS-1 est capable d'inhiber totalement la croissance des cellules transformées

par l'oncogène v-ABL (Rottapel et al., 2002). La transduction du signal oncogénique de v-ABL entraîne l'activation du facteur STAT-1. L'interaction entre les protéines v-ABL et JAK-1 a été montrée *in-vivo* et prouve que la kinase JAK-1 est une cible de l'oncogène v-ABL (Danial et al., 1998). L'atténuation des signaux provenant de v-ABL par la protéine SOCS-1, pourraient donc être liée à une inhibition de la voie JAK/STAT (Limnander and Rothman, 2004). Dans les cellules v-ABL, l'expression de la protéine SOCS-1 entraîne aussi une diminution du niveau d'expression de la protéine v-ABL (Rottapel et al., 2002). Le groupe de Limnander a émis l'hypothèse que la protéine v-ABL serait capable de contourner cette régulation par la protéine SOCS-1. Les auteurs démontrent que la protéine SOCS-1 est un substrat de la kinase v-ABL. La phosphorylation de la protéine SOCS-1 par la kinase v-ABL provoquerait l'inhibition de l'interaction SOCS-1/ÉlonginesBC. Dans cette configuration, la protéine SOCS-1 ne pourrait plus diminuer le niveau d'expression de la kinase v-ABL (Limnander et al., 2004).

B.1.4 SOCS-1 participe à la dégradation protéasomale de protéines

B.1.4.1 La cascade enzymatique de l'ubiquitination

L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle qui permet la liaison d'une molécule d'ubiquitine à un résidu aminé lysine d'une protéine cible. De manière générale, l'ubiquitination entraîne la dégradation de protéines cytoplasmiques par le protéasome. Mais les ubiquitylations peuvent être à l'origine de multiples signaux (relocalisation cellulaire, stabilisation de la protéine, reconnaissance protéine/protéine...) (Ciechanover, 2009).

L'ubiquitination est un processus séquentiel qui nécessite l'action concertée de trois enzymes (**Figure 8**). L'ubiquitine est d'abord activée par une enzyme E1 dite enzyme d'activation. Elle est ensuite transférée de façon transitoire sur une cystéine conservée d'une enzyme de conjugaison E2. Enfin, l'ubiquitine est transférée de l'enzyme E2 au substrat par une réaction catalysée par une enzyme ubiquitine ligase E3. Les protéines poly-ubiquitinées sont reconnues par la sous unité 26S du protéasome et dégradées en peptides (Nandi et al., 2006).

Il existe plus d'une centaine d'enzymes E3 chez l'homme.

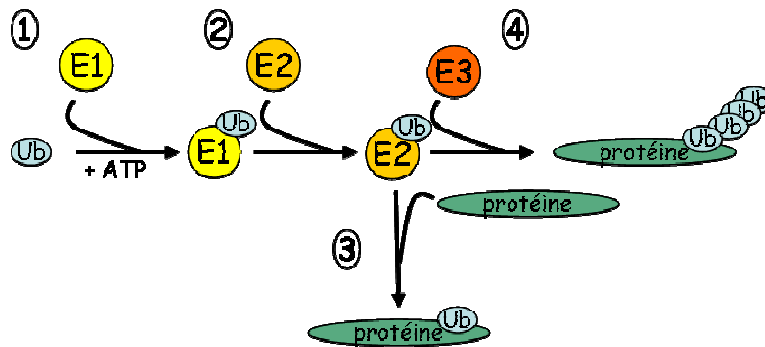


Figure 8: Les étapes de l'ubiquitination

- 1- l'enzyme E1 (ubiquitin-activating enzyme) se fixe à un monomère d'ubiquitine par une liaison thioester et l'active.
- 2- L'ubiquitine est ensuite transférée sur l'enzyme E2 (ubiquitin-conjugating enzyme).
- 3- *In-vitro*, l'E2 peut directement transférer l'ubiquitine sur la protéine, mais cette réaction est très peu efficace.
- 4- Dans la majorité des cas, une enzyme E3 (ubiquitin-protein ligase) est nécessaire pour l'ubiquitination du substrat. Pour certains substrats une enzyme E4 assurerait l'allongement des chaînes de poly-ubiquitine.

On distingue deux grandes classes d'ubiquitine-ligases, les ubiquitine-ligases à domaine HECT (Homologous to E6AP Carboxyl Terminus) et les ubiquitine-ligases à domaine RING (Really Interesting New Gene) finger (Weissman, 2001). Les E3 ubiquitine-ligases à domaine HECT, catalysent le transfert de l'ubiquitine sur le substrat. Par contre, les E3 ubiquitine-ligases à domaine RING semblent plutôt fonctionner comme des protéines adaptatrices qui positionnent le substrat idéalement à proximité de l'enzyme E2 (Jackson et al., 2000). Ces enzymes sont le plus souvent des complexes multimériques. Elles mettent en jeu plusieurs sous-unités différentes pour le recrutement de l'enzyme E2 et la reconnaissance du substrat. Elles se caractérisent par un « noyau » constant qui comprend une protéine de la famille des cullines et une protéine de la famille Rbx ou ROC (porteuse du domaine RING). Cette dernière interagit directement avec l'enzyme E2. La sous-unité qui reconnaît le substrat s'associe au complexe via une ou plusieurs protéines adaptatrices (Petroski and Deshaies, 2005). De très nombreuses protéines peuvent assurer cette fonction d'adaptateur, notamment la protéine SOCS-1.

B.1.4.2 L'activité ubiquitine-ligase de la protéine SOCS-1

Le domaine SOCS-box de la protéine SOCS-1 s'associe à la culline 5 (ou la culline 2) et aux élongines B et C, pour former des complexes E3 de type ESC (Elongine SOCS Cullin) (d'Azzo et al., 2005). L'hétéro-dimère élongine B / élongine C joue le rôle de pont entre le

substrat reconnu par la protéine SOCS-1 et la culline. Deux séquences spécifiques du domaine SOCS-box permettent ces interactions. La séquence B/C box pour l'interaction entre les élongines B et C et la protéine SOCS-1, et la culline box pour l'interaction avec la culline (Zhang et al., 1999). Le recrutement par la culline de la protéine Rbx complète l'assemblage du complexe E3 ligase (Kamura et al., 2004). Ainsi la protéine SOCS-1 amènerait au niveau du complexe les protéines phosphorylées qu'elle a préalablement reconnu via son domaine SH2. La protéine SOCS-1 régulerait ainsi la demi-vie de plusieurs protéines en participant à leur ubiquitination puis à leur dégradation par le protéasome.

La kinase oncogénique TEL-JAK2 phosphoryle directement le facteur STAT-5. Mais elle active aussi, indirectement, la kinase ERK2 en s'associant aux intermédiaires Shc et Grb2 (Winston and Hunter, 1995). Dans des cellules transformées par la protéine TEL/JAK2, l'expression de la protéine SOCS-1 sauvage, mais pas celle de la protéine privée du domaine SOCS-box, provoque une diminution de la phosphorylation de la kinase TEL-JAK2 et de son niveau d'expression (Kamizono et al., 2001). Les auteurs ont aussi montré une interaction entre le domaine SOCS-box de la protéine SOCS-1 et la culline 2. Cette interaction permet l'ubiquitination de la protéine TEL-JAK2 et est indispensable pour sa dégradation par le protéasome (Frantsve et al., 2001; Kamizono et al., 2001). *In-vitro*, l'action de la protéine SOCS-1 permet d'inhiber la prolifération des cellules transformées par la kinase TEL-JAK2. *In-vivo*, la surexpression de la protéine SOCS-1 retarde significativement l'apparition des désordres myelo- et lymphoprolifératifs dûs à l'activité constitutive de la kinase TEL-JAK2 (Frantsve et al., 2001).

La kinase FAK est activée par phosphorylation sur son résidu tyrosine 397. Elle régule alors des réponses cellulaires induites notamment par les intégrines (migration cellulaire, survie cellulaire) (Schaller, 2001). Des expériences de co-immunoprécipitation démontrent que les protéines SOCS-1 et SOCS-3 peuvent interagir avec la kinase FAK activée. Les domaines SH2 et KIR sont alors nécessaires. De plus, grâce à leur domaine SOCS-box, ces protéines SOCS provoquent l'ubiquitination et la dégradation par le protéasome de la kinase activée. *In-vitro*, les protéines SOCS-1 et SOCS-3 inhibent ainsi l'activité de la kinase ERK induite par FAK et empêche la migration cellulaire (Liu et al., 2003a).

Le bon métabolisme du glucose repose largement sur la signalisation de l'insuline au niveau de ses tissus cibles. Les protéines IRS-1 et IRS-2 sont des intermédiaires de signalisation de cette voie. Ils interagissent directement avec le récepteur de l'insuline, lorsqu'il est activé (Ferre, 2007). Il a été démontré que l'expression de la protéine SOCS-1 ou SOCS-3 (mais pas de la protéine SOCS-2), entraîne *in-vivo* et *in-vitro* une diminution du niveau d'expression de

ces facteurs. Chez la souris, la surexpression de la protéine SOCS-1 à l'aide d'un plasmide adénoviral provoque l'apparition d'une intolérance au glucose (Rui et al., 2002).

Dans certains types cellulaires, l'expression de la protéine SOCS-1 est induite après une stimulation par le SCF (Stem Cell Factor) (De Sepulveda et al., 1999). Par ailleurs, l'interaction entre le récepteur KIT et le domaine SH2 de la protéine SOCS-1 a été montrée par co-immunoprécipitation. Pourtant, la protéine SOCS-1 ne semble pas réguler l'activité kinase du récepteur. Par un screening de double hybride chez la levure, l'équipe de De Sepulveda a démontré que la protéine SOCS-1 interagit avec différentes molécules de signalisation dont les facteurs d'échange VAV et VAV2 (De Sepulveda et al., 1999). Les protéines VAV et SOCS-1 forment un complexe dans lequel le domaine SH2 de la seconde interagit avec la région régulatrice NH2-terminale de la première de façon tyrosine dépendante. *In-vivo*, la protéine SOCS-1 stimule la polyubiquitination de la protéine VAV et diminue son niveau d'expression. Parallèlement, les auteurs ont aussi observé une réduction du niveau d'expression et de l'activité de la forme oncogénique (onco-VAV) en présence de la protéine SOCS-1 (De Sepulveda et al., 2000).

L'activité ubiquitine ligase de la protéine SOCS-1 a aussi été mise en évidence dans la dégradation de la protéine Mal. La protéine Mal est une protéine adaptatrice recrutée par les récepteurs TLR activés. Elle assure notamment la transduction du signal pour activer les facteurs de transcription NF κ B et/ou IRF3 (Kobayashi et al., 2006; Naka et al., 2005). Il a été observé que le niveau d'expression de la protéine Mal diminue après stimulation des récepteurs TLR2 et TLR4 (Mansell et al., 2006). Parallèlement, il a été montré que l'expression de la protéine SOCS-1 est induite par des ligands des TLR (Nakagawa et al., 2002). Par des expériences de co-immunoprécipitation, Mansell et al ont montré une interaction entre la protéine Mal phosphorylée et le domaine SH2 de la protéine SOCS-1 et que la surexpression de la protéine SOCS-1 provoque une dégradation de la protéine Mal par le protéasome. Les auteurs suggèrent que l'action de la protéine SOCS-1 sur l'expression de la protéine Mal inhibe la transactivation du facteur NF κ B en réponse à l'activation des TLR2 et TLR4 et réprime la réponse inflammatoire (Mansell et al., 2006).

Certains auteurs suggèrent que les propriétés de la SOCS-box permettrait aussi une régulation du niveau d'expression des protéines SOCS (Piessevaux et al., 2008). En effet, des mutations de la protéine SOCS-1 inhibant l'interaction avec le complexe des élongines B et C, augmenteraient la stabilité de la protéine (Kamura et al., 1998). Mais il a aussi été démontré que l'interaction SOCS-1 / élongines B et C stabilise l'expression des protéines SOCS (Hanada et al., 2001).

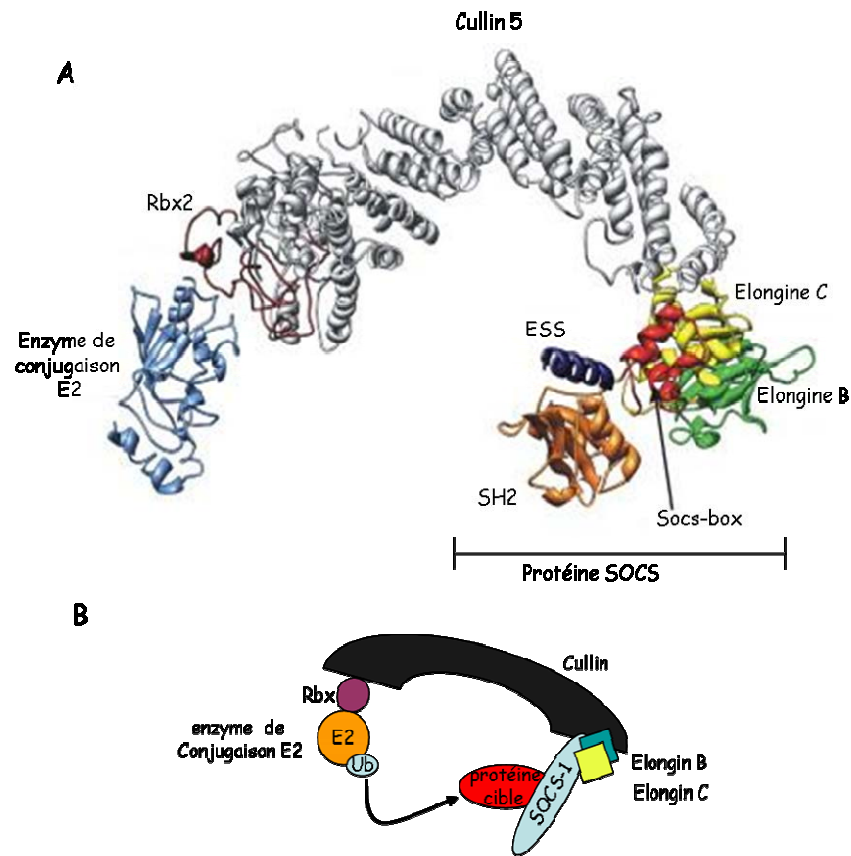


Figure 9 : L'interaction entre le domaine SOCS-box et les élongines B et C

A : Modélisation structurale en ruban du complexe protéique à activité E3 ligase de type ESC (D'après Piessevaux 2008 p371)

B : La protéine SOCS-1 interagit avec des protéines tyrosine phosphorylées grâce à son domaine SH2. Le domaine SOCS-box se lie directement avec les élongines B et C. La protéine Rbx interagit avec l'ubiquitine transférase E2 et permet le transfert de l'ubiquitine sur la protéine cible. Cette dernière sera ensuite dégradée par le protéasome.

B.1.5 La protéine SOCS-1 et le trafic intracellulaire

Il avait déjà été suggéré que la régulation positive de l'expression de la protéine CMH-II par la protéine SOCS-1 pourrait passer par une régulation du transport et/ou de l'assemblage de la protéine CMH-II (Ilangumaran et al., 2002). Mais cette hypothèse n'a pas été vérifiée.

Dans les lignées cellulaires 293T et Cos, Vuong et ses collaborateurs ont pu localiser la protéine SOCS-1 au niveau du protéasome 20S et mettre en évidence son association avec le MTOC (Microtubule organizing complex). Des expériences de co-purification et d'immunolocalisation démontrent que la protéine SOCS-1 recrute la kinase JAK-1 au niveau du MTOC (Vuong et al., 2004).

Récemment, l'implication de la protéine SOCS-1 dans le trafic intracellulaire a été clairement mise en évidence grâce à des travaux sur la réplication du virus HIV-1 (Human

immunodeficiency Virus type-1). Après infection, les virus doivent utiliser la machinerie de transport des cellules pour la production des protéines virales (Naghavi and Goff, 2007). Plusieurs études ont déjà permis d'identifier des protéines cellulaires intervenant dans le trafic et la localisation de protéines virales (Joshi et al., 2008). La protéine HIV-gag mature comporte notamment la capsid, la nucléocapsid et la matrice. Après sa synthèse, la protéine sort du TGN (Trans Golgi Network) et est acheminée à la membrane plasmique. Dans leurs travaux, Ryo et Nishi ont caractérisé les mécanismes moléculaires du transport de HIV-gag à la membrane plasmique (Nishi et al., 2009). Des analyses de PCR semi-quantitative ont d'abord montré une augmentation de la quantité d'ARNm codant pour la protéine SOCS-1 suite à l'infection par le virus HIV-1. Ce phénomène favoriserait la réplication (Ryo et al., 2008). En absence de la protéine SOCS-1, HIV-gag n'est pas relocalisée à la membrane et la production de particules virales est diminuée (Ryo et al., 2008). En utilisant des modulateurs de la dynamique des microtubules et des expériences de co-immunoprécipitation, Nishi et al ont mis en évidence une interaction entre la protéine HIV-gag et les microtubules. Parallèlement, en immunohistofluorescence, ils ont observé une colocalisation entre la protéine SOCS-1 et les microtubules. Ces résultats peuvent laisser penser que la protéine SOCS-1 pourrait être un adaptateur protéique entre HIV-gag et les microtubules (Nishi et al., 2009). A l'heure actuelle, les données ne permettent pas de déterminer si la protéine SOCS-1 pourrait aussi avoir un rôle dans le déplacement de la protéine HIV-gag le long des microtubules.

B.1.6 La protéine SOCS-1 dans l'immunité

Les macrophages et les cellules dendritiques sont les principales cellules de l'immunité innée et les TLR sont les principaux récepteurs de l'immunité induite par les agents pathogènes.

Dans les macrophages, les DC (cellules dendritiques) et les monocytes, les ligands des TLR, les bactéries ou les parasites, induisent l'expression des protéines SOCS-1, SOCS-3 et CIS (Heeg and Dalpke, 2003). De nombreuses études rapportent que la protéine SOCS-1 inhibe les effets de l'IFN- β sécrété suite à l'activation des TLR. Des données expérimentales démontrent aussi l'inhibition de la cascade TLR ou du facteur NFkB par la protéine SOCS-1 (Crocker et al., 2008). En régulant les signaux TLR, la protéine SOCS-1 inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires et protège la cellule des effets immuno-pathologiques d'une réponse inflammatoire trop soutenue (Heeg and Dalpke, 2003).

L'intervention de la protéine SOCS-1 a aussi été rapportée dans la prolifération, la différenciation et la maturation des cellules dendritiques (Hanada et al., 2003; Shen et al., 2004). Certains auteurs soulignent qu'en régulant négativement la voie JAK/STAT, la protéine SOCS-1 pourrait être à l'origine d'une diminution des effets anti-microbiens de l'IFN- γ et/ou d'une perturbation du développement des DC initiée par le GM-CSF (Dalpke et al., 2008).

La protéine SOCS-1 joue également un rôle important dans le développement et la fonction des lymphocytes T. En effet, le niveau d'expression du gène *Socs-1* est particulièrement élevé dans les lymphocytes doubles positifs CD4⁺ CD8⁺. Par contre, il est faible dans les lymphocytes T immatures (Chong et al., 2003). Les cellules T *socs-1*^{-/-} montrent une hypersensibilité aux signaux provenant des cytokines qui agissent via la chaîne γ_c , avec une sur-activation du facteur de transcription STAT-5 en réponse à l'IL-2, l'IL-7 et l'IL-15 (Cornish et al., 2003). L'étude de souris transgéniques indique que l'action de la protéine SOCS-1 permettrait *in-vivo* la différenciation des lymphocytes T helper (Alexander and Hilton, 2004).

Récemment, à l'aide de peptides mimétiques, Ahmed et al ont mis en évidence *in-vivo*, un potentiel rôle de la protéine SOCS-1 dans l'infection par le virus de la vaccine (Ahmed et al., 2009). Les investigateurs ont développé un peptide mimétique de la protéine SOCS-1. Ce dernier bloque donc l'activité kinase de la protéine JAK2 en agissant en pseudo-substrat et inhibe le recrutement et l'activation des facteurs STATs. De manière intéressante, chez la souris, l'administration du peptide protège d'une l'infection létale par le virus de la vaccine. La protection semble optimale lors d'une administration préventive, mais elle peut aussi sauver des animaux préalablement infectés. Des résultats similaires ont été obtenus avec un peptide correspondant uniquement au domaine KIR (Ahmed et al., 2009). Dans les deux cas, les animaux protégés présentent une forte réaction immunitaire. Ces observations suggèrent que la protéine SOCS-1 pourrait assurer une fonction antivirale physiologique. Les auteurs indiquent que l'action de la protéine SOCS-1 pourrait se faire via une inhibition de la phosphorylation des protéines JAK2 et ErbB-1 en réponse au virus.

B.1.7 Evaluation des partenaires de la protéine SOCS-1

Grace à son domaine SH2 et à son motif SOCS-box, la protéine SOCS-1 peut s'engager dans de nombreuses interactions. Le serveur STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins) est un outil informatique qui permet d'analyser les interactions protéiques. Il

intègre des informations provenant de plusieurs sources, notamment bibliographiques et des algorithmes d'analyses bioinformatiques (Jensen et al., 2009). Son interface web, s'interroge à la manière d'une base de données (<http://string32.embl.de:8062/>). L'interrogation du serveur STRING au sujet de la protéine SOCS-1 humaine permet d'évaluer les interactions expérimentalement mises en évidence et les interactions dans lesquelles la protéine pourrait être théoriquement impliquée.

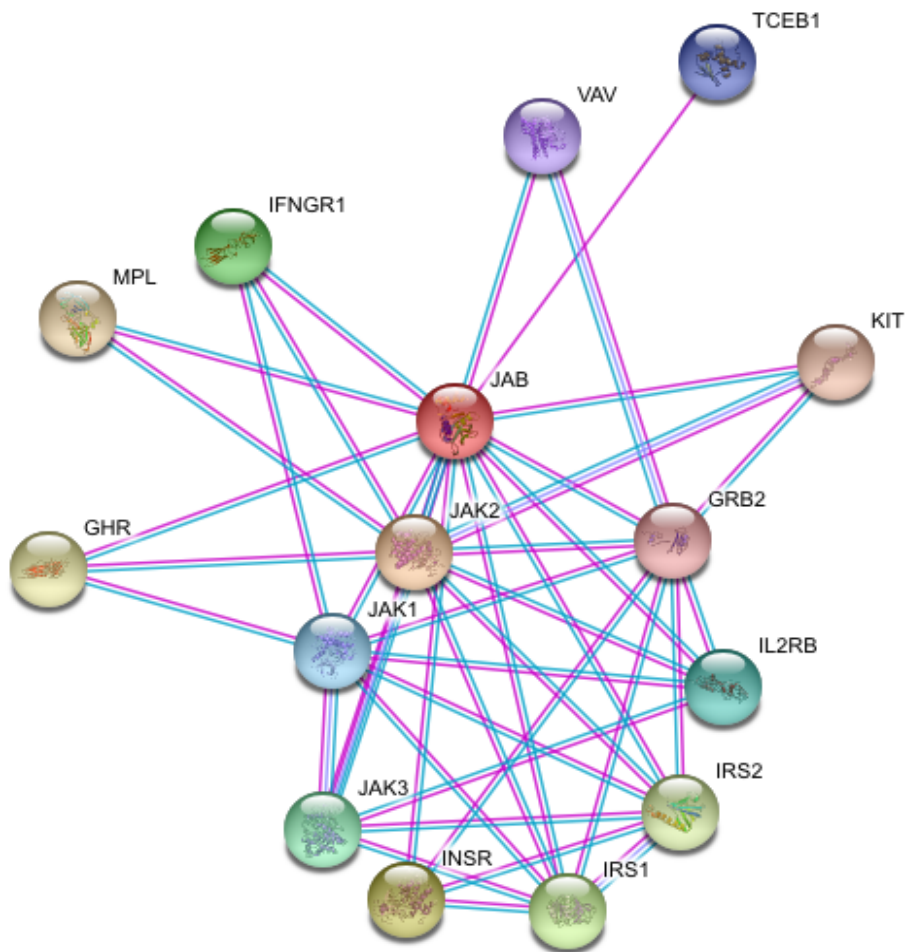


Figure 10 : Les partenaires de la protéine SOCS-1

Le réseau a été généré par le programme STRING32 à partir des données bibliographiques (indexées dans Pubmed) et de l'analyse de la base de séquence du serveur d'EMBL. (indice de confiance minimal 0,9)

Avec un indice minimal de confiance de 0,9 le résultat de l'interrogation du serveur STRING32, indique que quatorze partenaires ont été identifiés expérimentalement (*in-vitro* et/ou *in-vivo* et/ou par double hybride) pour la protéine SOCS-1. A l'exception du cas de la protéine TCEB-1, toutes ces interactions sont « prédites » par l'outil bio-informatique.

Mais l'analyse des homologies de séquence suggère que la protéine SOCS-1 pourrait avoir bien plus de partenaires (**tableau 4**).

Your Input:

- JAB** Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) (JAK-binding protein) (JAB) (STAT-induced STAT inhibitor 1) (SSI-1) (Tec-interacting protein 3) (TIP-3); SOCS family proteins form part of a classical negative feedback system that regulates cytokine signal transduction. SOCS1 is involved in negative regulation of cytokines that signal through the JAK/STAT3 pathway. Through binding to JAKs, inhibits their kinase activity. In vitro, also suppresses Tec protein- tyrosine activity. Appears to be a major regulator of signaling by interleukin 6 (IL6) and leukemia inhibitory factor (LIF). Regulates [...] (211 aa) (*Homo sapiens*)

Predicted Functional Partners:

		Neighborhood	Gene Fusion	Cocurrence	Coexpression	Experiments	Databases	Textmining	[homology]	Score
JAK2	Tyrosine-protein kinase JAK2 (EC 2.7.10.2) (Janus kinase 2) (JAK-2); Plays a role in leptin sig [...] (1132 aa)	x	x	x	x	x	x	x	x	0.999
INSR	Insulin receptor precursor (EC 2.7.10.1) (IR) (CD220 antigen) [Contains- Insulin receptor subun [...] (1382 aa)	x	x	x	x	x	x	x	x	0.972
IRS1	Insulin receptor substrate 1 (IRS-1); May mediate the control of various cellular processes by [...] (1242 aa)	x	x	x	x	x	x	x	x	0.972
IFNGR1	Interferon-gamma receptor alpha chain precursor (IFN-gamma-R1) (CD119 antigen) (CDw119); Recept [...] (489 aa)	x	x	x	x	x	x	x	x	0.960
JAK3	Tyrosine-protein kinase JAK3 (EC 2.7.10.2) (Janus kinase 3) (JAK-3) (Leukocyte janus kinase) (L [...] (1131 aa)	x	x	x	x	x	x	x	x	0.960
IL2RB	Interleukin-2 receptor subunit beta precursor (IL-2 receptor) (P70-75) (p75) (High affinity IL- [...] (551 aa)	x	x	x	x	x	x	x	x	0.959
JAK1	Tyrosine-protein kinase JAK1 (EC 2.7.10.2) (JAK-1); Tyrosine kinase of the non [...] (1156 aa)	x	x	x	x	x	x	x	x	0.959
TCEB1	Transcription elongation factor B polypeptide 1 (RNA polymerase II transcription factor SIII su [...] (112 aa)	x	x	x	x	x	x	x	x	0.953
VAV	Proto-oncogene vav; Couples tyrosine kinase signals with the activation of the Rho/Rac GTPases, [...] (845 aa)	x	x	x	x	x	x	x	x	0.928
GRB2	Growth factor receptor-bound protein 2 (Adapter protein GRB2) (SH2/SH3 adapter GRB2) (Protein A [...] (217 aa)	x	x	x	x	x	x	x	x	0.928
KIT	Mast/stem cell growth factor receptor precursor (EC 2.7.10.1) (SCFR) (Proto-oncogene tyrosine-p [...] (976 aa)	x	x	x	x	x	x	x	x	0.928
MPL	Thrombopoietin receptor precursor (TPO-R) (Myeloproliferative leukemia protein) (C-mpl) (CD110 [...] (635 aa)	x	x	x	x	x	x	x	x	0.921
GHR	Growth hormone receptor precursor (GH receptor) (Somatotropin receptor) [Contains- Growth hormo [...] (638 aa)	x	x	x	x	x	x	x	x	0.920
IRS2	Insulin receptor substrate 2 (IRS-2); May mediate the control of various cellular processes by [...] (1338 aa)	x	x	x	x	x	x	x	x	0.919
IL4R	Interleukin-4 receptor alpha chain precursor (IL-4R-alpha) (CD124 antigen) [Contains- Soluble i [...] (825 aa)	x	x	x	x	x	x	x	x	0.899
CD212	Interleukin-12 receptor beta-1 chain precursor (IL-12R-beta1) (Interleukin-12 receptor beta) (I [...] (662 aa)	x	x	x	x	x	x	x	x	0.899
IL2	Interleukin-2 precursor (IL-2) (T-cell growth factor) (TCGF) (Aldesleukin); Produced by T-cells [...] (153 aa)	x	x	x	x	x	x	x	x	0.899
SF	Kit ligand precursor (C-kit ligand) (Stem cell factor) (SCF) (Mast cell growth factor) (MGF); S [...] (273 aa)	x	x	x	x	x	x	x	x	0.899
IFNG	Interferon gamma precursor (IFN-gamma) (Immune interferon); Produced by lymphocytes activated b [...] (166 aa)	x	x	x	x	x	x	x	x	0.899
IL12B	Interleukin-12 subunit beta precursor (IL-12B) (IL-12 subunit p40) (Cytotoxic lymphocyte matura [...] (328 aa)	x	x	x	x	x	x	x	x	0.899
IL4	Interleukin-4 precursor (IL-4) (B-cell stimulatory factor 1) (BSF-1) (Lymphocyte stimulatory fa [...] (153 aa)	x	x	x	x	x	x	x	x	0.899
IL12RB2	Interleukin-12 receptor beta-2 chain precursor (IL-12 receptor beta-2) (IL-12R-beta2); Receptor [...] (862 aa)	x	x	x	x	x	x	x	x	0.899
PIAS4	E3 SUMO-protein ligase PIAS4 (Protein inhibitor of activated STAT protein 4) (Protein inhibitor [...] (510 aa)	x	x	x	x	x	x	x	x	0.899
JTK1	Non-receptor tyrosine-protein kinase TYK2 (EC 2.7.10.2); Probably involved in intracellular sig [...] (1187 aa)	x	x	x	x	x	x	x	x	0.899
IL2RG	Cytokine receptor common gamma chain precursor (Gamma-C) (Interleukin- 2 receptor gamma chain) [...] (369 aa)	x	x	x	x	x	x	x	x	0.899
STAT5B	Signal transducer and activator of transcription 5B; Carries out a dual function- signal transd [...] (787 aa)	x	x	x	x	x	x	x	x	0.899
STAT6	Signal transducer and activator of transcription 6 (IL-4 Stat); Carries out a dual function- si [...] (847 aa)	x	x	x	x	x	x	x	x	0.899
p35	Interleukin-12 subunit alpha precursor (IL-12A) (IL-12 subunit p35) (Cytotoxic lymphocyte matur [...] (253 aa)	x	x	x	x	x	x	x	x	0.899
ETS1	C-ets-1 protein (p54); Transcription factor (441 aa)	x	x	x	x	x	x	x	x	0.899
LCK	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase LCK (EC 2.7.10.2) (p56-LCK) (Lymphocyte cell-specific pr [...] (539 aa)	x	x	x	x	x	x	x	x	0.899
STAT5A	Signal transducer and activator of transcription 5A; Carries out a dual function- signal transd [...] (794 aa)	x	x	x	x	x	x	x	x	0.899
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta (Transcription factor ISGF-3 comp [...] (750 aa)	x	x	x	x	x	x	x	x	0.899
IL13RA1	Interleukin-13 receptor alpha-1 chain precursor (IL-13R-alpha-1) (IL- 13RA-1) (CD213a1 antigen) [...] (427 aa)	x	x	x	x	x	x	x	x	0.899
IRF1	Interferon regulatory factor 1 (IRF-1); Specifically binds to the upstream regulatory region of [...] (325 aa)	x	x	x	x	x	x	x	x	0.899
IL2RA	Interleukin-2 receptor alpha chain precursor (IL-2 receptor alpha subunit) (IL-2-RA) (IL2-RA) ([...] (272 aa)	x	x	x	x	x	x	x	x	0.899
HRAS	GTPase HRas precursor (Transforming protein p21) (p21ras) (H-Ras-1) (c-H-ras) (Ha-Ras); Ras pro [...] (273 aa)	x	x	x	x	x	x	x	x	0.899
IGF1R	Insulin-like growth factor 1 receptor precursor (EC 2.7.10.1) (Insulin-like growth factor I rec [...] (1367 aa)	x	x	x	x	x	x	x	x	0.871
EPOR	Erythropoietin receptor precursor (EPO-R); Receptor for erythropoietin. Mediates erythropoietin [...] (508 aa)	x	x	x	x	x	x	x	x	0.800
IL10R	Interleukin-10 receptor alpha chain precursor (IL-10R-A) (IL-10R1) (CDw210a antigen); Receptor [...] (578 aa)	x	x	x	x	x	x	x	x	0.800
CNTFR	Ciliary neurotrophic factor receptor alpha precursor (CNTFR alpha); Binds to CNTF. The alpha ch [...] (372 aa)	x	x	x	x	x	x	x	x	0.800
IL13RA2	Interleukin-13 receptor alpha-2 chain precursor (Interleukin-13- binding protein) (CD213a2 anti [...] (380 aa)	x	x	x	x	x	x	x	x	0.800
IL9R	Interleukin-9 receptor precursor (IL-9R) (CD129 antigen); This is a receptor for interleukin-9 (521 aa)	x	x	x	x	x	x	x	x	0.800
IRS4	insulin receptor substrate 4; Acts as an interface between multiple growth factor receptors pos [...] (1257 aa)	x	x	x	x	x	x	x	x	0.800
IL5RA	Interleukin-5 receptor alpha chain precursor (IL-5R-alpha) (CD125 antigen) (CDw125); This is th [...] (420 aa)	x	x	x	x	x	x	x	x	0.800
IL5RB	Cytokine receptor common beta chain precursor (GM-CSF/IL-3/IL-5 receptor common beta-chain) (CD [...] (897 aa)	x	x	x	x	x	x	x	x	0.800
LIFR	Leukemia inhibitory factor receptor precursor (LIF receptor) (LIF-R) (CD118 antigen); Signal-tr [...] (1097 aa)	x	x	x	x	x	x	x	x	0.800
IL22RA1	interleukin 22 receptor, alpha 1; Component of the receptor for IL20, IL22 and IL24. Component [...] (574 aa)	x	x	x	x	x	x	x	x	0.800
IL10RB	Interleukin-10 receptor beta chain precursor (IL-10R-B) (IL-10R2) (Cytokine receptor family 2 m [...] (325 aa)	x	x	x	x	x	x	x	x	0.800
IL22RA2	Interleukin-22 receptor alpha-2 chain precursor (IL-22R-alpha-2) (Interleukin 22-binding protei [...] (263 aa)	x	x	x	x	x	x	x	x	0.800

Tableau 4: Les partenaires potentiels de la protéine SOCS-1

Ce tableau liste les partenaires protéiques de la protéine SOCS-1 proposés par le programme STRING32 de EMBL en analysant sa base de données de séquences et les publications indexées dans PubMed (Indice de confiance minimal 0,8).

La majorité des partenaires potentiels identifiés par l'outil informatique n'a pas encore été validée expérimentalement. Les analyses bioinformatiques ne tiennent évidemment pas compte de la réalité biologique, mais ce résultat peut laisser suggérer qu'à ce jour, tous les partenaires de la protéine SOCS-1 n'ont pas encore été mis en évidence.

B.2 Régulation de l'expression de la protéine SOCS-1

La transcription du gène *Socs-1* est activée par de nombreuses cytokines. Les fonctions biologiques variées de cette protéine la relie aussi bien à la régulation de l'inflammation qu'au développement tumoral. La littérature rapporte de nombreux cas de cancers dans lesquels l'expression du gène *Socs-1* est perturbée. Par contre, dans la cellule normale, le niveau d'expression de la protéine SOCS-1 est finement régulé.

B.2.1 La méthylation de l'ADN génomique

B.2.1.1 Mécanismes généraux de la méthylation de l'ADN génomique

La méthylation de l'ADN est une modification post-réplivative de type épigénétique. Une réaction chimique catalysée par les DNMT (DNA Methyl Transférases) permet d'ajouter un groupement méthyle à une cytosine (**Figure 11A**) (Herman and Baylin, 2003). Chez les mammifères, seules les CpGs (cytosines preceding a Guanine) peuvent être concernées par ce type de modification. Les CpGs ne sont pas uniformément réparties dans le génome. Elles sont souvent regroupées et forment des « clusters » appelés îlots. Lorsqu'elle est corrélée à une inhibition de l'expression génique, la méthylation des CpGs est généralement localisée au niveau des régions promotrices. Plus exceptionnellement, des méthylations d'îlots CpGs peuvent être observées dans des introns ou des exons (Reik and Dean, 2001).

La méthylation de l'ADN modifie localement la structure chromatinienne. Au final, la méthylation de l'ADN empêche l'accès des facteurs de transcription et leurs co-activateurs aux régions régulatrices de l'expression génique (Baylin et al., 2001) (**Figure 11B**). Dans les conditions physiologiques, la méthylation permet de maintenir certaines régions du génome dans un état transcriptionnellement inactif. C'est le cas par exemple pour l'inactivation des gènes du chromosome X (Reik and Dean, 2001). Mais, dans des contextes tumoraux, l'inhibition d'expression par méthylation touche de nombreux gènes suppresseurs de tumeurs de façon aberrante (*BRCA1*, *Cdh1*, *Apc*, *Rb1*) (Luczak and Jagodzinski, 2006).

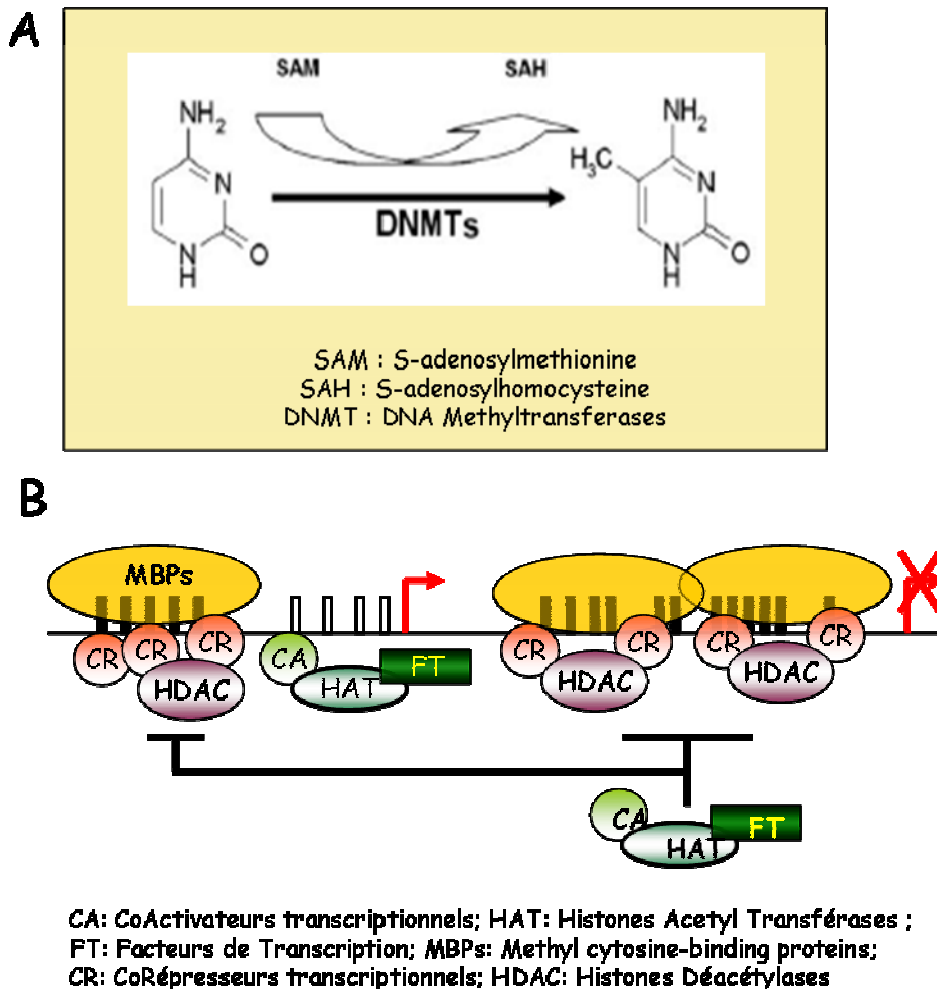


Figure 11 : La méthylation de l'ADN

A- La réaction chimique de la méthylation

La méthylation est une modification chimique de l'ADN. Les enzymes DNA-méthyltransférases (DNMTs) catalysent l'ajout d'un groupement méthyl sur des cytosines situées dans des îlots CpG. La S-adenosylméthinine (SAM) et la S-adenosylhomocystéine (SAH) sont respectivement donneur et accepteur de protons de cette réaction.

B- Mécanisme du réarrangement chromatinien lors de la méthylation de l'ADN

Les protéines MBP (Methyl Binding Proteins) se fixent au niveau des îlots CpG méthylés. Elles interagissent directement avec les protéines HDAC (Histones DéAcétylases) et des co-répresseurs transcriptionnels. La chromatine est ainsi maintenue dans un état qui empêche l'accès de la machinerie transcriptionnelle aux zones régulatrices.

B.2.1.2 Méthylation du gène *Socs-1* dans les tumeurs humaines

Le phénotype CIMP positif (CpG methylator phenotype) décrit des patients atteints de cancer (colorectal, gastrique et thyroïdien principalement) chez lesquels on relève une hyperméthylation de plusieurs gènes (Toyota et al., 1999a; Toyota et al., 1999b). Dans ce travail, les auteurs ont observé que le gène *Socs-1* est spécifiquement hyperméthylé chez ces malades.

La séquence du gène *Socs-1* contient de nombreuses CpGs. Ces dernières sont réparties de part et d'autre du site d'initiation de la transcription (Galm et al., 2003). L'inhibition de l'expression du gène *Socs-1* par hyper-méthylation de l'ADN a été associée au développement des hépatocarcinomes (Miyoshi et al., 2004; Okochi et al., 2003). Les modifications de profil de méthylation du gène *Socs-1*, ont été observées au niveau de la région promotrice, mais aussi dans la région codante (exon 2) (Galm et al., 2003). D'autres études rapportent la méthylation de l'ADN du gène *Socs-1* dans des tumeurs solides (carcinomes du sein, des ovaires, de l'estomac, du côlon...) (Fujitake et al., 2004; Fukushima et al., 2003; Lin et al., 2004; Nagai et al., 2003; Oshimo et al., 2004; Sutherland et al., 2004; To et al., 2004) et des désordres hématopoïétiques (leucémies myéloïdes acquises, myélomes...) (Brakensiek et al., 2005; Chen et al., 2003a; Ekmekci et al., 2004; Galm et al., 2003; Liu et al., 2003b; Watanabe et al., 2004).

L'inhibition de l'expression du gène *Socs-1* par une hyperméthylation aberrante, provoque, entre autre, l'activation d'effecteurs de la voie JAK/STAT (Brakensiek et al., 2005). Dans la plupart des cas, la restauration de l'expression de la protéine inhibe la prolifération des cellules cancéreuses. Cette observation renforce l'idée que le gène *Socs-1* puisse être un gène suppresseur de tumeur.

B.2.2 La régulation transcriptionnelle

Il a été observé depuis longtemps, que les facteurs de transcription de la famille STAT assuraient un rôle clef dans la régulation de l'expression du gène *Socs-1* (Naka et al., 1997). Des éléments de réponse pour les facteurs STATs ont été identifiés sur les promoteurs des gènes *Cis*, *Socs-1* et *Socs-3* (He et al., 2003; Matsumoto et al., 1997). Une première étude de Hebenstreit a mis en évidence le rôle de trois SBE (STAT6 binding Element) dans la réponse à l'IL-4. Ces séquences présentent dans la région promotrice du gène *Socs-1* (-691/-606), doivent être intactes pour une induction maximale du gène en réponse à l'IL-4 ou à l'IL-13 (Hebenstreit et al., 2003). Par la suite, un travail effectué à l'aide de l'outil informatique a permis de mettre en évidence d'autres sites régulateurs sur le promoteur du gène *Socs-1*. (Travagli et al., 2004). En plus des trois SBE déjà décrits, des potentiels sites de fixation pour les facteurs AP-1, GATA-1, IRF-1, Sp-1 et Ets-1 ont été identifiés. Les auteurs se sont concentrés sur les sites de fixation du facteur Ets-1 proches des SBEs. Leurs expériences indiquent que les facteurs de transcription STAT-6 et Ets-1 pourraient former un complexe capable de se lier au SBE le plus distal. La surexpression de la protéine ETS-1 dans les

cellules de la lignée HaCaT provoque une inhibition de l'activation du promoteur de *Socs-1* en réponse à l'IL-4 (Travagli et al., 2004).

L'expression du gène *Socs-1* est aussi induite par des molécules qui n'activent pas la voie JAK/STAT. C'est le cas pour le LPS (lipopolysaccharide) (Nakagawa et al., 2002) et plus globalement pour les ligands des TLR (Dalpke et al., 2008) sans que les mécanismes d'activation soient décrits. Des tests d'activation transcriptionnelle et des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine démontrent que le facteur Egr-1 (Early growth response factor -1) induit l'expression du gène *Socs-1* dans les lignées cellulaires murines THP-1 et RAW264.7 (Mostecky et al., 2005). On ne peut donc pas exclure que des analyses complémentaires de la région promotrice du gène *Socs-1* pourraient mettre en évidence le rôle d'autres facteurs de transcription.

B.2.3 La répression traductionnelle

Une régulation post-traductionnelle de la protéine SOCS-1 a été décrite par deux équipes (Gregorieff et al., 2000; Schluter et al., 2000). Le gène *Socs-1* a initialement été décrit comme comportant un unique exon (Naka et al., 1997). En fait, l'ARNm du gène *socs-1* code pour deux exons (Schluter et al., 2000). Le premier exon est composé d'une partie de la région 5'UTR (UnTranslated Region) alors que le second exon, beaucoup plus grand, contient une partie de la région 5'UTR, la région codante et la région 3'UTR. (**Figure 12**)

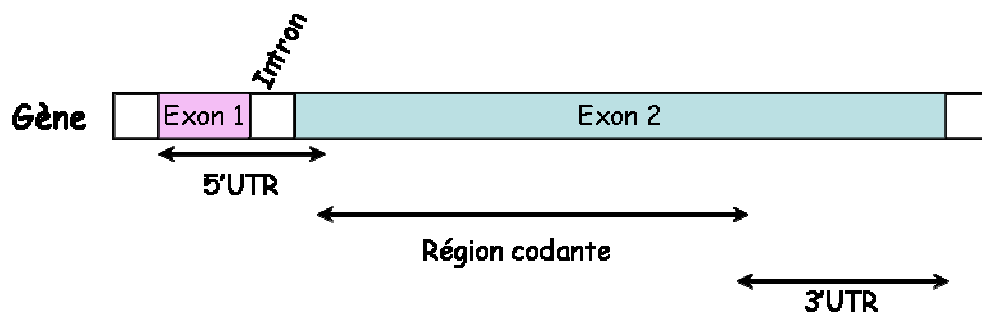


Figure 12: Structure du gène *Socs-1*

Le gène *Socs-1* contient deux exons séparés par un petit intron. La région codante (639 aa) et la région 3'UTR (404 aa) sont situées dans le deuxième exon. La région 5'UTR (134 aa) contient le premier exon, l'intron et une petite partie du deuxième exon.

Les travaux de Gregorieff et al ont démontré que la région 5'UTR est responsable d'une inhibition de la traduction de la protéine. Une étude comparative des régions 5'UTR des transcrits *socs-1* humains et murins a permis d'identifier une ORF (Open Reading Frame)

avec deux codons d'initiation (AUG) et un codon stop (UAG) en amont du véritable AUG (Gregorieff et al., 2000) (**figure 13**).

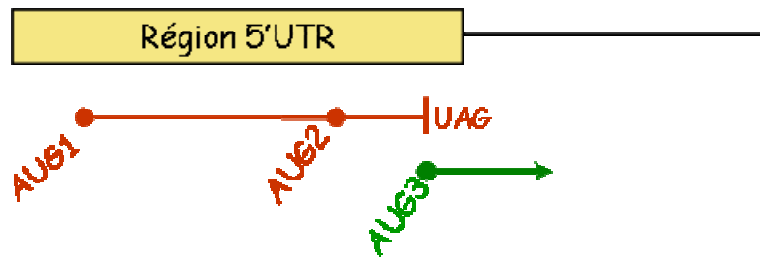


Figure 13 : Schéma de la région 5'UTR du gène *Socs-1*

Il existe dans la région 5'UTR du gène *socs-1* une ORF supplémentaire qui contient deux AUGs (AUG 1 et AUG 2) situés en amont du principal AUG (AUG3). Seul l'AUG3 situé au début de l'exon 2 est à l'origine d'une protéine complète et fonctionnelle.

La mutation de l'AUG 1 ou de l'AUG 2 en UUG n'a que peu d'effet sur le niveau d'expression de la protéine. Par contre, les mutations simultanées de ces deux AUGs provoquent une forte augmentation de la quantité de protéine produite (Gregorieff et al., 2000; Schluter et al., 2000). L'inhibition d'une ORF par la présence d'une autre ORF plus en amont est un mécanisme connu. Ce système de régulation post-transcriptionnel a déjà été observé pour d'autres protéines (Bcl-2, RAR β 2...) (Kozak, 1996; Reynolds et al., 1996). Son importance dépend d'ailleurs du type cellulaire. Mais la fonction exacte de ce mécanisme reste inconnue.

B.2.4 La stabilisation de la protéine

Les trois protéines serine/thréonine kinases de la famille Pim sont des oncoprotéines. Ces kinases sont impliquées dans le développement de cancers chez l'Homme et chez la souris (Cuypers et al., 1984). Une étude publiée en 2002 démontre par plusieurs approches (double hybride, co-immunoprécipitations) que les kinases Pim s'associent à la protéine SOCS-1 et la phosphorylent *in-vitro* et *in-vivo* (Chen et al., 2002). La phosphorylation de la protéine SOCS-1 par les kinases de la famille Pim augmente sa demi-vie et prolonge son action inhibitrice sur les voies JAK/STAT. Si la kinase Pim-2 est surexprimée, le cycloheximide (inhibiteur de la synthèse protéique) n'a pas d'effet sur le niveau d'expression de la protéine SOCS-1 et inversement, les souris transgéniques *Pim*^{-/-} présentent une suractivation du facteur de transcription STAT-6 en réponse à une stimulation par l'IL-4.

Les kinases de la famille Pim interagissent avec la protéine SOCS-1 au niveau de son domaine N-terminal. Par contre leurs sites de phosphorylation se situent au niveau du domaine SOCS-box. Cette phosphorylation de la protéine SOCS-1 inhiberait son interaction avec le complexe des élongines B et C. Les auteurs suggèrent que dans ce cas, la protéine SOCS-1 pourrait être à son tour être dégradée par le protéasome (Chen et al., 2002).

B.3 Les autres protéines de la famille SOCS

L'analyse des séquences primaires et des structures génétiques suggère que les protéines de la famille SOCS peuvent être rapprochées par paires (Hilton et al., 1998) : CIS et SOCS-2, SOCS-1 et SOCS-3, SOCS-4 et SOCS-5 puis SOCS-6 et SOCS-7.

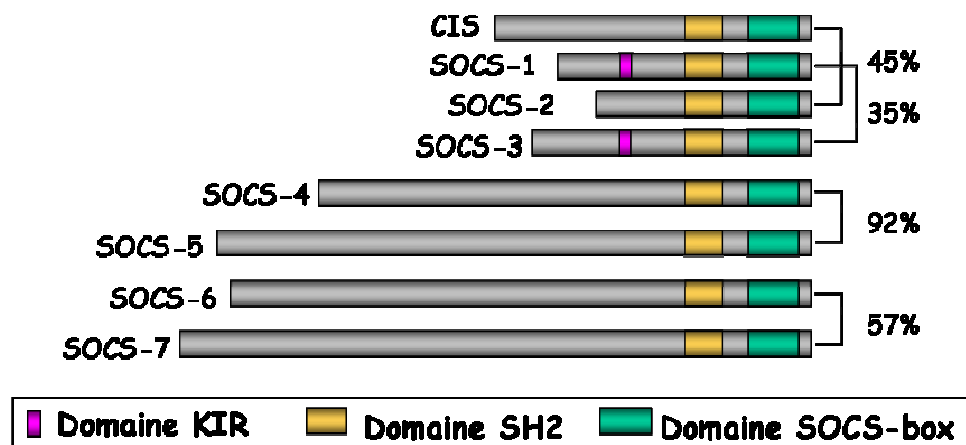


Figure 14 : L'homologie entre les membres de la famille SOCS

Les huit membres de la famille SOCS partagent une structure commune.

L'analyse de leurs séquences protéiques indique que certains membres sont très proches. Les pourcentages d'homologie de séquences sont indiqués sur la droite.

(D'après Alexander WS 2002)

B.3.1 La protéine SOCS-3

Après la protéine SOCS-1, la protéine SOCS-3 est le deuxième membre de la famille le plus étudié. La protéine SOCS-3 présente de très nombreuses similarités avec la protéine SOCS-1. Leurs régions N-terminales sont d'ailleurs interchangeables (Nicholson et al., 1999).

La protéine SOCS-3 inhibe les signaux provenant de nombreuses cytokines et hormones de croissance. Certaines inhibitions sont communes avec la protéine SOCS-1 (LIF, IL-6, IL-4, GH et PRL) mais l'action de la protéine SOCS-3 a aussi ses spécificités (IL-2, IL-3 et la leptine) (Nicholson et al., 2000).

Les protéines SOCS-3 et SOCS-1 peuvent être immunoprécipitées avec la kinase JAK-2, mais seule SOCS-1 inhibe efficacement l'activité kinase *in-vitro* (Narazaki et al., 1998; Sasaki et al., 1999; Yasukawa et al., 1999b). En fait, la protéine SOCS-3 n'interagit pas directement avec la kinase JAK-2. Elle reconnaît spécifiquement le résidu tyrosine Y759 de la chaîne gp 130 humaine lorsqu'il est phosphorylé et se fixe au récepteur activé (Schmitz et al., 2000). Elle inhibe ensuite l'activité des kinases JAKs grâce à son domaine KIR (Masuhara et al., 1997) (**figure 15**).

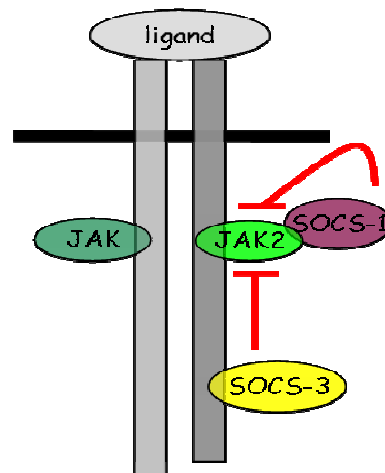


Figure 15 : Mécanismes d'action comparés des protéines SOCS-1 et SOCS-3

La protéine SOCS-3 inhibe l'activité kinase des protéines JAK après s'être fixée au récepteur, alors que la protéine SOCS-1 bloque l'activité catalytique de JAK2 par interaction directe.

L'expression de l'ARNm des gènes *Socs-1* et *Socs-3* est induite par le G-CSF. Les deux protéines assurent un fort rétrocontrôle des effets prolifératifs induits par ce facteur croissance. Elles inhibent l'activation du facteur STAT-5 en se fixant sur le résidu tyrosine 729 phosphorylé du récepteur activé. Si le résidu tyrosine 729 est muté ou absent (comme chez les patients atteints d'AML chez qui le récepteur G-CSFR est souvent tronqué), la régulation négative par les protéines SOCS-1 et SOCS-3 est abolie (Zhuang et al., 2005).

Grâce au domaine SOCS-box, la protéine SOCS-3 participe à l'ubiquitination de certains récepteurs membranaires. Il a été démontré qu'en présence de la protéine SOCS-3, la dégradation du récepteur CD33 et du récepteur Siglec-7 (Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin 7) est accélérée (Orr et al., 2007a; Orr et al., 2007b). Comme la protéine SOCS-1, la protéine SOCS-3 concourt aussi à la dégradation des intermédiaires de signalisation IRS-1 et IRS-2, mais aussi à celle de la kinase FAK (Liu et al., 2003a; Rui et al., 2002). L'analyse des souris transgéniques *Socs-3ΔSocs-box^{-/-}* démontre le rôle de ces multiples dégradations *in-vivo*. En effet, ces animaux présentent une hypersensibilité au G-CSF et une réponse inflammatoire altérée (Boyle et al., 2007). Par contre l'inactivation complète du gène *Socs-3*

est létale. Les embryons succombent à une érythropoïèse fœtale excessive (Marine et al., 1999).

Les résidus 204 à 221 du domaine carboxy-terminal de la protéine SOCS-3 peuvent être spécifiquement phosphorylés après une stimulation par plusieurs cytokines (IL-2, IL-6) et facteurs de croissance (EGF, PGDF) (Cacalano et al., 2001; Peraldi et al., 2001). Il a été démontré que la protéine SOCS-3 phosphorylée sur son résidu tyrosine 212 après une stimulation par l'IL-2, interagit avec la protéine inhibitrice de Ras, la p120RasGAP (Cacalano et al., 2001). Cette interaction provoque le maintien de l'activation de la voie ERK en réponse à l'IL-2 alors que la protéine SOCS-3 (même phosphorylée) assure l'inhibition du facteur STAT-5 (Cacalano et al., 2001). En absence de phosphorylation, la protéine SOCS-3 bloque à la fois la voie IL-2/STAT-5 et la voie IL-2/ERK en laissant libre action à la p120RasGAP.

Dans des cellules dérivées de leucémie, il a été rapporté qu'une expression élevée de la protéine SOCS-3 pourrait favoriser la croissance tumorale (Sakai et al., 2002). Mais, le plus souvent, dans les tumeurs solides, le gène *SoCS-3* est fréquemment hyperméthylé (Teofili et al., 2008). L'inhibition de l'expression de la protéine SOCS-3 est alors associée à une prolifération et une survie cellulaire augmentées (Niwa et al., 2005; Weber et al., 2005).

B.3.2 Les protéines CIS et SOCS-2

La protéine CIS (Cytokine inducible SH2-containing protein) a été caractérisée comme étant rapidement induite après une stimulation par l'IL-3 (Matsumoto et al., 1997; Yoshimura et al., 1995). Des études de surexpression de la protéine ont démontré que la protéine CIS inhibe la signalisation induite par l'EPO, l'IL-2, la PRL et le GM-CSF en entrant en compétition avec le facteur de transcription STAT-5 au niveau de la chaîne IL-3 β phosphorylée des récepteurs concernées (Aman et al., 1999; Matsumoto et al., 1997). Les souris transgéniques pour le gène *Cis-1* ont un développement normal mais un poids plus faible que les souris sauvages. Des défauts de lactation sont aussi été observés chez les femelles. L'analyse des cellules T a mis en évidence une altération de la différenciation Th1/Th2 chez ces animaux (Matsumoto et al., 1999).

La GH induit l'expression de plusieurs protéines de la famille SOCS (CIS, SOCS-1, SOCS-2, SOCS-3). *In-vitro*, elles interagissent toutes avec le récepteur GHR, mais *in-vivo* seule la protéine SOCS-2 semble réguler les effets de la GH (Greenhalgh et al., 2002b; Tollet-Egnell et al., 1999). Elle inhibe alors la voie de signalisation JAK-2/STAT-5 (Hansen et al., 1999).

Les souris *Socs-2*^{-/-} souffrent de gigantisme. Elles présentent une hypertrophie des viscères et des os (Metcalf et al., 2000). Ces animaux sont hypersensibles à la GH (Greenhalgh et al., 2002b) et présentent une activation prolongée de STAT5b en réponse à cette hormone (Greenhalgh et al., 2002a).

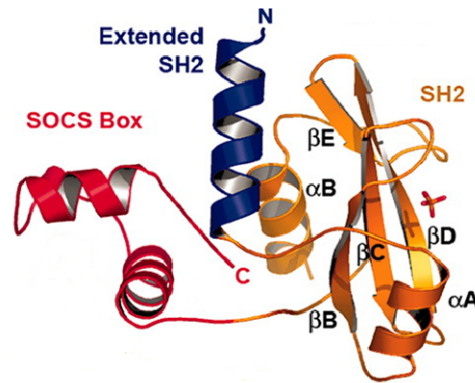


Figure 16 : Structure tridimensionnelle de la protéine SOCS-2
(Bullock et al., 2006)

B.3.3 Les protéines SOCS-4 et SOCS-5

Les protéines SOCS-4 et SOCS-5 ont environ 50% d'homologie (Hilton et al., 1998).

La protéine SOCS-4 est un des membres de la famille SOCS le moins bien caractérisé. Peu de choses sont connues sur sa régulation, son expression ou encore sa fonction.

Les protéines SOCS-4 et SOCS-5 seraient impliquées dans la régulation de la signalisation de l'EGF (Kario et al., 2005; Nicholson et al., 2005). Le domaine SH2 de la protéine SOCS-4 semble pouvoir interagir spécifiquement avec le résidu tyrosine phosphorylé Y1092 du domaine cytoplasmique du récepteur de l'EGF. La protéine SOCS-4 pourrait par la suite emmener le récepteur vers la dégradation par l'intermédiaire de son domaine SOCS-box (Bullock et al., 2007). Pour la protéine SOCS-5, l'interaction décrite par Nicholson n'est pas dépendante de la phosphorylation du récepteur et implique le domaine N-terminal de la protéine (Nicholson et al., 2005). Seki et ses collaborateurs ont d'ailleurs démontré que la protéine SOCS-5 interagirait aussi avec le récepteur IL-4R α via son domaine N-terminal (Seki et al., 2002). Leurs résultats suggèrent que la protéine SOCS-5 pourrait ainsi inhiber la différenciation des lymphocytes Th2 induite par l'IL-4.

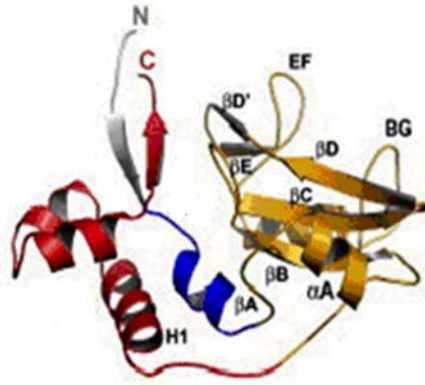


Figure 17 : Structure tridimensionnelle de la protéine SOCS-4
 En rouge, la SOCS-box, en bleu de domaine ESS et en jaune le domaine SH2.
 (Bullock et al., 2007)

B.3.4 Les protéines SOCS-6 et SOCS-7

Les protéines SOCS-6 et SOCS-7 sont exprimées de manière constitutive dans de nombreux tissus (Krebs et al., 2002; Martens et al., 2004). La protéine SOCS-7 régule négativement les signaux provenant de la PRL, de la GH et de la leptine. En interagissant directement avec les facteurs de transcription STAT-3 et STAT-5, la protéine SOCS-7 diminuerait leur phosphorylation et leur translocation nucléaire (Martens et al., 2005).

Des expériences de double hybride chez la levure et d'immunoprécipitation ont démontré une interaction entre le motif « proline riche » de la protéine SOCS-7 et la vinexine. Par ailleurs, des observations de microscopie confocale indiquent une colocalisation de la protéine SOCS-7 à la fois avec la vinexine et avec l'actine polymérisée (Martens et al., 2004). Les auteurs suggèrent donc une interaction entre la protéine SOCS-7 et le cytosquelette d'actine via la vinexine.

En fait, d'autres partenaires de la protéine SOCS-7 ont déjà été identifiés. C'est le cas des protéines Hck, Lck ou encore Nck-1 et Nck-2 (Martens et al., 2004; Matuoka et al., 1997). De manière intéressante, l'association de ces protéines avec le cytosquelette est largement documentée. Par exemple, dans le noyau, l'adaptateur protéique Nck-1 régule la réorganisation du cytosquelette d'actine. La protéine Nck-1 participe ainsi à des phénomènes cellulaires importants comme le maintien de la polarité, l'arrêt du cycle en cas de dommage de l'ADN et l'induction du facteur p53 (Buday et al., 2002). Récemment, Kremer et ses collaborateurs ont démontré que la protéine SOCS-7 était responsable de la translocation nucléaire de l'adaptateur Nck-1 (Kremer et al., 2007). Bien que la fonction de la protéine

SOCS-7 soit toujours en cours d'investigation, ces données suggèrent que cette protéine pourrait participer à la relocalisation de facteurs agissant directement sur le cytosquelette.

Les expressions des protéines SOCS-6 et SOCS-7 sont co-régulées en réponse à l'insuline. En retour, ces deux protéines seraient engagées dans des interactions avec le récepteur à l'insuline, la sous unité p85 de la kinase PI3K et les protéines IRS-2 et IRS-4 (Krebs et al., 2002; Mooney et al., 2001).

Les souris dont le gène *Socs-6* a été invalidé sont globalement saines. Elles présentent juste un léger retard de croissance (Krebs et al., 2002). Par contre, les souris *socs-7^{-/-}* meurent dans la période périnatale (Banks et al., 2005).

B.4 L'expression des protéines de la famille SOCS chez les autres espèces

La protéine SOCS-1 n'est pas exprimée chez les bactéries. Chez les eucaryotes, sa séquence protéique est fortement conservée chez les mammifères (homme, rat, souris, singe et poulet).

Récemment, une équipe coréenne a cloné une protéine homologue de la protéine SOCS-2 chez le mollusque *Haliotis discus discus* (De Zoysa and Lee, 2009). Cette protéine appelée AbSOCS-2 présente le domaine SH2 et le motif SOCS-box caractéristiques des protéines de la famille exprimées chez les vertébrés. L'expression de la protéine AbSOCS-2 semble ubiquitaire mais l'expression de l'ARNm peut être significativement induite par le LPS et certaines bactéries.

Chez la drosophile, la sur-activation de la protéine orthologue des kinases JAKs entraîne des désordres prolifératifs de type néoplasiques (Luo et al., 1997). On observe alors chez l'adulte, des malformations de la tête, des yeux mais aussi des veines des ailes et des ovaires (Bach et al., 2003).

Le génome *Drosophila Melanogaster* présenterait 3 gènes codants pour trois protéines SOCS différentes, SOCS36E, SOCS44A et SOCS16D. Une analyse comparative des séquences nucléotidiques indique que les gènes *Socs44A* et *Socs16D* codent pour des protéines similaires à SOCS-6 et SOCS-7. Alors que le gène *Socs36E*, code pour une protéine semblable à la protéine humaine SOCS-5. Par ailleurs, seul le gène *Socs44A* n'est pas une cible de la voie de signalisation JAK/STAT (Rawlings et al., 2004a).

Les protéines SOCS36E, SOCS44A et SOCS16D régulent négativement la voie JAK/STAT chez la drosophile. Leur action varie selon les organes et le stade de développement. Par

exemple, SOCS36E est fortement exprimée pendant l'embryogenèse (Callus and Mathey-Prevot, 2002). En plus de son rôle dans la régulation de la voie JAK/STAT, il a été montré que la protéine SOCS44A augmente l'activité de la cascade de signalisation EGFR/MAPK (Rawlings et al., 2004a). Inversement, la protéine SOCS36E inhiberait cette même voie *in-vivo* (Callus and Mathey-Prevot, 2002).

De manière intéressante, les protéines SOCS-1 et JAK2 ont des profils phylogénétiques comparables (**figure 18**). Ce phénomène traduit souvent une association fonctionnelle entre deux protéines. Cette observation laisse donc supposer que la régulation de la voie JAK/STAT par la protéine SOCS-1 pourrait bien être un mécanisme fondamental qui a été conservé au cours de l'évolution.

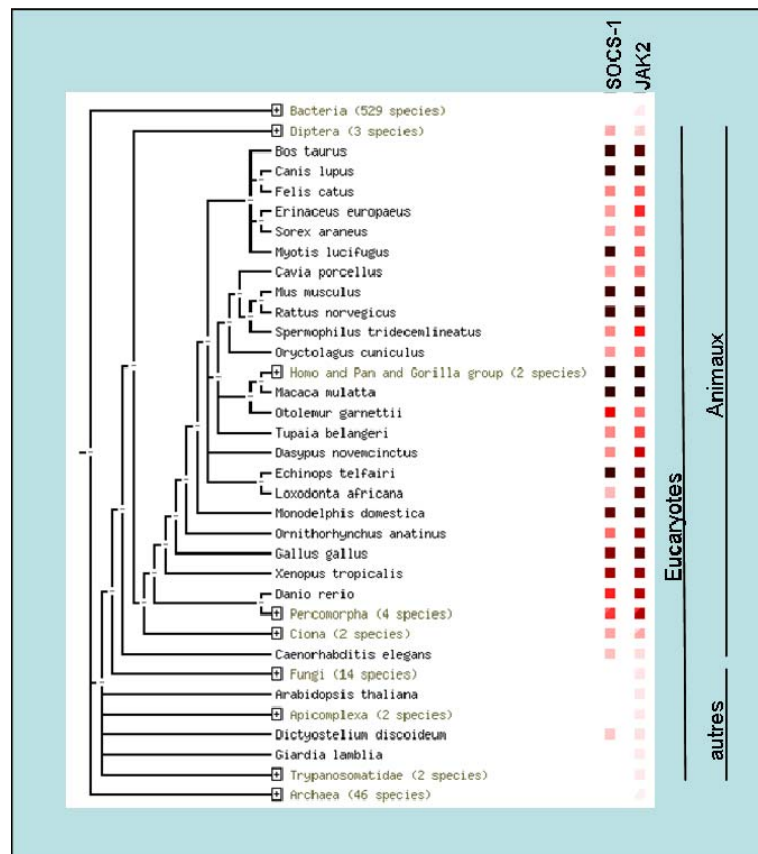


Figure 18: Arbre phylogénétique des protéines SOCS-1 et JAK-2

Arbre phylogénétique construit à partir de la fonction du serveur STRING.

A gauche, sont listées les espèces. La présence ou l'absence du gène dans un organisme donné est indiquée par une intensité de couleur. Plus la couleur est foncée, plus la séquence est conservée dans l'espèce considérée par rapport à la séquence de la protéine SOCS-1 humaine (le marron foncé correspond donc à 100% d'homologie)

Conclusion

La protéine SOCS-1 est, historiquement, un régulateur clé de la voie JAK/STAT. Mais ses nombreuses interactions, lui permettent aussi de réguler négativement l'activité de kinases oncogéniques et d'autres des voies de signalisation. En effet, grâce à son domaine SH2, la protéine SOCS-1 est capable de se lier spécifiquement à des protéines tyrosine phosphorylées (récepteurs ou intermédiaires de signalisation) et de bloquer des cascades de signalisation. D'un autre côté, le domaine SOCS-box permet à la protéine SOCS-1 de cibler certaines protéines phosphorylées (avec lesquelles elle interagit) au protéasome. Ces propriétés permettent au gène *Socs-1* d'agir en gène suppresseur de tumeurs et en régulateur de la réponse inflammatoire. D'autres fonctions de la protéine SOCS-1 sont en cours de caractérisation, notamment dans le développement des cellules du système immunitaire et dans le trafic intracellulaire. Ces travaux permettront peut-être d'identifier des nouvelles cibles de la protéine SOCS-1.

L'expression de la protéine SOCS-1 est soumise à un système de régulation élaboré qui permet de maîtriser l'action de la protéine dans le temps et de respecter une certaine spécificité tissulaire. La régulation transcriptionnelle des gènes de la famille *Socs* repose principalement sur l'activité des facteurs de transcription de la famille STAT. Mais elle semble aussi pouvoir impliquer d'autres facteurs. Par ailleurs, la méthylation aberrante de l'ADN génomique est à l'origine une inhibition de l'expression du gène *Socs-1*. Ce phénomène est observé dans de nombreuses tumeurs humaines.

Comparés aux protéines SOCS-3 et SOCS-1, les autres membres de la famille SOCS sont mal connus. Pourtant, chez la drosophile, des protéines comparables à SOCS-5, SOCS-6 et SOCS-7 ont été caractérisées. D'autre part, le niveau de conservation de la séquence de la protéine SOCS-1 entre les espèces suppose que cette protéine joue un rôle d'une importance telle, qu'elle a été conservée au cours de l'évolution.

C/ LE CANCER COLORECTAL

C.1 La paroi colorectale : structure et homéostasie

C.1.1 Structure de la paroi colorectale

De l'extérieur vers la lumière, la paroi colique est constituée de quatre couches concentriques caractéristiques du tube digestif : une séreuse, une musculeuse et une muqueuse séparées par une sous-muqueuse. La muqueuse comporte trois éléments : l'épithélium de surface (dont les cellules forment des cryptes, la lamina propia (un tissu conjonctif) et la muscularis mucosae (cellules musculaires lisses). C'est aux dépens de la muqueuse que se développent les carcinomes (**Figure 19**). Les tumeurs coliques se concentrent dans la région charnière séparant le colon du rectum. Ainsi, on parle donc, de façon générale, de carcinomes colorectaux.

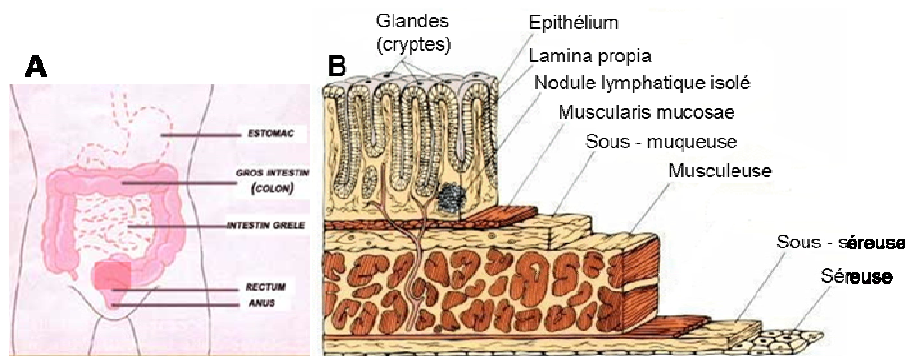


Figure 19 : Structure de la paroi colorectale

A : Le colon est la partie de l'intestin située entre l'intestin grêle et l'anus. La majeure partie des cancers touchant cet organe se concentrent dans le colorectum (en foncé).

B : La paroi colorectale est composée de quatre couches tissulaires concentriques aux fonctions spécifiques. En partant de la lumière, se trouve : la muqueuse (absorption intestinale), la sous muqueuse (drainage lymphatique), la musculeuse (tonus intestinal) et la séreuse (protection). La surface externe de la muqueuse intestinale est recouverte par un épithélium.

C.1.2 Homéostasie de l'épithélium intestinal

L'épithélium intestinal se renouvelle continuellement et est entièrement remplacé environ tous les 5 jours. Il est constitué de structures appelées cryptes de Lieberkuhn. Au fond de ces cryptes se trouvent des cellules souches responsables du renouvellement cellulaire. Ces

dernières donnent naissance à des progéniteurs indifférenciés qui prolifèrent rapidement. Au cours de leur migration vers la lumière de l'intestin, ceux-ci arrêtent leur prolifération et se différencient en types cellulaires fonctionnels, puis sont éliminés de la surface de l'épithélium par un processus apoptotique.

Différents mécanismes cellulaires et moléculaires sont responsables du maintien de l'homéostasie intestinale. Il a été démontré que la voie de signalisation Wnt/Wingless est active dans la zone proliférative de l'épithélium colique normal et inactive dans les cellules ayant migré au sommet des villosités (van de Wetering et al., 2002). Dans cette même étude, les auteurs se sont intéressés à plusieurs gènes cibles de la voie Wnt/Wingless, *p21^{CIP/WAF1}* et le couple *EphB/éphrineB*.

La protéine EphB est un récepteur à activité tyrosine kinase dont le ligand est l'éphrineB. Les récepteurs EphB régulent la morphologie et la migration cellulaire en remodelant le cytosquelette d'actine. Le plus souvent, l'interaction entre les récepteurs Eph et leurs ligands provoque une répulsion entre les cellules (Merlos-Suarez and Batlle, 2008). La voie Wnt/Wingless régule positivement l'expression du récepteur EphB. Inversement, l'expression du ligand Ephrine B est induite quand la voie de signalisation est au repos (Clarke, 2006). Ce système permet au récepteur EphB d'être exprimé exclusivement au niveau cellules multipotentes des cryptes. Le ligand éphrine B est quant à lui exprimé là où la voie Wnt n'est pas active, c'est-à-dire dans toutes les cellules sauf celles du fond de la crypte. Ce mécanisme d'expression différentielle permettrait à la voie Wnt/Wingless de réguler le positionnement des cellules le long des villosités en contrôlant l'expression des gènes codant pour le récepteur EphB et l'éphrineB (Batlle et al., 2002).

La protéine *p21^{CIP/WAF1}* participe activement à la régulation du cycle cellulaire. Lorsque la voie de signalisation Wnt/Wingless est active, le facteur c-Myc est exprimé et inhibe l'expression de *p21^{CIP/WAF1}*. Inversement, lorsque la voie Wnt est en position « off », la protéine *p21^{CIP/WAF1}* inhibe le cycle et induit la différenciation cellulaire (van de Wetering et al., 2002). En cas d'activation constitutive de la voie Wnt, les cellules continueraient donc à proliférer en dépit de leur localisation. Ainsi, le syndrome FAP (Familial Adenomatous Polyposis) se caractérise par l'apparition de centaines de polypes colorectaux qui sans traitement se transforment inévitablement en carcinomes. Les patients atteints de ce syndrome présentent une mutation germinale du gène *Apc* (Al-Sukhni et al., 2008). Parallèlement, dans 80% des cancers colorectaux d'origine sporadique, on observe qu'une mutation de la protéine APC est à l'origine d'une activation constitutive de la voie Wnt (Korinek et al., 1997).

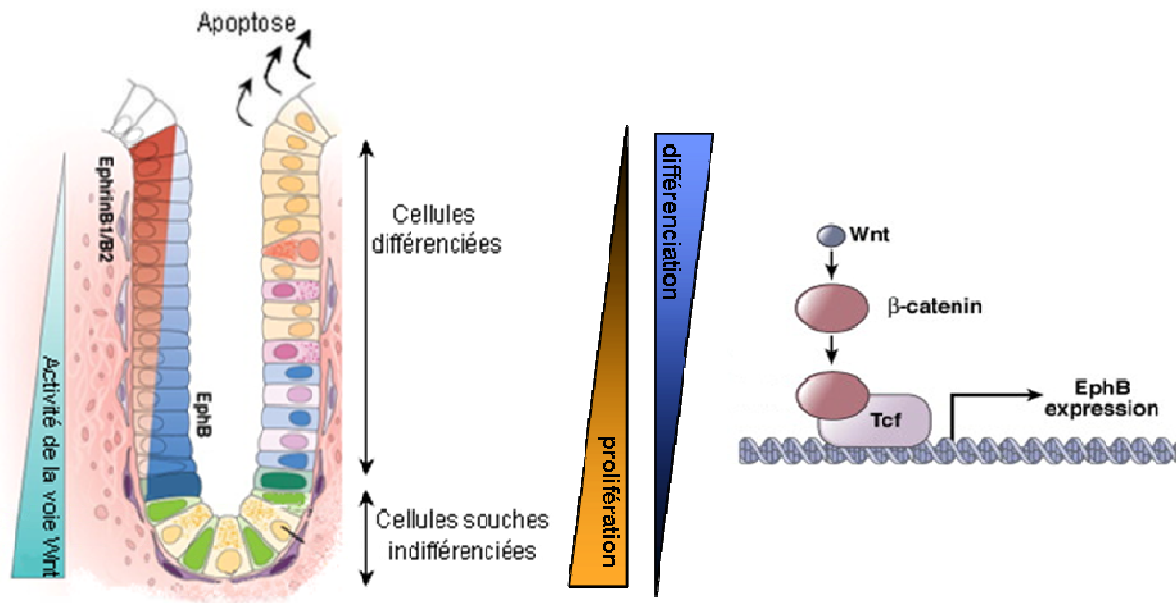


Figure 20 : Mécanismes de l'homéostasie intestinale

L'interaction entre le ligand EphrineB et son récepteur EphB régule la localisation et les capacités migratoires des cellules le long des villosités intestinales. Des gradients inverses d'expression d'EphrineB et d'EphB sont maintenus par une régulation spatiale de l'activité de la voie Wnt. En régulant l'expression de protéines agissant sur le cycle cellulaire, la voie Wnt régule aussi la prolifération des cellules souches intestinales situées au fond des cryptes. La dérégulation de la voie Wnt, entraîne la rupture de l'équilibre entre prolifération et différenciation et favorise l'apparition de tumeur.
(D'après Scoville et al. Gastroenterology 2008)

C.2 Cancérogénèse colique : Histologie et événements moléculaires

C.2.1 Les lésions précancéreuses du colon

- Les lésions hyperplasiques

Les cellules épithéliales qui délimitent la lumière interne de la paroi colique forment des cryptes. Une modification de la topologie de ces cryptes reflète une perturbation précoce de l'équilibre cellulaire. On parle alors de focus de cryptes aberrantes (FCA). C'est l'étape la plus précoce de la carcinogénèse colique. Lorsque ces lésions s'étendent, il se forme des polypes hyperplasiques. L'étude des altérations génétiques de ces lésions a révélé de fréquentes mutations du proto-oncogène *K-ras* et du gène suppresseur de tumeur *Apc* (East et al., 2008).

- Les lésions adénomateuses

Les adénomes sont des tumeurs épithéliales bénignes. En principe, elles se développent à partir des FCA présentant une dysplasie. Le concept actuel, quasi universellement accepté, indique que la majorité des cancers du côlon se développe à partir d'un adénome. En théorie, l'ablation de tous les adénomes éliminerait tous les carcinomes (Cappell, 2007).

- Les carcinomes

Les carcinomes sont des lésions de haut degré de dysplasie qui se développent à partir d'un adénome. Les caractéristiques d'un carcinome (niveau de différenciation cellulaire, instabilité génétique, une activité proliférative, perte d'expression de molécules adhésion intercellulaire (E-cadherine, CD44), expression de protéases de la matrice extracellulaire) permettent d'évaluer l'agressivité de la tumeur (Cappell, 2007; Jankowski et al., 1995).

- Les métastases

Les carcinomes invasifs évoluent inévitablement vers la formation de métastases. Pour des raisons en partie anatomiques, les carcinomes colorectaux métastasent le plus souvent dans le foie, les poumons et la région intra-abdominale (Bates and Mercurio, 2005). La formation de ces foyers tumoraux secondaires constitue la première cause de décès des patients atteints de cancers.

C.2.2 Les modèles de cancérogenèse colique

La tumorigenèse colique suit un processus multi-étapes. Parmi les différentes tentatives d'établir une logique pour la succession d'événements qui jalonnent le chemin de la cellule normale à la cellule néoplasique, éventuellement métastatique, le modèle de la cancérogenèse énoncé par Fearon et Vogelstein s'est longtemps distingué (Fearon and Vogelstein, 1990). Ce modèle établit une chronologie des altérations génétiques en les associant directement aux étapes de la cancérogenèse colique définies à partir de critères clinico-pathologiques. Il s'est avéré que ce modèle linéaire était en grande partie erroné. En fait, plusieurs voies peuvent mener aux étapes successives de la cancérogenèse colique : chaque voie aboutissant au même résultat (un cancer), en altérant un panel de gènes différent et spécifique (Calvert and Frucht, 2002).

- l'instabilité chromosomique

L'instabilité chromosomique est la voie de développement des cancers colorectaux (CCR) la plus fréquente (80 % des tumeurs sporadiques). Elle correspond au phénotype CIN (Chromosomal INstability), ou aux cancers LOH (Loss Of Heterozygosity). L'instabilité chromosomique entraîne des anomalies du nombre des chromosomes et des pertes d'allèles (Albertson et al., 2003). Dans ces tumeurs, 20 % des chromosomes en moyenne ont subi une délétion majeure. Les segments les plus fréquemment perdus dans les CCR sont : le bras long du chromosome 18 (18q), le bras long du chromosome 5 (5q, contenant le gène *Apc*) et le bras court du chromosome 17 (17p, contenant le gène *p53*). Parallèlement, les pertes alléliques sont fréquemment associées à des mutations des gènes *p53* et *Apc*, conduisant à une inactivation des deux copies de ces gènes.

Cette voie de cancérogenèse correspond à la voie impliquée dans la polypose adénomateuse familiale (FAP). Le ou les gènes responsables de cette instabilité chromosomique ne sont pas encore connus, mais il pourrait s'agir entre autres du gène *Apc*. La protéine APC jouant un rôle dans la ségrégation des chromosomes lors de la mitose (Kaplan et al., 2001).

- l'instabilité des microsatellites

Les erreurs de transcription survenant de façon habituelle dans chaque cellule sont normalement réparées efficacement par des systèmes de réparation de l'ADN. Des altérations de deux systèmes de réparation différents ont été observées dans la cancérogenèse colique. Dans ce type de tumeur, les mutations génétiques sont donc très fréquentes.

De nombreux gènes sont impliqués dans le système de réparation des mésappariements de bases (MMR). Ceux les plus touchés dans la cancérogenèse colique sont essentiellement MLH1 et MSH2 (et hMSH6). La déficience du système MMR est responsable de mutations fréquentes dans des séquences répétées de nucléotides, appelées microsatellites. Les mutations touchent donc des gènes cibles contenant des microsatellites, notamment le gène du récepteur de type II du TGF-bêta et le gène suppresseur de tumeur *Bax* (Soreide et al., 2006). Ce type de tumeurs correspond au syndrome HNPCC (Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer) et à 15 % des tumeurs sporadiques dont le phénotype est appelé MSI (Microsatellites Instability).

Le gène *MUTYH* (MutY Homologue ou MYH) fait partie du système de réparation par excision de bases (BER), un autre système de réparation de l'ADN. Des mutations du gène *MUTYH* ont été récemment observées dans un type de cancer héréditaire (MAP, polypose associée à MYH). Son rôle dans les CCR sporadiques reste encore à évaluer (Lipton et al., 2003).

- l'instabilité épigénétique

L'instabilité épigénétique concerne 20 à 30 % des tumeurs sporadiques. Cette voie de carcinogenèse repose sur l'inactivation de nombreux gènes suppresseurs de tumeur par hyperméthylation de leurs promoteurs. Le phénotype des tumeurs est alors appelé CIMP (CpG Island Methylator Phenotype). Parmi les gènes inactivés, on rencontre fréquemment MLH1 (gène du MMR), dont l'inactivation entraîne un phénotype MSI. : Les deux groupes MSI et CIMP peuvent donc se chevaucher. La découverte du phénotype CIMP dans le CCR est relativement récent et le ou les gènes responsables de ce phénotype ne sont pas encore connus (Frazier et al., 2003; Issa, 2000).

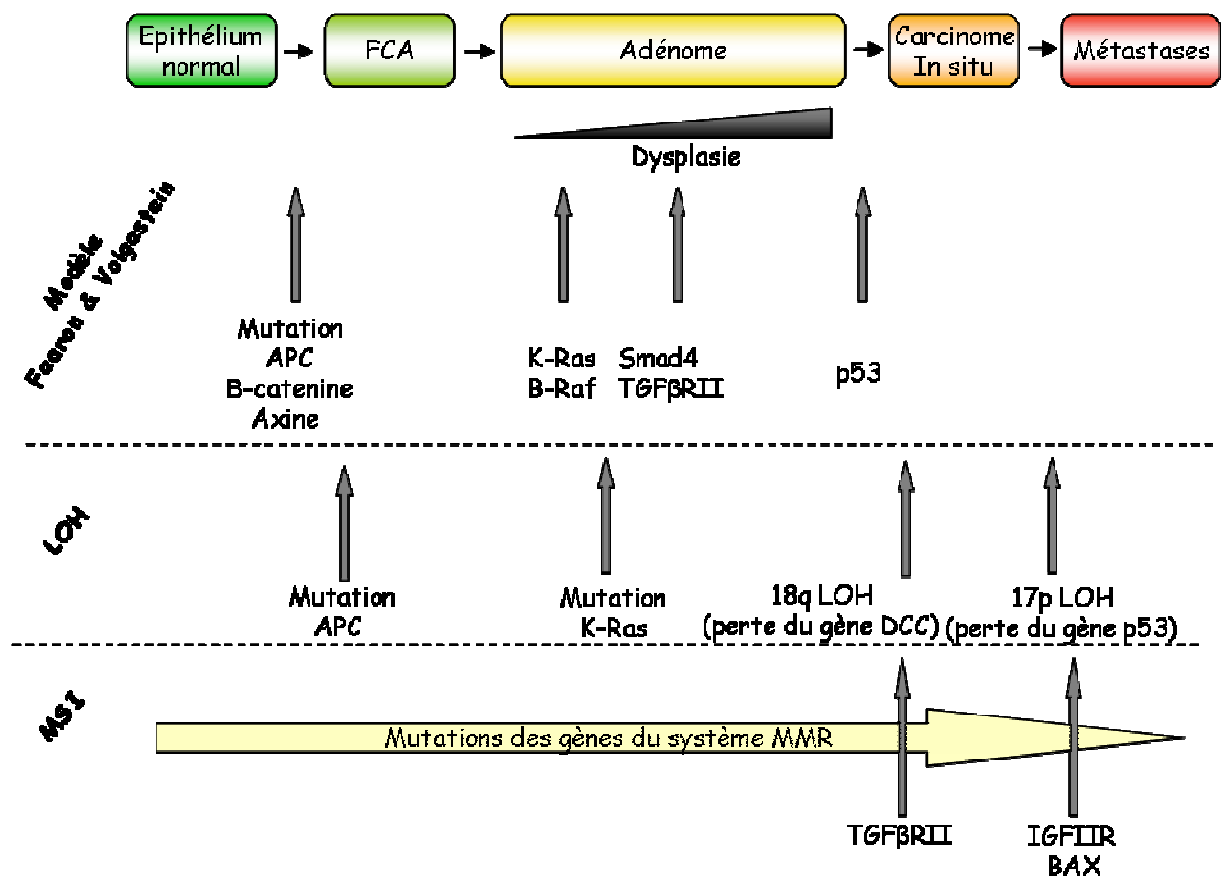


Figure 21 : Progression histologique et moléculaire des adénocarcinomes coliques

La progression tumorale colique nécessite l'altération séquentielle de plusieurs gènes. L'accumulation des ces altérations génétiques peut se faire par plusieurs voies. Les voies de cancérogénèse colique impliquant l'instabilité chromosomique (LOH) et l'instabilité microsatellites (MSI) sont les mieux décrites. La chronologie proposée par Fearon et Vogelstein est indiquée pour rappel.

C.2.3 Les principales voies de signalisation impliquées dans la cancérogenèse colorectale

Les différentes voies de cancérogenèse aboutissent inévitablement au même résultat, mais elles altèrent des panels de gènes différents. Pourtant ces gènes participent souvent aux mêmes voies de signalisation. Par exemple, dans les tumeurs LOH+ on observe plutôt des mutations de la protéine APC alors que dans les tumeurs MSI+ on rencontre plutôt des mutations de la β -caténine. Mais ces altérations aboutissent toutes deux à la dérégulation de la voie de signalisation Wnt/Wingless. La dérégulation d'au moins trois voies de signalisation semble ainsi être critique lors de la progression maligne colique : la voie Wnt/Wingless, la voie Ras/MAPK et la voie du TGF- β (Scoville et al., 2008).

- La voie Wnt/Wingless

L'activité physiologique de la voie de signalisation Wnt/Wingless régule la prolifération de l'épithélium intestinal au niveau des cryptes (Pinto et al., 2003; van de Wetering et al., 2002). En absence d'une protéine APC fonctionnelle, la β -caténine n'est pas dégradée. Elle s'accumule dans le cytoplasme avant de transloquer dans le noyau. La β -caténine active alors l'expression des gènes cibles de la voie Wnt en absence de ligand (Korinek et al., 1997) (figure 22).

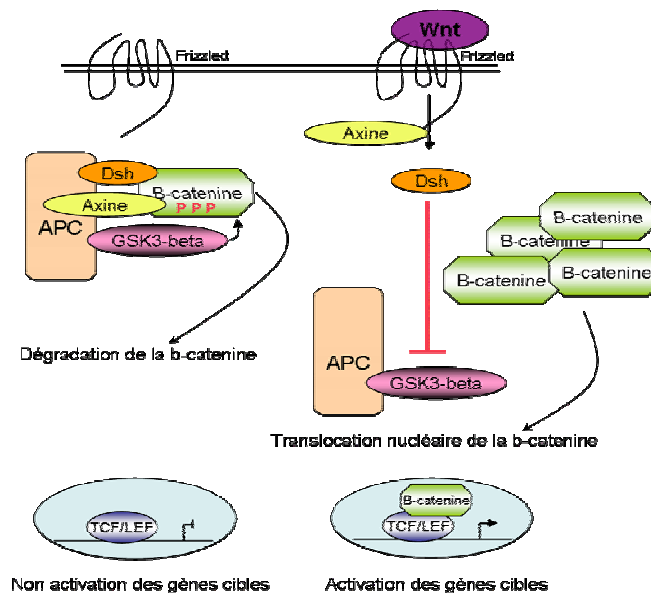


Figure 22 : La voie de signalisation Wnt

En position OFF (à gauche), la β -caténine fait partie d'un complexe protéique qui régule sa dégradation. En position ON (à droite), l'activation des récepteurs de la famille Frizzled par les ligands de la famille Wnt conduit à la phosphorylation de la protéine Dishelvelled (Dsh). La β -caténine est alors libérée du complexe. Non dégradée elle transloque dans le noyau où elle régule l'expression de gènes cible tels que *c-myc* et *cycline D1*, en s'associant aux facteurs de transcription TCF/LEF.

L'activation constitutive de la voie Wnt dans un contexte tumoral donne un avantage aux cellules cancéreuses quant à la prolifération cellulaire. Les cellules cancéreuses maintiendraient ainsi un phénotype « cellule-souche » leur permettant de proliférer sans limite (Pommier and Kohn, 2003). Ainsi, chez des souris adultes dont le gène *Apc* a été invalidé, on observe l'apparition de polypes hyperplasiques accompagnés de perturbations de la différenciation et de la migration des cellules épithéliales le long des cryptes intestinales (Andreu et al., 2005; Harada et al., 1999). A cause de la fréquence des mutations inactivatrices de la protéine APC dans les cancers colorectaux, ce phénomène a est longtemps été désigné comme l'unique événement initiateur de la cancérogenèse colorectale.

- Les voies Ras-MAPK

Des mutations activatrices des proto-oncogènes *K-Ras* et *B-Raf* sont communément observées dans les cancers colorectaux. L'activation constitutive de la voie ERK-MAPK qui en résulte favorise la prolifération et la survie des cellules tumorales (Haigis et al., 2008; Oikonomou and Pintzas, 2006). En utilisant un modèle de souris transgéniques exprimant un gène *K-Ras* muté dans l'ensemble des cellules de la muqueuse intestinale, l'équipe du Dr Louvard a pu montrer qu'au bout de quelques mois, 80% des animaux développent des cancers intestinaux, en absence d'altération de la protéine APC (Janssen et al., 2006). Dans le modèle de cancérogenèse colorectale proposé par les auteurs, la mutation de l'oncogène *K-Ras* entraînerait une activation constitutive des voies MAPK et aboutirait à une prolifération cellulaire anormale. Des travaux complémentaires indiquent qu'il existerait un lien entre la mutation du gène *K-Ras* et l'activation de la voie Wnt. Chez les souris transgéniques *K-Ras(V12G)/Apc(+/-1638N)* on observe une progression tumorale accélérée et une mortalité accrue en comparaison avec les animaux présentant des mutations simples *K-Ras(V12G)* ou *Apc(+/-1638N)* (Janssen et al., 2006). L'hypothèse avancée suggère une phosphorylation de la β -caténine par la protéine K-Ras. Le complexe E-cadherine/ β -caténine serait par conséquent déstabilisé et le pool de β -caténine cytoplasmique grossi. En absence d'une protéine APC fonctionnelle, cette augmentation de la quantité de β -caténine cytoplasmique se traduirait par une augmentation de l'expression des gènes cibles de la voie Wnt (Janssen et al., 2006).

- La voie du TGF- β

Le TGF- β est un facteur de croissance impliqué dans le contrôle de la division cellulaire, la différenciation et le contrôle de l'apoptose ... (Attisano and Wrana, 2002). Les protéines de la famille Smad sont les intermédiaires de signalisation recrutés en réponse à une stimulation par

TGF- β (Nawshad et al., 2005). Mais les facteurs Smad peuvent aussi être recrutés lors de l'activation des voies MAPK, PI3K ou Akt (Ahmed and Nawshad, 2007).

Sur les cellules épithéliales normales, le TGF- β exerce un effet antiprolifératif en régulant positivement l'expression des CKI (cycline kinase Inhibitors) (Ten Dijke et al., 2002). Cependant, des mutations inactivatrices des gènes codant pour les récepteurs au TGF- β et les facteurs Smad permettent souvent aux cellules cancéreuses de devenir résistantes à ces signaux (de Caestecker et al., 2000). Une autre fonction du TGF- β est de réguler l'expression des protéines de la MEC (Matrice Extra-Cellulaire) notamment de la fibronectine et des collagènes fibrillaires (Elliott and Blobel, 2005). Dans les stades tardifs du cancer (formation de métastases), en participant à la modulation de la composition de la MEC, le TGF- β peut être un facteur pro-oncogénique (Xu and Pasche, 2007).

L'altération de la voie du TGF- β serait ainsi impliquée dans la progression des adénomes puis dans l'invasion tumorale.

Conclusion

Les modèles de cancérogenèse colorectale proposent plusieurs voies d'accumulation d'erreurs génétiques (LOH+, MSI+, CIMP+) qui entraînent l'apparition de carcinomes à partir de lésions bénignes. Les altérations génétiques les plus fréquentes sont des mutations somatiques et des délétions chromosomiques. La voie Wnt/Wingless, les voies Ras-MAPK et la voie TGF- β /SMAD semblent les plus systématiquement touchées. Mais d'autres détériorations génétiques semblent participer spécifiquement à la progression tumorale colique. L'activité constitutive de la kinase Src tronquée augmente la tumorigénicité *in-vitro* et *in-vivo*. De manière intéressante, une étude rapporte que ce type de mutation est observée dans environ 12% des tumeurs colorectales métastatiques (Irby et al., 1999). La perte de l'expression du gène suppresseur de tumeur DCC (Deleted in Colorectal Carcinoma) qui code pour un récepteur membranaire de la netrine est associée à un mauvais pronostic clinique. Pourtant, peu de données sont disponibles au sujet de ses fonctions biologiques (Bernet and Fitamant, 2008). Bien que son rôle dans la régulation de l'apoptose aie été suggéré (Chen et al., 1999). Autrement, l'expression de plusieurs autres gènes est dérégulée dans les tumeurs colorectales alors qu'ils ne sont pas mutés. C'est le cas du gène codant pour la protéine cyclo-oxygénase (COX)-2 et le facteur de croissance IGF-II. Bien que ces événements semblent postérieurs aux altérations génétiques, ils pourraient avoir des rôles critiques.

Au final, la liste des gènes impliqués dans le développement du cancer colorectal reste sûrement à compléter et d'autres altérations génétiques sont certainement sont à caractériser.

C.3 Formation des métastases et modèle de l'EMT

C.3.1 Le processus métastatique

Le processus métastatique être défini comme « une dissémination de cellules néoplasiques dans un site secondaire (ou de plus grand ordre) non contigu et distant, au sein duquel ces cellules prolifèrent pour former un masse extravasculaire de cellules incomplètement différenciées » (Welch, 2006). La formation des métastases hématogènes est un processus complexe qui implique le franchissement de plusieurs étapes par les cellules tumorales.

i- L'invasion locale

L'invasion locale est la première étape du processus métastatique. Elle correspond à trois principaux phénomènes : la dégradation du stroma péri-tumoral, la migration cellulaire et l'intravasation.

Une protéolyse des protéines de la matrice extracellulaire (MEC) par les protéases de la famille des MMPs et potentiellement des TIMPs est à l'origine d'une dégradation du stroma péri-tumoral. Dans les modèles animaux, une augmentation de l'expression et ou de l'activité des MMPs est généralement associée à une invasion tumorale locale accrue et un pronostic clinique défavorable (Egeblad and Werb, 2002). La dégradation de la MEC permet aux cellules tumorales de franchir la membrane basale et de migrer vers le stroma. Ce dernier va alors être « activé » (par les cellules tumorales). En retour, cette activation concourt à la croissance et l'invasion tumorale. Par exemple, la plupart des enzymes protéolytiques de la MEC sont sécrétées sous forme de pro-enzymes inactives par les cellules du stroma et sont activées par les protéases tumorales. La protéolyse de la MEC permet aussi la libération de nombreuses cytokines ou facteurs de croissance (TGF- β , bFGF, VEGF, PDGF, IGF1...). Libérés de la MEC, ces facteurs jouent un rôle trophique et chémo-attractant pour les cellules tumorales, souvent via l'établissement de boucles de régulations paracrines (Wyckoff et al., 2004)

Pour des cellules tumorales initialement de phénotype épithélial, la migration nécessite une perte de la cohésion cellulaire au niveau de la tumeur initiale, avec individualisation des cellules tumorales. Le processus s'accompagne alors de l'acquisition d'un phénotype migratoire avec perte de la polarisation baso-latérale au profit d'une polarisation de type front de migration/arrière. Les cellules cancéreuses peuvent théoriquement migrer de différentes manières. La migration collective en feuillets concerne les cellules carcinomateuses ayant gardé leur jonctions intercellulaires. Il s'agit du type de migration utilisé par les cellules

épithéliales non transformées lors des processus de cicatrisation (Friedl and Gilmour, 2009). Dès lors que les fonctions des cadhérines sont diminuées ou perdues, les cellules tumorales peuvent se déplacer de manière isolée. Elles peuvent alors réaliser une migration mésenchymateuse et/ou une migration amoéboïde (Friedl and Wolf, 2003). La migration mésenchymateuse se déroule par la répétition d'étapes d'élongation/rétraction cellulaire, auxquelles s'ajoute la dégradation de la MEC. Cette dégradation localisée au pôle antérieur de la cellule est associée à la concentration des protéases au niveau des pseudopodes ou des lamellipodes ancrés dans la matrice par de nombreux contacts focaux. Au contraire, lors de la migration amoéboïde les interactions cellule-matrice apparaissent limitées. Cette migration se caractérise par le fait que la cellule se déforme pour se « glisser » entre les fibres de collagène de la matrice extracellulaire, sans les dégrader. Ce type de migration est typiquement utilisé par les lymphocytes et les polynucléaires neutrophiles, lors de leur extravasation. L'utilisation de ce type de migration par les cellules tumorales n'a été démontré qu'*in vitro*. D'autre part, dans des conditions non physiologiques (présence d'inhibiteur de protéases), de nombreuses lignées cellulaires utilisant la migration mésenchymateuse peuvent migrer de façon amoéboïde (Wolf et al., 2007).

ii- Intravasation et circulation des cellules tumorales

Le terme intravasation désigne le passage des cellules tumorales dans la lumière des vaisseaux sanguins à travers la paroi capillaire. Les mécanismes de cette translocation sont mal connus, d'autant plus que les vaisseaux sanguins tumoraux présentent des anomalies structurales importantes. Le passage dans la circulation sanguine place les cellules tumorales circulantes en contact avec les éléments figurés du sang. Des interactions indirectes entre les plaquettes activées et les événements thrombotiques sont associées à la progression métastatique. Les cellules tumorales circulantes peuvent former des micro-thrombi en « s'enveloppant » des plaquettes activées, grâce aux P et L sélectines plaquettaires qui sont capables de fixer les mucines membranaires tumorales. L'inhibition pharmacologique (héparines...) de la formation de ces micro-thrombi diminuerait l'incidence des métastases dans les modèles précliniques (Borsig et al., 2002). Parallèlement, les plaquettes activées relâchent des facteurs tels que l'acide lysophosphatidique (LPA) ou la thrombine, qui favorisent la croissance et la dissémination tumorale (Nierodzik and Karpatkin, 2006).

L'anoïkis est le phénomène normal d'apoptose qui survient à l'occasion d'une perte de contact « extérieur », que cela soit avec un support solide (matrice extracellulaire...) ou avec d'autres cellules. Ce phénomène de mort cellulaire est initié par les intégrines, ces dernières

jouant le rôle de « récepteurs » pour les éléments de la matrice extracellulaire. Un signal est ensuite relayé par des voies de signalisation intracellulaires multiples (PI3K, MAPK, JNK, Src...). L'activation finale du processus de mort cellulaire emprunte les voies intrinsèques (perméabilisation de la membrane mitochondriale avec activation des caspases par les facteurs relâchés dans le cytosol) et extrinsèques (signal intracellulaire initié par les récepteurs à Death Domain, formation de DISC et activation de la caspase 8) de l'apoptose (Hynes, 2002). La résistance à l'anoïkis contribue grandement à la dissémination des cellules tumorales dans l'organisme (Shanmugathan and Jothy, 2000). Pourtant, les mécanismes moléculaires de cette résistance sont relativement peu décrits.

Il a aussi été rapporté que la plupart des cellules tumorales se fragmentent au contact de la pression intraluminale des micro-vaisseaux. De manière intéressante, seules les lignées cellulaires sélectionnées sur leur potentiel métastatique sont capables de survivre dans la circulation sanguine (Wyckoff et al., 2000). A l'heure actuelle, aucun régulateur moléculaire spécifique de cette résistance n'a été décrit.

iii- Arrêt des cellules tumorales, extravasation et invasion du site secondaire

Dans un premier temps, l'arrêt des cellules tumorales circulantes peut avoir lieu de manière passive lors du passage dans un vaisseau capillaire étroit, généralement dans un organe « filtre » (foie, poumons). Cet arrêt mécanique repose sur la différence importante de taille entre les éléments figurés du sang et les cellules carcinomateuses, généralement plus volumineuses, et a été rapporté par plusieurs expériences de vidéomicroscopie (Ito et al., 2001). Peu de données sont actuellement disponibles sur les mécanismes de reconnaissance spécifique de l'endothélium par les cellules tumorales circulantes lorsqu'elles ne sont pas arrêtées de manière passive. Les mécanismes d'arrêt cellulaire proposés ont été envisagés par analogie avec les processus de reconnaissance endothéliale des leucocytes sanguins au cours de la réponse inflammatoire. Ainsi, la reconnaissance et l'adhérence aux cellules endothéliales pourrait être assurée par certaines sélectines. La E-sélectine (exprimée par certaines cellules hépatiques) est capable de lier les cellules d'adénocarcinomes coliques et la suppression de son expression inhibe la formation de métastases dans ce modèle tumoral (Gout et al., 2008). Le débat reste ouvert sur l'importance respective des embolus intra-vasculaires et des cellules isolées extravasées dans la formation des métastases. Au niveau moléculaire, il est probable que le franchissement de cette étape repose sur les déterminants moléculaires déjà utilisés par les cellules tumorales lors de l'invasion du stroma péri-tumoral: protéases de la matrice, kinases intracellulaires (Earley and Plopper, 2008).

Un aspect spécifique de la croissance tumorale secondaire réside dans la nature du microenvironnement des cellules tumorales disséminées. Les propriétés de renouvellement intrinsèques du tissu-hôte sont susceptibles d'être mises à profit par les cellules tumorales. Ce phénomène est particulièrement bien décrit dans les métastases osseuses, autour desquelles les ostéoclastes sont stimulés par les cellules tumorales (Bussard et al., 2008). Dans le modèle de cancer de la prostate, cette stimulation passe par diverses molécules sécrétées par les cellules tumorales (PTHrP, IL-1, IL-8, RANK-ligand soluble, TNF- α , prostaglandines...).

La théorie « seed and soil » édicte que les cellules tumorales (seed) ne forment une métastase que dans un tissu qui leur est favorable (soil). Mais la connaissance des bases moléculaires de l'implantation spécifique des cellules métastatiques a particulièrement fait progresser cette idée. La théorie de l'adressage métastatique suggère que le profil génétique de la tumeur primaire est à l'origine d'une localisation sélective des métastases au sein de l'organisme de l'hôte. Par de nombreuses approches d'identification de gènes-candidats (PCR, puces à ADN, ARN...) plusieurs profils d'expression ont été plus ou moins associés à l'apparition de métastases. Par exemple, Dans le cancer du sein, l'expression du récepteur de chémokine CXCR4 a été associée à l'apparition de métastases hépatiques (Andre et al., 2006). Dans un modèle *in-vivo*, une équipe new-yorkaise a défini 102 gènes dont la variation était associée à la formation de métastases osseuses (Kang et al., 2003). De manière intéressante, parmi les gènes dont l'expression variait le plus, CXCR4 a été retrouvé.

Le VEGF synthétisé par les cellules tumorales agit sur le développement de la néo-vascularisation en activant les cellules endothéliales matures (VEGFR1+) déjà présentes dans la paroi vasculaire et en recrutant localement des cellules hématopoïétiques progénitrices d'origine médullaire VEGFR2+ (Grunewald et al., 2006). En réponse à la stimulation endocrine (cytokines...) générée par l'existence de la tumeur primitive, des cellules hématopoïétiques médullaires VEGFR1+ seraient capables de circuler dans le sang et d'envahir les stromas périvasculaires. Ces derniers sont alors localement « activés » (comme précédemment pour le stroma péri-tumoral au cours des processus d'invasion tissulaire). L'action d'intégrines et de cytokines comme SDF1/CXCL12 serait alors responsable du recrutement localement des cellules tumorales circulantes. Les cellules hématopoïétiques médullaires VEGFR2+ formeraient ainsi une « niche » pré-métastatique favorisant l'implantation des cellules tumorales circulantes (Kaplan et al., 2006). Le recrutement des cellules médullaires hématopoïétiques VEGFR2+ ferait suite à l'arrivée des cellules tumorales

circulantes, et contribuerait à l'établissement d'une microvascularisation de la future lésion secondaire.

iv- Croissance secondaire des cellules tumorales disséminées

Plusieurs modèles cliniques et expérimentaux ont progressivement introduit l'idée de l'existence d'une « dormance » des cellules tumorales disséminées au sein des tissus hôtes.

La plupart de ces travaux ont confirmé que la régulation de la croissance métastatique était assurée par des facteurs environnementaux agissant sur la prolifération et l'apoptose. La régulation de la dormance, et le déclenchement de la croissance secondaire (ou « colonisation » du site métastatique) serait ainsi l'ultime étape du processus métastatique (Vincent-Salomon et al., 2008). Trois principaux mécanismes sont actuellement proposés pour expliquer l'existence d'une « pause » au cours de la prolifération tumorale: une interaction avec le système immunitaire, une réversion du switch angiogénique et un effet inhibiteur du nouvel microenvironnement tumoral (Aguirre-Ghiso, 2007).

A l'heure actuelle, les mécanismes régulateurs de la dormance restant donc très mal caractérisés et aucun marqueur ne permet de distinguer, parmi les cellules micro-métastatiques, celles qui proliféreront de celles qui resteront dormantes (Vincent-Salomon et al., 2008) .

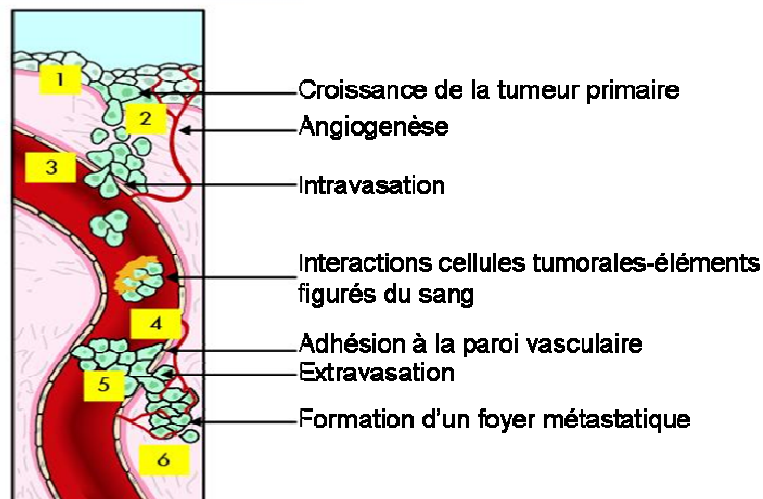


Figure 23 : Le processus métastatique

La formation des métastases requiert le franchissement de plusieurs étapes par les cellules tumorales. (D'après Fribourg 2006)

C.3.2 Origine des métastases

Plusieurs théories sont actuellement proposées par différents groupes pour expliquer l'origine du processus métastatique.

C.3.2.1 La théorie clonale

Le paradigme de la sélection clonale fait reposer l'apparition de métastases sur la présence, au sein de la population tumorale primitive, d'au moins une sous-population possédant tous les déterminants génétiques et phénotypiques nécessaires au processus métastatique (Fidler, 2003). Ce switch métastatique serait ainsi un événement rare dont la probabilité de survenue dans une tumeur dépend directement du nombre de cellules tumorales, et donc de la taille de la tumeur. Dans ce modèle de switch, plusieurs gènes peuvent être impliqués. Des gènes maîtres (« master genes ») seraient des facteurs de transcription ou de signalisation, et seraient les initiateurs de la dérégulation de l'expression des gènes secondaires, effecteurs. Ces derniers seraient l'ensemble des protéases, molécules d'adhésion, (...), nécessaires au franchissement successif des étapes du processus métastatique.

Mais ce modèle n'explique pas toutes les observations faites en clinique. Il a par exemple été démontré que des signatures moléculaires pouvaient être conservées entre tumeurs primitives et métastases (Weigelt et al., 2005). Par conséquent, des modèles alternatifs plus ou moins proches de celui de la sélection clonale ont été développés. Par exemple, le modèle de « l'évolution parallèle » a été construit à partir d'une analyse génétique des cellules tumorales disséminées. D'après cette hypothèse, la dissémination est un événement précoce de l'oncogenèse. Elle implique que les cellules tumorales disséminées doivent accumuler des changements génétiques ultérieurs afin de pouvoir former des métastases. Par ailleurs, ces changements génétiques seraient indépendants de ceux survenant dans les cellules de la tumeur primaire (Gray, 2003). Au final, d'importants débats tendent régulièrement à faire coïncider tous ces modèles.

Conférant potentiellement à une cellule tumorale une capacité migratoire accrue, l'EMT semble être un des mécanismes le plus plausible d'application de la théorie du switch métastatique. Actuellement, c'est la théorie la plus largement admise.

C.3.2.2 Le modèle de la transition épithélio-mésenchymateuse

i) Cellules épithéliales et mésenchymateuses

Les cellules épithéliales et mésenchymateuses diffèrent par de nombreuses caractéristiques fonctionnelles et phénotypiques. Les cellules épithéliales s'associent les une aux autres pour former des structures cellulaires en monocouche grâce à des structures membranaires spécialisées : jonctions serrées, jonctions adhérentes, desmosomes et jonctions communicantes. Les cellules épithéliales présentent par ailleurs une polarisation cellulaire apico-basolatérale marquée par une localisation sélective des protéines d'adhésion (cadhérines, intégrines), par la présence des jonctions intercellulaires sur la membrane latérale, par l'organisation du cytosquelette d'actine et par la présence d'une membrane basale au contact du pôle basal des cellules. Les cellules épithéliales peuvent migrer au sein d'un même épithélium, mais ne peuvent normalement pas s'en détacher (Thiery and Sleeman, 2006).

Les cellules mésenchymateuses ne présentent pas cette polarisation cellulaire, ne forment des adhésions intercellulaires qu'au niveau de points focaux, et ne sont pas associées à une membrane basale. En culture, elles présentent un phénotype fibroblastoïde et ne forment pas d'amas cellulaires, à l'inverse des cellules épithéliales. Les capacités migratoires de ces cellules sont souvent évidentes *in-vitro*, sans que cela soit systématiquement observé *in-vivo* (Thiery and Sleeman, 2006).

ii) Définition de l'EMT

La transition épithélio-mésenchymateuse est définie comme le processus au cours duquel une cellule épithéliale (1) acquiert un phénotype invasif, fibroblastoïde ; (2) diminue l'expression de protéines spécifiquement épithéliales (par exemple les protéines des jonctions serrées et des jonctions adhérentes) alors que des protéines spécifiquement mésenchymateuses sont exprimées (vimentine, N-cadhérine...) (3) dégrade et migre à travers la MEC (Thiery and Sleeman, 2006) (Guarino, 2007; Lee et al., 2006b). L'EMT est un processus cellulaire intervenant dans plusieurs phases du développement embryonnaire. De part les propriétés migratoires des cellules mésenchymateuses, l'EMT est largement présentée comme pouvant être responsable de l'acquisition du potentiel métastatique par les cellules tumorales épithéliales. En effet, il a été rapporté dans de nombreux modèles que la progression tumorale vers des stades invasifs et métastatiques s'associe à une dédifférenciation cellulaire, avec altération de la polarisation et acquisition d'un morphotype fibroblastoïde (Thiery, 2002).

iii) Régulation de l'EMT

Il semble aujourd'hui que de nombreuses modifications cellulaires aient été abusivement rapportées dans la littérature sous le nom d'EMT. L'analyse des données publiées en est d'ailleurs considérablement complexifiée (Klymkowsky and Savagner, 2009; Polyak and Weinberg, 2009).

Des modèles *in-vivo* et *in-vitro* ont permis de caractériser cinq grandes voies capables de provoquer l'EMT ou des phénotypes associés. Les récepteurs à activité tyrosine kinase (EGFR, HGFR, récepteur à l'insuline...), les intégrines, le facteur de transcription NF-kappaB, la voie Wnt et les voies de signalisation activées par le TGF- β (Klymkowsky and Savagner, 2009). Les facteurs de transcriptions de la famille Snail et Twist sont associés à la répression de l'expression du gène *Cdh1* (codant pour la E-cadherine). Ces facteurs semblent impliqués dans la plupart des EMTs physiologiques. Par ailleurs, lorsqu'ils sont surexprimés dans des lignées cellulaires épithéliales, ils provoquent une EMT (Peinado et al., 2007; Thiery and Sleeman, 2006).

De plus en plus de travaux indiquent que l'EMT est un état cellulaire transitoire (**figure 24**). Plusieurs études rapportent des co-expressions de marqueurs épithéliaux et mésenchymateux dans les cellules métastatiques et une réexpression de la E-cadhérine dans ces cellules (Brabletz T, PNAS 2001) (Oft M, Nat Cell Biol 2002). La MET (Transition Mésenchymato-Epithéliale), est le processus inverse de l'EMT. Elle permet à une cellule ayant subi une EMT de « retrouver » un phénotype épithélial et est caractérisée par la réexpression de la E-cadherine. La MET pourrait être le mécanisme qui permet aux cellules métastatiques de s'établir au niveau d'un nouveau foyer (Brabletz et al., 2005).

In-vivo, les processus d'EMT et de MET sont fortement régulés par les changements du microenvironnement cellulaire (variation de la quantité de TGF- β et d'autres cytokines). Ces ainsi que les cellules micro-métastatiques seraient appelées à se redifférencier en cellules épithéliales au niveau du site métastatique.

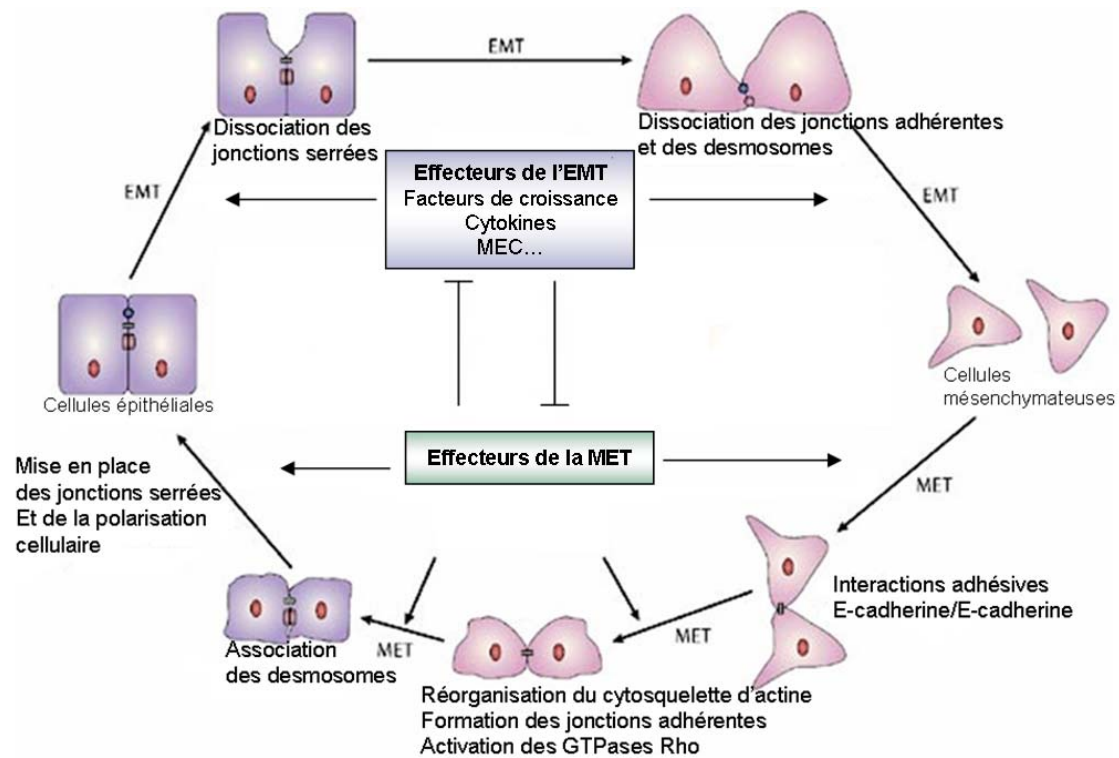


Figure 24 : Modèle dynamique de l'EMT

Il existe une tendance à considérer que l'EMT ne correspond pas à un changement de lignage complet, et que cette transformation est transitoire. L'EMT et son processus inverse, la MET se composent de plusieurs étapes. La régulation des jonctions serrées et des jonctions adhérentes sont des étapes clefs. (D'après (Thiery, 2002))

iv) Cellules souches cancéreuses et EMT

Il avait déjà été observé que des cellules tumorales pouvaient avoir des caractéristiques normalement propres aux cellules souches. La sialoglycoprotéine CD24 et le récepteur à l'acide hyaluronique CD44, sont des protéines membranaires classiquement utilisées comme des marqueurs de la différenciation cellulaire. En 2003 l'équipe de Clarke a isolé une sous-population cellulaire tumorale $CD44^{high}/CD24^{low}$ désignées comme « cellules souches cancéreuses » (CSC pour cancer Stem Cells) (Al-Hajj et al., 2003) . Ce résultat a été suivi par de nombreuses études similaires dans des tumeurs solides (Visvader and Lindeman, 2008). Des cellules positives pour différents marqueurs de CSC (notamment CD133) ont été observées au niveau du front invasif de tumeurs du sein, du colon et du pancréas. Les CSCs partagent d'importantes propriétés avec les cellules souches des tissus normaux. Bien que ce soit de façon aberrante, ces cellules sont capables de s'auto-renouveler et de se différencier. Une étude récente rapporte qu'il pourrait exister un lien direct entre EMT et l'acquisition d'un phénotype de type « cellule souche ». Mani et ses collaborateurs ont démontré que le phénotype de surface $CD44^{high}/CD24^{low}$ associé aux cellules souches pouvait être induit *in-*

in vitro par une EMT. En exposant des cellules épithéliales mammaires normales au TGF- β pendant 12 jours ou en surexprimant les facteurs de transcription Snail ou Twist, les expérimentateurs ont induit le phénotype CD44^{high}/CD24^{low} (Mani et al., 2008). Les cellules obtenues présentent une morphologie mésenchymateuse et les mêmes propriétés que des cellules souches (isolées du tissu mammaire normal) lors de tests *in-vitro*. Ces résultats créent un lien direct entre le phénomène d'EMT et les CSCs. Les CSCs ne seraient donc pas des cellules qui auraient pu être présentes auparavant mais plutôt des cellules tumorales qui auraient acquis de façon transitoire des propriétés de cellules souches suite à une EMT (Polyak and Weinberg, 2009). Il est ainsi envisagé par certains que l'EMT subie par des cellules tumorales donne naissance à des précurseurs métastatiques voire à des CSCs métastatiques (mCSCs) (Visvader and Lindeman, 2008).

C.4. Les mécanismes d'inhibition de l'expression de la E-cadherine dans les cancers

Avant de pouvoir former des métastases, les cellules cancéreuses qui quittent le foyer tumoral initial doivent franchir des étapes successives. Ces étapes sont autant d'obstacles que seul un petit nombre de cellules cancéreuses réussiront à franchir. Il a été estimé qu'une cellule tumorale (injectée en intraveineuse) a environ une 1 chance sur 100 000 ou 1 000 000 de former une métastase. Dans les tumeurs épithéliales, l'EMT est considérée comme l'évènement clef du processus métastatique. Cette transition cellulaire implique une inhibition de l'adhésion intercellulaire et l'acquisition de propriétés migratoires et invasives.

Les signaux extracellulaires activateurs du programme d'EMT sont relayés par des réseaux complexes de signalisation intracellulaire. Ils aboutissent pour la plupart à la perte de la fonction ou d'expression de la E-cadherine.

La E-cadherine est une protéine de 120 kDa codée par le gène *cdh1* (van Roy and Berx, 2008). Elle est normalement exclusivement exprimée au niveau des épithéliums. De très nombreuses études *in-vitro* et *in-vivo* établissent que *cdh1* est un gène suppresseur de tumeur (Thiery, 2002). La perte de l'expression de la E-cadherine la membrane est le point de départ de l'EMT. D'ailleurs, les voies d'activation oncogéniques de l'EMT convergent souvent sur une inhibition de l'expression de la E-cadherine. Dans les tumeurs, ce phénomène provoque une rapide progression de l'adénome bénin à l'adénome invasif puis au carcinome métastatique (Birchmeier and Behrens, 1994; Guilford, 1999).

C.4.1 Mutations génétiques et méthylation de l'ADN

Des mutations germinales du gène *Cdh1* sont à l'origine de cancers gastriques diffus et prédisposent aux carcinomes lobulaires du sein (Dunbier and Guilford, 2001; Schrader et al., 2008). Parallèlement, des mutations somatiques ont aussi été rapportées dans ces types de cancers (Berx et al., 1996). Ces altérations génétiques sont parfois associées à des mutations inactivatrices de gènes codant pour d'autres protéines du complexe de la E-cadherine (β -catenine, α -catenine) (Berx et al., 1998b). Néanmoins, en règle générale, les altérations du gène *cdh1* dans les carcinomes sont rares (Berx et al., 1998a).

La méthylation du promoteur du gène *Cdh1* pourrait intervenir en supplément d'une altération génétique ou d'une inhibition transcriptionnelle (Cheng et al., 2001; Grady et al., 2000). Des études ont démontré une méthylation aberrante du gène *Cdh1* dans des tumeurs de la prostate et du sein (Strathdee, 2002). Par ailleurs, des travaux effectués sur des cellules tumorales coliques indiquent que d'autres mécanismes de régulation épigénétiques (tel que la déacétylation des histones) pourraient aussi participer à l'inhibition de l'expression de la E-cadherine (Koizume et al., 2002).

C.4.2 Régulation transcriptionnelle et MicroRNAs

L'inhibition transcriptionnelle est un des mécanismes de régulation de la E-cadhérine le plus décrit dans les tumeurs. Chez l'Homme, la région promotrice proximale de *cdh1* contient plusieurs motifs de régulation : une boîte CAAT, une région riche en GC et trois séquences palindromiques appelées E-box. (Behrens et al., 1991) (**Figure 25**). La boîte CAAT et la région riche en GC sont nécessaires à l'expression basale du gène *Cdh1*. Elles sont respectivement régulées par des « CAAT binding proteins » et les facteurs de transcription AP2 et Sp1 (Faraldo et al., 1997).

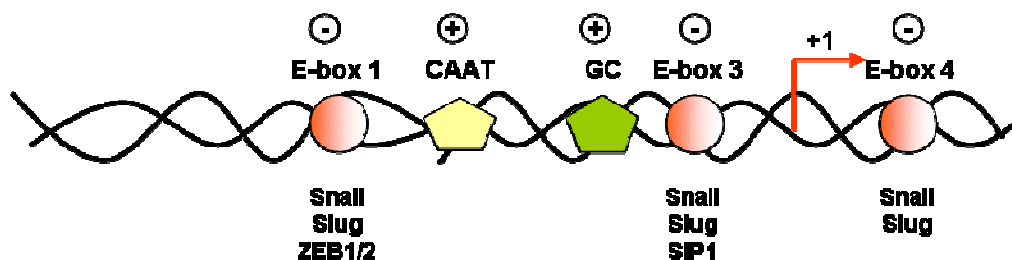


Figure 25 : Région promotrice proximale du gène *cdh1* et ses éléments de contrôle
Les E-box sont contrôlées par les répresseurs transcriptionnels (Snail, Slug et SIP1) alors que la boîte CAAT et la région GC sont régulées par des activateurs de la transcription.

Les E-box sont responsables d'une inhibition de l'expression du gène *Cdh1*. Ces régions sont régulées par les répresseurs Snail, Slug et SIP1. Lorsqu'ils sont fixés sur le promoteur, ces répresseurs surpassent l'action des régulateurs positifs (Batlle et al., 2000). Dans les carcinomes humains et murins, on observe souvent une surexpression d'au moins un de ces répresseurs. *In-vitro*, il a été montré que les expressions des facteurs Snail et Slug sont inversement corrélées à celle de la E-cadherine (Cano et al., 2000). Dans les cellules de type épithélial, la surexpression de ces répresseurs entraîne la transition épithélio-mésenchymateuse (Peinado et al., 2007). D'autres protéines (ZEB1, TWIST1, FOXC1, FOXC2...) sont capables de se fixer sur les E-box et sont aussi responsables d'une répression transcriptionnelle de *Cdh1*. Ces protéines sont aussi impliquées dans l'EMT durant la morphogénèse et la cancérogénèse (Moreno-Bueno et al., 2008).

Les microRNAs (miRNAs) sont des simples d'ARN d'environ 25 paires de bases. Après leur synthèse, les miRNA sont incorporés dans des complexes appelés « miRNA-induced silencing complexes » (miRISCs). Un miRNA donné peut se fixer à plusieurs ARNm cibles et induire soit leur destruction, soit l'inhibition de leur traduction (Perron and Provost, 2009). Des études récentes ont démontrées l'implication des familles de miRNA, miR-200 et miR-205 dans l'activation de l'EMT (Gregory et al., 2008; Park et al., 2008b). En fait, les répresseurs transcriptionnels ZEB1 et ZEB2 sont les cibles de ces miRNAs. Dans les cancers, l'inhibition de l'expression des miRNAs, miR-200 et miR-205 provoque une inhibition de l'expression de la E-cadherine en favorisant celle des facteurs ZEB1 et ZEB2 (Polyak and Weinberg, 2009).

C.4.3 Régulations post-traductionnelles

L'inhibition transcriptionnelle de l'expression du gène *cdh1* n'est pas toujours suffisante pour une extinction totale de l'expression de la protéine (Comijn et al., 2001). Des données récentes suggèrent de plus en plus l'implication des mécanismes de régulation post-traductionnels additionnels.

C.4.3.1 Clivages protéolytiques de la E-cadhérine

Les métalloprotéases (MMPs) régulent la morphogénèse, et participent aussi activement à l'invasion tumorale et à la formation des métastases en modulant la structure de la MEC. Ces enzymes qui dégradent certains récepteurs membranaires et la plupart des composants de la

MEC, peuvent aussi agir directement sur l'adhésion intercellulaire assurée par la E-cadherine (Egeblad and Werb, 2002). A l'instar d'autres MMPs, la stromelysine-1 (SL-1) et la matrysiline-1 (MT-1) clivent la E-cadhérine dans sa portion extracellulaire (Noe et al., 2001). La protéine tronquée de 80KDa qui en résulte (sE-cadh) est souvent détectée dans les tissus et le sérum de patients atteints de cancer de la prostate (Dhanasekaran et al., 2001; Kuefer et al., 2003).

Dans des lignées cellulaires dérivées de cancers de la prostate et du sein, des études indiquent que l'expression de la m-calpaine est augmentée dans les tissus tumoraux en comparaison avec les tissus sains adjacents et que cette augmentation de l'expression de la m-calpaine est directement associée à la présence d'un fragment Ecadh¹⁰⁰ (fragment de clivage de la E-cadherine de 100KDa) (Rashid et al., 2001; Rios-Doria et al., 2003).

D'autres protéases, comme la cathepsine D ou ADAM-10 semblent aussi intervenir dans la progression de certaines tumeurs en affaiblissant les jonctions adhérentes (Kohutek et al., 2009; Zhang et al., 2007).

Actuellement, des travaux sont en cours pour évaluer les conséquences *in-vivo* d'autres clivages de la E-cadhérine, par exemple par la preseniline-1/ γ -secretase (Marambaud et al., 2002; Park et al., 2008a).

C.4.3.2 L'internalisation de la E-cadhérine

Le pool de protéines membranaires (récepteurs, molécules d'adhésion, canaux...) est constamment renouvelé. Ces protéines sont adressées à la membrane et parallèlement, elles sont endocytées pour être dégradées ou redistribuées à la membrane. Ce phénomène permet une régulation de l'expression des protéines membranaires, dans le temps et dans l'espace. Il existe plusieurs voies d'endocytose de la E-cadherine. Elles impliquent des mécanismes d'internalisation dépendants ou non de la clathrine, les cavéoles et même la macropinocytose (Bryant et al., 2007). Les molécules de E-cadherine progressent ensuite au travers de compartiments endosomaux avant d'être dégradée au niveau des lysosomes. La voie des endosomes de recyclage permet à des molécules endocytées d'être redistribuées à la membrane (Bryant and Stow, 2004) (**Figure 26**).

Les endosomes de recyclage sont issus du réseau tubulaire des endosomes précoces. Ils relocalisent à la membrane plasmique des composants endocytés en 10 à 15 minutes (Mellman et al., 1986). Les marqueurs classiques de ces compartiments sont les petites protéines G Rab-4 et Rab-11 (Sonnichsen et al., 2000). Les protéines de la famille Rab font partie de la superfamille des petites GTPases Ras. Grâce à des interactions avec différents

éfecteurs, ces protéines régulent le trafic intracellulaire avec les petites GTPases Ral et Rho (Wu et al., 2008).

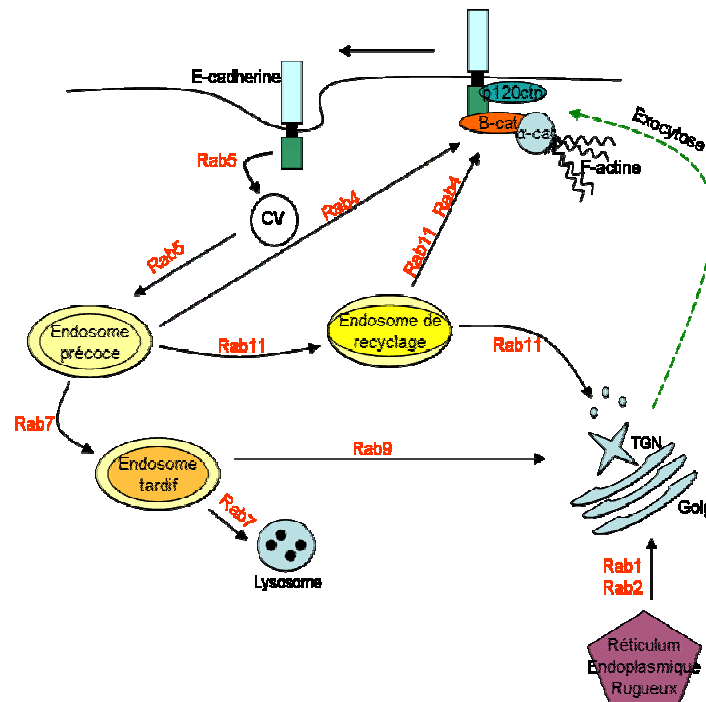


Figure 26 : Trafic intracellulaire de la E-cadherine et localisation de différentes protéines de la famille des GTPases Rab

La E-cadherine nouvellement synthétisée sort du TGN et est incorporée à la membrane plasmique. En parallèle, la E-cadherine membranaire est endocytée. Différentes voies impliquant les GTPases de la famille Rab, permettent alors un recyclage ou une dégradation. (CV : vésicule recouverte de clathrine)

De plus en plus d'études rapportent une internalisation aberrante de la E-cadherine dans les cancers (Mosesson et al., 2008). La phosphorylation de la E-cadherine sur des résidus tyrosine par des kinases oncogéniques de la famille Src ou des RTK, est un des principaux déclencheurs de l'endocytose de la E-cadherine. Ainsi, un certain nombre de facteurs de croissance tels que le HGF, le FGF et l'EGF provoquent une endocytose de la E-cadherine et par conséquent la rupture des jonctions adhérentes (Bryant and Stow, 2004; Mosesson et al., 2008).

La p120 catenine (p120ctn) interagit avec la région juxta-membranaire de la E-cadherine (Ireton et al., 2002). De nombreux travaux démontrent l'importance de la p120ctn dans la régulation de l'adhésion intercellulaire au niveau de la membrane plasmique. La p120ctn y module notamment la clusterisation de la E-cadherine et la quantité de E-cadherine présente à la membrane (Reynolds and Rocznik-Ferguson, 2004). En son absence la région intracytoplasmique de la E-cadherine est exposée à l'action de protéines potentiellement porteuses de signaux d'internalisation (Bryant and Stow, 2004).

RESULTATS

PRESENTATION DU TRAVAIL DE THESE

La protéine SOCS-1 est un régulateur spécifique de la voie de signalisation IL-4/STAT-6. Des travaux précédemment menés au laboratoire ont permis de cloner la région proximale du promoteur du gène *Socs-1* et d'étudier sa régulation en réponse à l'IL-4 dans la lignée cellulaire HaCat (kératynocytes humains immortalisés, transformés non tumorigènes). La protéine SOCS-1 est aussi un régulateur très spécifique de la voie IFN- γ /STAT-1. Les animaux *Socs-1*^{-/-} meurent d'ailleurs des effets délétères de la sur-activation de cette voie. Pourtant, les mécanismes de régulation du promoteur humain de *Socs-1* en réponse à l'IFN- γ ne sont pas précisément décrits.

La première partie de ce travail de thèse a donc été consacrée à la caractérisation des éléments de réponse du promoteur humain du gène *Socs-1*, mis en jeu lors d'une stimulation des cellules Hacat par l'IFN- γ . Pour atteindre cet objectif, nous avons mis en œuvre des approches bioinformatiques et des méthodes biochimiques d'analyse de promoteur.

Depuis quelques années, les données impliquant la protéine SOCS-1 dans le développement tumoral sont de plus en plus nombreuses. En effet, comme l'expression du gène *Socs-1* est fréquemment inhibée dans les tumeurs, ce gène est supposé être un gène suppresseur de tumeur (Luczak and Jagodzinski, 2006). Les premiers mécanismes moléculaires associés à l'action anti-tumorale de *Socs-1* ont été rapportés par Rottapel et ses collaborateurs en 2002 (Rottapel et al., 2002). Ces derniers ont démontré que la protéine SOCS-1 régule l'abondance et l'activité de plusieurs oncoprotéines hématopoïétiques comme Abl, Kit et BCR-Abl. Parallèlement les auteurs ont aussi observé que des fibroblastes *Socs-1*^{-/-} sont plus sensibles à une transformation induite par les oncoprotéines Tel-JAK2 et BCR-Abl. L'importance de ces observations est renforcée par les études rapportant l'inhibition de l'expression du gène *Socs-1* dans certains lymphomes et leucémie (Watanabe et al., 2004). Mais l'expression de ce gène suppresseur de tumeur est aussi éteinte dans de nombreux types de tumeurs solides (cancer de l'estomac, de la prostate, hépatocarcinomes, mélanome, tumeurs du sein et du colon...). Dans ces modèles, en dehors d'une inhibition de l'activité du facteur de transcription STAT-3 lorsque celui-ci est constitutivement actif, aucun mécanisme d'action n'a été avancé pour expliquer la fonction de la protéine SOCS-1.

Pourtant, dans la plupart des lignées cellulaires tumorales dans lesquelles l'expression du gène *Socs-1* est inhibée par méthylation de l'ADN, une réexpression de la protéine provoque une inhibition de la prolifération cellulaire. Dans certains modèles celle-ci s'accompagne d'une

inhibition des capacités de pousse en absence de support ou même de la formation de métastases (Huang et al., 2008; Yoshikawa et al., 2001). En 2006, Hanada et ses collaborateurs ont confirmé *in-vivo* que *Socs-1* est un gène suppresseur de tumeurs coliques (Hanada et al., 2006).

Nous avons donc choisi de nous intéresser au rôle de la protéine SOCS-1 dans la cancérogenèse colique. Pour cela, nous avons surexprimé la protéine dans deux lignées cellulaires formant un modèle validé de progression tumorale colique.

L'étude différentielle des cellules parentales et des cellules surexprimant la protéine d'intérêt a été plus axée sur la biologie cellulaire et constitue le deuxième volet de mon travail de thèse.

ARTICLE 1

Sp2 regulates interferon- γ -mediated Socs-1 gene expression

Martine LETOURNEUR, Lyne VALENTINO, Julia TRAVAGLI-GROSS, Jacques BERTOGLIO, Josiane PIERRE
Molecular Immunology 2009

Introduction

Les facteurs de transcription de la famille STATs sont cruciaux dans la régulation des gènes *socs*. Mais, il a été démontré que l'expression de ces gènes est aussi modulée par d'autres facteurs. Suite aux travaux menés au laboratoire sur la régulation du promoteur de *socs-1* par l'IL-4 dans la lignée cellulaire HaCaT (Travagli et al., 2004), nous nous sommes intéressées à l'IFN- γ .

L'IFN- γ est un puissant inducteur de l'expression du gène *Socs-1*, pourtant, les mécanismes de régulation mis en jeu pour le promoteur humain sont peu connus.

Dans les cellules murines NIH3T3, il a été montré que l'IFN- γ induit l'expression du gène *Socs-1* via une activation des facteurs de transcription STAT-1 et IRF-1. Ces derniers reconnaissant respectivement des sites consensus GAS (TTCN3GAA) et IRF-1 (AANGAAA) du promoteur murin (Saito et al., 2000).

Pour analyser les facteurs de transcription potentiellement impliqués dans la régulation du promoteur humain du gène *Socs-1*, nous avons donc choisi de mettre en œuvre une analyse différentielle des promoteurs humain et murin.

Principaux résultats :

La structure globale des deux promoteurs est comparable. Mais l'alignement, puis la comparaison des séquences n'a mis en évidence qu'un seul élément de réponse pour le facteur IRF-1 sur le promoteur humain, alors que le promoteur murin en présente deux consécutifs. L'analyse informatique a aussi révélée la présence d'une séquence GAS additionnelle en position -4500 en amont du premier exon dans le promoteur humain.

Nous avons démontré par des expériences *in-vitro* (retards sur gel) et *in-vivo* (ChiP) que les facteurs de transcription STAT-1 et IRF-1 sont capables de se fixer sur ces sites consensus.

Ces travaux ont aussi démontré la fixation d'un autre facteur de transcription au niveau des IRF-Es du promoteur murin. Des expériences de super-shift ont permis d'identifier le facteur de transcription Sp2. Nous avons aussi été capables de co-immunoprécipiter les facteurs IRF-1 et Sp2. Ce résultat suggère donc une interaction entre ces deux facteurs.

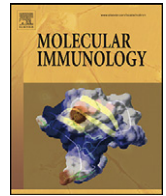
Parallèlement, nous nous sommes intéressées à l'activité des promoteurs humain et murin de *Socs-1* dans nos cellules. Nous avons observé que l'activité du promoteur murin en réponse à une stimulation par l'IFN- γ est plus importante que celle du promoteur humain.

Nous avons supposé un rôle du double motif IRF-E sur promoteur murin mais les transformations réciproques de l'IRF-E murin en IRF-E humain par mutagenèse dirigée n'ont pas entraîné de variations significatives des résultats des tests d'activation transcriptionnelle.

Nous nous sommes alors concentrées sur l'évaluation du rôle du facteur Sp2 au niveau fonctionnel. Nous avons utilisé l'interférence ARN pour inhiber l'expression de la protéine dans les cellules. L'expression de SiRNA Sp2, provoque une diminution globale de l'activité du promoteur murin, mais pas de variation du rapport d'induction en réponse à une stimulation par l'IFN- γ . Dans les cellules HaCat, l'utilisation des SiRNAs Sp2 entraîne une diminution drastique de l'induction de l'ARNm de *Socs-1* en réponse à l'IFN- γ . Par contre, nous n'avons pas pu identifier le ou les sites de liaison de Sp2 sur le promoteur humain.

Conclusion :

L'objectif de ce travail était de caractériser les éléments importants de la régulation du promoteur humain du gène *Socs-1* après une stimulation par l'IFN- γ dans les cellules HaCat. Notre approche par analyse différentielle des promoteurs humain et murin a permis de mettre en évidence l'importance du facteur de transcription Sp2. Ce facteur semble respectivement réguler l'activité basale et l'activation transcriptionnelle des promoteurs murin et humain. Par ailleurs, il semble que ce soit la première fois qu'une interaction directe entre les protéines IRF-1 et Sp2 soit rapportée.



Sp2 regulates interferon- γ -mediated *socs1* gene expression

Martine Letourneur¹, Lyne Valentino¹, Julia Travagli-Gross, Jacques Bertoglio, Josiane Pierre*

INSERM U749, Faculté de Pharmacie, 5 rue Jean-Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 April 2009

Accepted 4 May 2009

Keywords:

Promoter

siRNA

Transcription factor Sp2

Luciferase

EMSA

ABSTRACT

Suppressor of cytokine signalling (SOCS) proteins are inducible feedback inhibitors of Janus kinase (JAK) and signal transducers and activators of transcription signalling (STAT) pathways. Interferon (IFN)- γ induces the expression of the *socs1* gene in several cell types through several cis elements present in its promoter and their binding proteins. *Socs1* expression is induced in the human keratinocytes HaCaT cell line through sequential activation of STAT1 and IRF-1. Comparison of the 5'-upstream sequences of the mouse and human *socs1* genes identified conserved binding sites for IRF-1 regulatory elements. Although this response element is able to bind IRF-1 in human cells, no IFN- γ responsiveness was observed with human *socs1* promoter reporter constructs containing this element. In contrast the mouse *socs1* promoter was fully responsive. The mouse promoter contains two cis-acting elements which modulate its expression and are recognized by IRF-1 and Sp2. Despite the absence of Sp2 in the 5'-upstream sequence of the human promoter, silencing of Sp2 by RNA interference clearly demonstrated that Sp2 is required for IFN- γ -induced regulation of *socs1* mRNA both in human and mouse.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Interferons (IFN) are multifunctional cytokines that have antiviral, antiproliferative, and immunomodulatory effects (for review see Stark et al., 1998). IFN are used in the clinical management of malignant tumours, multiple sclerosis and chronic viral hepatitis (Baffis et al., 1999; Gresser, 1997). Type II interferon (IFN- γ) is a pleiotropic cytokine produced by activated T cells and NK cells, and is the most potent activator of the proinflammatory functions of keratinocytes. In fact, IFN- γ -activated keratinocytes express a broad array of chemokines, cytokines, and membrane molecules that direct the recruitment, activation, and retention of specific leukocytes in the skin (Albanesi et al., 1999, 2001; Federici et al., 2002). The reciprocal activation of T lymphocytes and keratinocytes has a primary role in the amplification of skin inflammation during immune-mediated skin diseases.

IFN- γ receptors consist of two ligand-binding IFNGR1 chains associated with two signal-transducing IFNGR2 chains. Receptor activation triggers JAK kinases activation which in turn the STAT1 transcription factors. After dimerization, activated STAT1

translocates to the nucleus and induces target gene transcription by binding to γ -activated sequences (GAS) in the promoters of IFN- γ -responsive genes (Darnell, 1997; Darnell et al., 1994). Interferon-regulated factors (IRFs) were also identified as transcriptional regulators of IFN-stimulated genes. Transcription of the *irf-1* gene is inducible by both IFN- α and IFN- γ (Haque and Williams, 1994; Pine et al., 1994; Sims et al., 1993) and this inducible transcription factor binds to an interferon regulatory factor binding element (IRF-E), AANNGAAA which is also a consensus sequence for IRF-2 (Tanaka et al., 1993).

Suppressors of cytokine signalling (SOCS) are a family of proteins that act in a feedback loop to inhibit cytokine responses and activation of the JAK/STAT pathway (Endo et al., 1997; Naka et al., 1997; Starr et al., 1997). SOCS1 is one of the eight members of the SOCS gene family which is characterized by a C-terminal SOCS box region and a central phosphotyrosine-binding Src homology 2 domain (Hilton et al., 1998). The SH2 domain of SOCS proteins interacts with phosphorylated tyrosine residues in tyrosine kinases and, in many cases, negatively regulates their activity (Krebs and Hilton, 2001; Yasukawa et al., 2000). The SOCS boxes of SOCS1 and SOCS3 have been found to mediate interaction with elongin B/C complex and to target SOCS1 interacting proteins for proteasomal-mediated degradation via ubiquitinylation; such proteins include JAK2 (Ungureanu et al., 2002), Tel-JAK2 (Frantsve et al., 2001; Kamizono et al., 2001), p65 NF- κ B (Ryo et al., 2003), Vav (De Sepulveda et al., 2000), FAK (Liu et al., 2003) and Mal (Mansell et al., 2006). SOCS1 is a critical regulator of IFN- γ signalling since hyper-responsiveness to IFN- γ was found in *socs1* deficient mice (Alexander et al., 1999; Cornish

Abbreviations: GAS, γ -activated sequence; IFN, interferon; IFNGR, IFN γ receptor; IL-4 RE, IL-4 responsive element; IRF, IFN-regulated factor; IRF-E, IRF-binding element; SBE, STAT6-binding element.

* Corresponding author. Tel.: +33 146835483; fax: +33 146835496.

E-mail address: josiane.pierre@u-psud.fr (J. Pierre).

¹ Authors contributed equally to this work.

et al., 2003). Mice lacking the gene for both *socs1* and *ifn* develop chronic inflammatory lesions in kidney, skin and various other organs (Metcalfe et al., 2002). Keratinocytes are primary target of IFN and after IFN exposure they synthesize numerous inflammatory cytokines involved in the initiation of skin diseases (Albanesi et al., 2005). Keratinocytes also express *socs1* to minimize consequences of IFN treatment.

Regulation of *socs1* gene expression occurs at several levels. The silencing of *socs1* gene by hypermethylation has been reported and is associated with the development of hepatocellular carcinoma (Yoshikawa et al., 2001) and was then further found in several other cell lines. Transcription of *socs1* mRNA is rapidly induced by various cytokines. Direct transcriptional repression has been described either for the transcriptional repressor GFI-1B (Jegalian and Wu, 2002) or for the transcription factor, ETS-1 (Travagli et al., 2004). *Socs1* expression is also controlled through translational repression (Gregorieff et al., 2000; Schluter et al., 2000).

Although the molecular bases of SOCS1 activity and regulation by various cytokines have been extensively investigated, limited information exists on its transcriptional regulation by IFN- γ , especially concerning the human promoter. We therefore examined the IFN- γ -activated transcription factors implicated in regulating *socs1* human promoter in comparison with the mouse promoter. Comparative gene analysis is a powerful approach to gain insight into gene regulation and function. To this end, we cloned the *socs1* promoter regions of mouse and human origin upstream a luciferase reporter gene. Functional promoter analyses using reporter assays revealed that the presence of tandem repeats of the core sequences of IRF-E, observed in the mouse promoter lead to a better IFN- γ responsive promoter. In addition we have characterized a putative Sp2 binding site just in front of the IRF-E. Specific inhibition of Sp2 expression by RNA interference inhibits *socs1* mRNA expression. These results demonstrate a decisive role of Sp2 in regulating *socs1* expression.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture

The human keratinocyte cell line HaCaT was cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with antibiotics (50 μ g/ml penicillin and 50 μ g/ml streptomycin), with 1 mM sodium pyruvate and 10% foetal calf serum (FCS).

2.2. Cytokine, antibodies, and reagents

Human recombinant IFN- γ , kindly provided by J. Wietzerbin, was added to the culture media at a final concentration of 10^3 U/ml. Anti-STAT1 (sc-346), anti-IRF-1 (sc-497), anti-IRF-2 (sc-498), anti-Sp2 (sc-643) polyclonal antibodies and Sp2 siRNA (sc-29489) were from Santa-Cruz. Control siRNA (#1027310) was from Qiagen. HA-IRF-1 and HA-Sp2 cDNAs were generous gift of Drs. I. Dusanter-Fourt and J.M. Horowitz, respectively. Plasmid encoding wt *socs1* promoter (-743/+690) luciferase construct was a generous gift of D. Hebenstreit.

2.3. PCR analysis

Total RNA was extracted with Trizol (Life technologies, Gaithersburg, MD, USA) as described by the manufacturer and quantified at OD 260 nm and further treated with DNase from Roche. 2 μ g of total cellular RNA was reverse-transcribed using an oligo dT primer and 2 units of AMV reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, USA) and then used as template for PCR. The specific primers used and PCR reactions were performed as described (Travagli et al., 2004). 1 μ l of RT was amplified with the *socs1*-specific primers and GAPDH-specific primers and analyzed by real time PCR using a Light

Cycler (Roche). Results obtained with *socs1*-specific primers were normalized against GAPDH.

2.4. Plasmids constructs

The promoter region of mouse genomic *socs1* DNA (-952/+44) was constructed by PCR from the PCR2-*socs1* plasmid (generous gift of P. De Sepulveda). The proximal 960 bp and 177 bp fragments of the mouse promoter were cloned into the pGL3 basic vector containing the firefly luciferase reporter gene (*luc*). Each promoter fragment was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using unique forward primers and a common reverse primer that ends 45 nucleotides after the start of transcription previously described (Saito et al., 2000), cut by restriction enzymes (listed in Table 1, part A) and then inserted at the same site into the pGL3 basic vector. Sequences of all promoter constructs were verified by sequencing. The numbering of all constructs begins at the start of transcription.

The -590 *hsocs1* and -170 *hsocs1* were generated from -750 *hsocs1* previously described (Travagli et al., 2004) by PCR amplification using forward primers described in Table 1, part A. The PCR fragments were cut by appropriate restriction enzymes and inserted at the same site into pGL3 basic vector.

Site-specific mutations in either the mouse or human *socs1* promoter were performed using the quick change site-directed mutagenesis kit (Stratagene) by using the oligonucleotides described in Table 1, part B.

2.5. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) analysis

ChIP experiments were performed as described (Travagli et al., 2004). The primers used for PCR amplification are described in Table 1, part C.

2.6. Immunoprecipitation and Western blotting

After stimulation by IFN- γ (10^3 U/ml), cells were lysed in a buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1% Triton X-100, 50 mM NaCl, 50 mM NaF, 10 mM NaPP, 5 mM EDTA, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, 10 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/ml pepstatin, 10 μ g/ml leupeptin. The cell lysates were clarified by centrifugation. 500 μ g of total protein was incubated with appropriate antibodies overnight and with protein G-Sepharose for 1 h at 4 °C. The immunoprecipitates were separated through 8% SDS-PAGE and proceeded for Western blotting as described (Travagli et al., 2004).

2.7. Electrophoretic mobility shift assays (EMSA)

HaCaT cells were stimulated with IFN- γ during 30 min or 2 h, scrapped in PBS supplemented with 1 mM Na₃VO₄, and pelleted. Nuclear extracts, radiolabeled double-strand oligonucleotides were prepared and EMSA experiments performed as previously described (Travagli et al., 2004). The ³²P labeled probes used in EMSA are described in Table 1. Supershift experiments were performed using the anti-STAT1, anti-IRF-1, anti-IRF-2 or anti-Sp2-specific antibodies. Oligonucleotides used as probes in EMSA assays contained the same mutated nucleotides as those used to introduce the mutations in reporter plasmids.

2.8. Transfection experiments

For transient transfection, cells were seeded at 4×10^5 cells per well in 6-well dishes 24 h before transfection. The different plasmids DNA were adjusted to 3 μ g of DNA and 6 μ l of jet-PEI solution (Polyplus transfection, Illkirch, France) in serum-free culture medium. After 16-h incubation, cells were stimulated or not with

Table 1
Oligonucleotides used in this study.

(A) Primers and restriction enzymes used for cloning of the reporter vectors			Position relatively to transcription start	Position on genomic DNA Z46940
Human				
Name	Forward primer	Reverse primer		
–750 hsocs1	cgat gggtacc TTTCTTCCGAGCCGGGTAG (KpnI)	acgt aaagctt GCCGATGCTCCGGGGCCAGG (HindIII)	–750 to +30	25902–26700
–170 hsocs1	atgc gctagc TCCAGAAGAGAGGAAACAG (NheI)	gcat agatct GCCGATGCTCCGGGGCCAGG (BglII)	–170 to +30	26483–26700
mouse				
Name	Forward primer	Reverse primer	Position relatively to transcription start	Position on genomic DNA Z47352
–952 msocs1	gctag gagctc ACCTCATCCGCTTCATTAC (SacI)	gcat tctgag TGGGAGCCGTGCCGCTGCCA (XhoI)	–952 to +44	10896–11890
–133 msocs1	atgc gctagc ACCGTCTCCAGGGAGAGCT (NheI)	gcat agatct TGGGAGCCGTGCCGCTGCCA (BglII)	–133 to +44	11715–11890
Desired inserts were amplified by PCR and cut with selected restriction enzymes and cloned into pGL3 basic vector				
(B) Primers used either for site-directed mutagenesis or EMSA analysis			Position relatively to transcription start	Position on genomic DNA Z46940
Name	Forward primer	Reverse primer		
hIRF	GGACGCCACCGGAAAGAGAAACCAAAGTGGAGCTGGG	CCCAGCTCCACTTTTGGTTTCTTTCCGCGTGGCGTCC	–121 to –89	26522–26561
hIRF mut h → m	GGACGCCACCGGAAAGAGAAACCGAAAGTGGAGCTGGG	CCCAGCTCCACTTT <u>CGG</u> TTTCTTTCCGCGTGGCGTCC	–120 to –90	26522–26561
Name	Forward primer	Reverse primer	Position relatively to transcription start	Position on genomic DNA Z47352
mIRF	GAAAGACTTGCCGAAAGAGAAACCGAAAGCGGGGGTGGG	CCCACCCCGCTTTTCGGTTTCTTTCCGCAAGTCTTTC	–93 to –53	11755–11794
mIRF mut m → h	GAAAGACTTGCCGAAAGAGAAAC CAA AGCGGGGGTGGG	CCCACCCCGCTTTTCGGTTTCTTTCCGCAAGTCTTTC	–93 to –53	11755–11794
mIRF–Sp2	CGAAAGACTTGCCGAAAGAGAAACCGAAAGCGGGGGTGGGCTGGACTGTGG	CCCACAGTCCAGCCACCCCGCTTTTCGGTTTCTTTCCGCAAGTCTTTCG	–93 to –43	11754–11807
mIRF–Sp2 mut IRF	CGAAAGACTTGCCGAAAGAT TCAC TCAAAGCGGGGGTGGGCTGGACTGTGGG	CCCACAGTCCAGCCACCCCGCTTTCGGTTTTCGGTTTCTTTCCGCAAGTCTTTCG	–93 to –43	11754–11807
(C) Primers used for PCR analysis of CHIP analysis				
Name	Forward primer	Reverse primer	Position relatively to transcription start	Position on genomic DNA Z46940
ChIP IRF1 h	GGTCCAGAAGAGAGGAAAC	GCCCCTGCGCCAGTCTTTTA	–168 to –15	26481–26636
ChIP Sp2	AGCCGGTTTAAAAGACTGGC	ACTCTGGCTGCCCTGGACT	–42 to +182	26609–26833
ChIP neg	TCCACTACGACTGGCTGATT	ACATCTGCTGAGGCCACAC	–1898 to –1573	24750–25075
Name	Forward primer	Reverse primer	Position relatively to transcription start	Position on genomic DNA Z47352
ChIP IRF m	ACCGTCTCCAGGAGAGCCT	TGGGAGCCGTGCCGCTGCCA	–153 to +18	11715–11890

Bold and italic: Sites for restriction enzymes used for cloning. Underlined: binding sites for transcription factors. Bold and underlined: mutated base in transcription factor binding site.

IFN- γ . Cells were lysed 7 h later in Reporter Lysis Buffer (Promega, Madison, WI, USA).

A constitutively active renilla luciferase (pRL-TK-luc) was included to correct for transfection efficiency. Luciferase activity was measured in the cell lysates using a dual luciferase assay kit (Promega, Madison, WI, USA) and photon counting (MicroLumat Plus 96V, Berthold, Nashua, NH). Each transfection experiment was performed in triplicate. Data are shown as the mean \pm standard error of the mean (SEM).

2.9. siRNA gene silencing

Cells were seeded at 4×10^5 cells per well in 6-well dishes the day before transfection. Cells were transfected with a medium containing 150 μ l OPTIMEM, 7.5 μ l interferin (ozyme) and 50 nM of Sp2-specific siRNA (Santa Cruz) or control siRNA. After 45-min incubation with the RNA complex, 1 ml of medium containing 10% FCS was added.

3. Results

3.1. IFN- γ activates STAT1 and IRF-1 in keratinocytes

IFN- γ is known to activate the JAK/STAT signalling pathways leading to STAT1 tyrosine phosphorylation. After a time course of IFN- γ stimulation of HaCaT keratinocyte cell line, we observed a tyrosine phosphorylation of STAT1 α (Fig. 1(A)). This tyrosine phosphorylation began 5 min after IFN- γ stimulation and persisted for at least 3–5 h. This tyrosine phosphorylation was associated with serine phosphorylation of STAT1 α , as visualized by a shift in migration of the STAT1 α band (Fig. 1(A, 2nd panel)). This serine phosphorylation

is essential for maximal ability to activate transcription of target genes.

STAT homodimers travel to the nucleus and bind to GAS elements to initiate transcription of IFN- γ -regulated genes. Many of these genes are in fact transcription factors, such as IRF-1, which are activated by IFN to drive regulation of the next wave of transcription. As it has been previously described, IRF-1 expression was indeed enhanced after IFN- γ stimulation; the expression of the IRF-1 protein was observed after 1 h of stimulation and remained for at least 24 h (Fig. 1(A, 3rd panel)). STAT1 expression is also regulated by IRF-1 (Schroder et al., 2004). This increase in STAT1 expression was observed in our cells after 15 h of IFN- γ stimulation. IRF-2, which mainly acts as an antagonist to IRF-1 to block the IFN- γ signalling pathway, has been also described as an IFN- γ inducible gene (Kroger et al., 2002). In our cellular conditions we observed constitutive expression of IRF-2 which was not modified by IFN- γ treatment.

3.2. IFN- γ induces *socs1* gene expression through an inducible factor

Suppressors of cytokine signalling (SOCS) proteins are inducible feedback inhibitors of JAK/STAT signalling pathways, which expression is regulated by IFN- γ . We then analyzed the time course expression of *socs1* mRNA in HaCaT cells stimulated by IFN- γ by real time RT-PCR. As shown in Fig. 1(B) *socs1* mRNA appeared after 1 h of stimulation and reached its maximal level at 3 h after the addition of IFN- γ . IL-4 has also been shown to induce *socs1* mRNA expression in HaCaT cells (Travagli et al., 2004), but the maximal accumulation of mRNA was observed earlier. This delay in IFN- γ -induced *socs1* mRNA time course suggested the requirement of an inducible factor. We then treated the cells with a protein synthesis inhibitor and tested the consequence of such a treatment on IL-4 or IFN- γ -mediated *socs1* mRNA expression. We observed that treatment with cycloheximide enhanced IL-4-mediated expression of *socs1* mRNA. This effect could be related to previous results which indicated that some inhibitors of protein synthesis themselves activate gene expression in the absence of other inducers (Edwards and Mahadevan, 1992; Greenberg et al., 1986). In contrast, cycloheximide treatment completely abolished the IFN- γ -mediated *socs1* mRNA expression. This result indicates that *socs1* mRNA induction by the IFN- γ requires ongoing protein synthesis.

3.3. Functional characterization of the *socs1* promoter

We have previously described the proximal human *socs1* promoter and its regulation by IL-4. To identify in intact cells the cis-acting elements involved in IFN- γ -mediated regulation of human *socs1* promoter activity, a series of different promoter constructs was generated and examined for IFN- γ responsiveness. The different fragments of human *socs1* promoter region extending from +53 to -170 up to -750 relative to the start site were cloned upstream of the luciferase reporter gene in the pGL3 basic vector (Travagli et al., 2004). These constructs contain either the two regulating elements (IL-4 RE and IRF-E) or only the IRF-E (Fig. 2(A)). HaCaT cells were transfected with these various constructs and then analyzed for luciferase activity as described in Section 2.

As shown in Fig. 2(B), IFN- γ treatment of cells transfected with these two constructs had no effect on luciferase production, in spite of the presence of the two regulating elements IL-4 RE and IRF-E. The absence of IFN regulation of the human *socs1* promoter was also observed in hematopoietic cell lines of human origin (THP1) and mouse origin (RAW 264.7) (data not shown). We have previously described a fivefold IL-4 responsiveness of the -750/+53 construct (Travagli et al., 2004). The IL-4 RE, which contains three STAT6-binding sites (SBE), is implicated in IL-4-mediated regula-

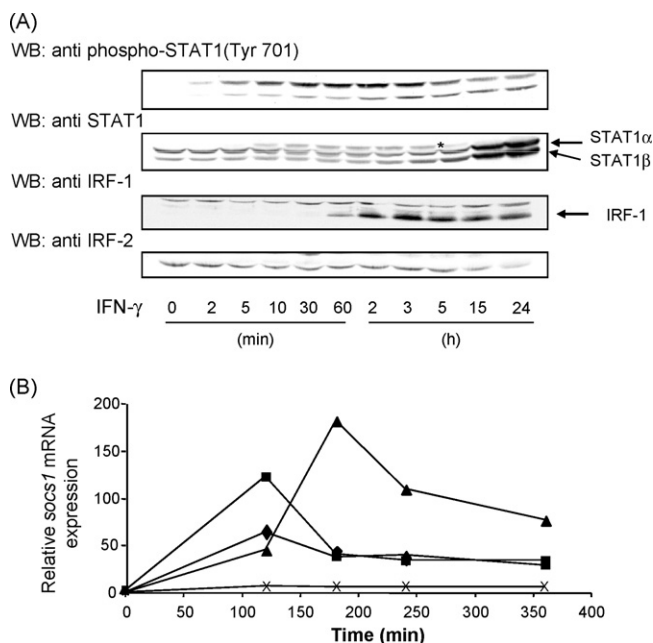


Fig. 1. IFN- γ enhances the expression of *socs1* gene in HaCaT cells through activation of Stat1 and IRF-1. (A) HaCaT cells were stimulated by IFN- γ for increasing periods of time. Proteins were analyzed by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane. Western blot analysis was performed with the indicated antibodies. Asterisk in Western blot indicates the position of the shifted band of STAT1 α . The depicted blot is representative of an experiment that was replicated more than three times. (B) Serum-starved HaCaT cells were stimulated for the indicated time with IL-4 in the absence (◆) or the presence (■) or IFN- γ in the absence (▲) or the presence (×) of cycloheximide. Expression of *socs1* gene was determined by real time RT-PCR. *Socs1* mRNA level was compared with the *gapdh* mRNA level used as a control.

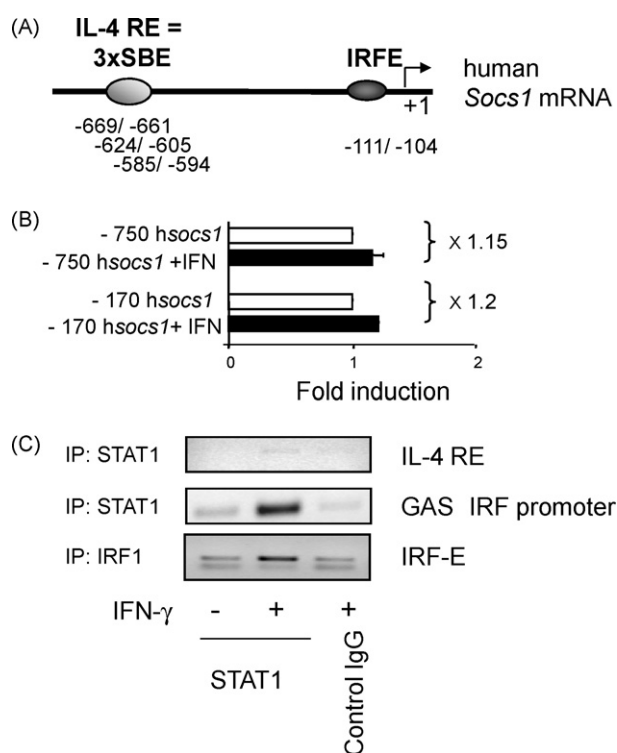


Fig. 2. Analysis of the human promoter activity. (A) Schematic organization of human promoter showing putative binding sites for STAT (IL-4 RE) and IRF-1 (IRF-E) transcription factors. (B) The different regions of human (-750 and -170 to $+30$) *socs1* promoter were cloned in the pGL3 basic vector. HaCaT cells were transiently transfected with the different reporter constructs. After 18 h transfected cells were then stimulated or not for 7 h with IFN- γ prior to prepare cellular extracts for measuring luciferase activity. The results are expressed as relative luciferase activities as compared to the basal level observed in absence of IFN- γ . Results are the means \pm standard deviations of at least three independent experiments. Values located at the right of each construct indicate the fold difference in the promoter activity in the IFN- γ -stimulated compared to non-stimulated cells. (C) ChIP analysis of STAT1 (1st and 2nd panel) and of IRF-1 (3rd panel) binding on the promoters after a 2 h IFN- γ -stimulation was visualized on either human *socs1* ILRE (1st), IRF-E (3rd) or human *irf1* promoters. Representative image of agarose gels showing IRF and STAT1 binding to the human promoters.

tion of *socs-1* expression. These SBEs, which are composed of a palindromic sequence separated by four nucleotides (TTCN₄GAA), are specific binding sites for STAT6. In vitro comparison of affinity of different STATs to the STAT-binding sites indicated that neither STAT1 nor STAT5 are able to bind to these N₄ sites (Ehret et al., 2001). After IFN stimulation, ChIP analysis indicated that activated STAT1 is not able to bind to the IL-4 RE (Fig. 2(C, 1st panel)), whereas in the same conditions a specific binding is observed on the GAS-binding site present in the *irf1* promoter (Sims et al., 1993) (Fig. 2(C, 2nd panel)). ChIP analysis also showed that IRF-1 could indeed bind to the IRF-E in the human *socs1* promoter (Fig. 2(C, 3rd panel)).

Comparison and alignment of the human (GeneBank accession Z46940), and mouse sequences (GeneBank accession Z47352) using mVista tools showed three highly conserved regions in the proximal *socs1* promoter (Bray et al., 2003). The first one is a region of an approximately 195 bp which displays 76% homology between human and mouse. This region contains the IL-4 RE composed of three SBEs. The second one ~ 90 bp sequences in the immediate vicinity of the transcriptional start site shows a high degree of homology (87.6%). In addition to these sequences we also observed a short sequence of 50 bp which was highly conserved (82% of homology) between mouse and human. Computer predictions of this region revealed the presence of GAAA elements which are characteristic DNA binding for IRF factors (IRF-E) (Tanaka et al., 1993). Many IRF-Es contain tandem repeats with 2 bp spacer (Fujii et al.,

1999). This dimeric IRF-E is only observed in the mouse *socs1* promoter (Fig. 3(A)). The main difference between these two promoters is the presence of a GAS element which is only observed in the mouse promoter (Fig. 3(B)).

We have then cloned a fragment containing 5'-upstream regions of mouse *socs1* gene into pGL3 basic vector. We obtained approximately 0.95 kb sequence upstream of the mouse transcriptional start site (Fig. 3(B)). Various deletions starting from -952 (containing IL-4 RE, GAS and IRF-E) to -130 (containing only IRF-E) relative to the transcription initiation site were subjected to transient transfection in HaCaT cells in the presence or absence of IFN- γ . As shown in Fig. 3(C), these two constructs exhibited about a threefold increase in luciferase activity after stimulation by IFN- γ . This result indicates that at least at the level of proximal promoter the sequences present in the mouse promoter confer an IFN- γ responsiveness. The -130 *msocs1* promoter, which does not contain GAS, showed virtually the same IFN- γ responsiveness as the -952 *msocs1* promoter, indicating that STAT1 is not directly implicated in the regulation of mouse *socs1* promoter. This observation is in agreement with previous observation which have indicated that no contribution of the GAS-like sequences of the mouse promoter to the IFN- γ responsiveness of the mouse *socs1* promoter (Saito et al., 2000). Altogether, this indicated that IRF-E is the only region involved in the induction of transcription of the *socs1* promoter by IFN- γ stimulation.

3.4. Identification of nuclear factors that bind to IRF-E in the *socs1* promoter

We next examined nuclear factors able to bind to the IRF-E in the human and mouse *socs1* promoter region. Nuclear extracts of HaCaT cells were prepared before or after IFN- γ stimulation and subjected to gel shift assays using the $-125/-86$ region (hIRF) of the human promoter as a probe (Table 1B and Fig. 4(A left part)). Two complexes (C1 and C2) with very different intensities were observed in nuclear extracts after the cytokine treatment. These two complexes were supershifted with anti-IRF1 antibodies indicating that they both contain IRF-1. The most rapidly migrating complex (C1) contains monomer of IRF-1. The use of IRF-2 antibodies did not modify the DNA-transcription factor complexes. Although IRF-2 is constitutively expressed in keratinocytes (Fig. 1(A)), IRF-2 binding was not detected on the IRF-E, either in absence or after IFN- γ stimulation, thus indicating that IRF-2, generally known as a transcriptional repressor, did not bind to this sequence and could not be implicated in the absence of IFN- γ responsiveness of the human promoter. In Fig. 4(A, right) the same experiment was done by using the IRF-E derived from the *socs1* mouse promoter (mIRF) which contains two IRF-Es (Table 1B). In this experiment, we also observed, in addition to C1 and C2, the appearance of an extra complex (C3). The formation of the same three DNA-complexes are observed when mutations were introduced in the hIRF, leading to formation of two IRF-binding sites (hIRF1 mut h \rightarrow m). All these complexes are also supershifted by anti-IRF-1 antibodies (Fig. 4(B)).

We then examined if the IRF-E has a consequence in promoter activity. For this purpose we have introduced the same modification (one IRF-E into two IRF-Es) in the -170 *hsocs1* promoter and analyzed it for luciferase activity after IFN- γ stimulation. As shown in Fig. 3(C, bottom) no significant modification of the luciferase activity by IFN treatment was observed with this construct.

We therefore mutated the mouse IRF-E and transformed it into a human-like, monomeric IRF-E [-130 *msocs1* mut m \rightarrow h], and as shown in Fig. 3(C) quite the same induction of this promoter activity (3.68-fold) was observed as compared to the wild-type promoter construct (3.42-fold), although by EMSA we observe a disappearance of the C3 complex (Fig. 4(B)).

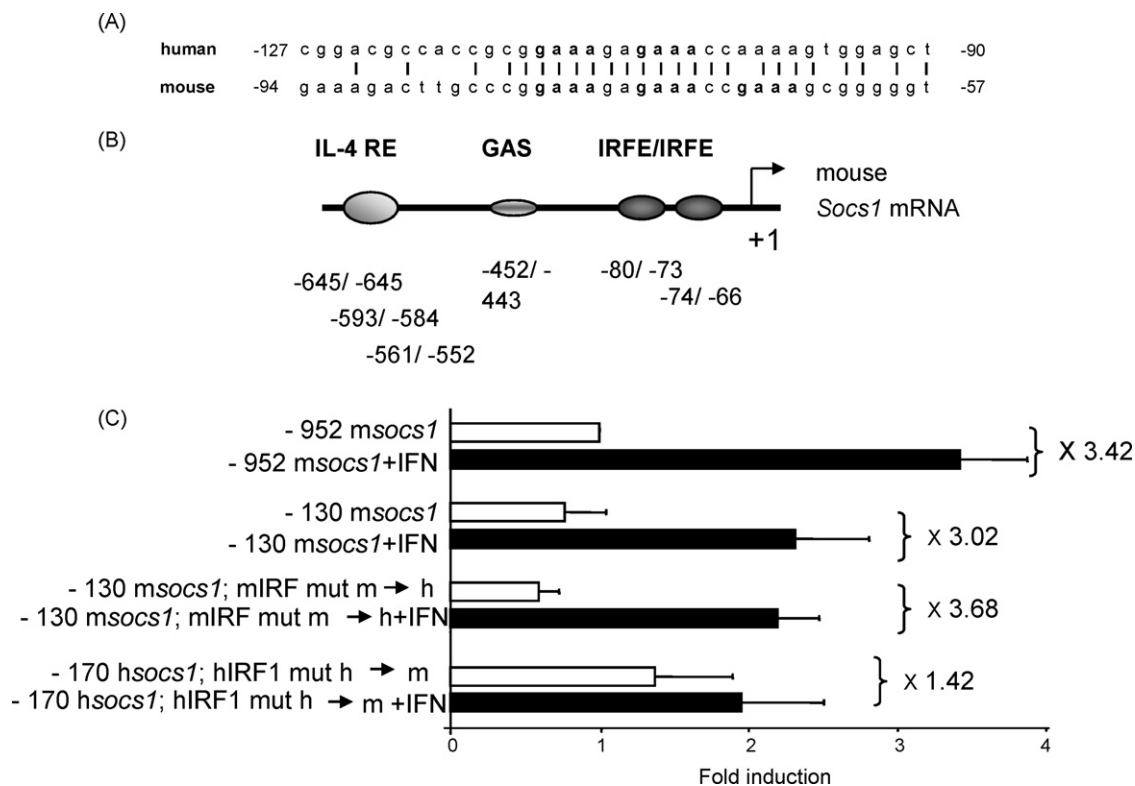


Fig. 3. Expression of mouse and human *socs1* promoter. (A) Sequences of human and mouse IRF-E sites. Consensus sequence for IRF-E is indicated in bold. (B) The different regions of mouse *socs1* (–952 and –130 to +44) promoter were cloned in the pGL3 basic vector. Mutated –170 *hsocs1* promoter, in which the human IRF-E was transformed into mouse IRF-E (–170 *hsocs1*; hIRF [mut h → m]) or mutated –130 *msocs1* promoter in which the mouse IRF-E was transformed into human IRF-E (–130 *msocs1*; mIRF [mut m → h]) were also generated by site-directed mutagenesis. (C) HaCaT cells were transiently transfected with the different reporter constructs. After 18 h transfected cells were then stimulated or not for 7 h with IFN- γ prior to prepare cellular extracts for measuring luciferase activity. The results are expressed as relative luciferase activities as compared to the basal level observed in absence of IFN- γ . Results are the means \pm standard deviations of at least three independent experiments. Values located at the right of each construct indicate the fold difference in the promoter activity in the IFN- γ -stimulated compared to non-stimulated cells.

Altogether these results indicated that the presence of two adjacent IRF-Es is not a prerequisite for IFN- γ responsiveness of the *socs1* promoter and that other transcription regulator(s) might be required.

3.5. Sp2 and IRF-1 bind to the mouse *socs1* promoter in vitro

In the vicinity of the IRF-binding site in the mouse *socs1* promoter, we have identified a Sp2 consensus [5'-GGGCTGGAC-3'] DNA-binding site (Moorefield et al., 2004). An oligonucleotide probe (–93 to –43 mouse promoter), which contains both IRF and Sp2 consensus element (m IRF–Sp2), was used in EMSA analysis and as shown in Fig. 5(A) in the absence of stimulation or after 30 min a new complex (C4), migrating slower than the C3 complex (noted as a thick arrow) was observed. This complex is supershifted with a Sp2 antibody (compare lanes 2–4). Stimulation by IFN- γ for 2 h slightly modify the migration of this complex presumably by the fact that Sp2, which constitutively binds to the Sp2 element, could interact with IRF-1 after its binding on the IRF-E. This C4 complex is also supershifted by anti-IRF-1 antibodies. By using competition with specific Sp1 and Sp3 antibodies, we ruled out the presence of these two factors in the C4 complex (data not shown).

The interaction of the two transcription factors was confirmed by two experiments. First, binding of Sp2 was also examined on a mIRF–Sp2 mut IRF oligonucleotide probe, in which the IRF-binding site has been deleted. As shown in Fig. 5(A lanes 7–9), we observed the putative Sp2 complex. This complex is supershifted by either Sp2 or IRF-1 antibodies. These observations strongly suggested that these two transcription factors interact at the promoter level. Sec-

ond, we then examined if these two proteins were able to physically interact. Therefore, we transfected HaCaT cells with HA-tagged IRF-1 and HA-tagged Sp2 expressing vectors. As shown in Fig. 5(B) (input), we observed the expression of the two proteins but the level of expression of the Sp2 protein was lower than the expression of IRF-1, although the expression of these two recombinant proteins is driven by the same CMV promoter. In the left part we have immunoprecipitated the cellular extracts with an anti-IRF-1 antibody and then probed with an anti-HA antibody. We were able to co immunoprecipitate Sp2 with IRF-1. In the right part of the figure the reciprocal experiment indicates that IRF-1 is also immunoprecipitated with an anti-Sp2 antibody. These results indicated that the interaction of these two transcription factors observed by EMSA also occurs at the protein level.

We also attempted to determine if Sp2 is able to interact on the mouse promoter ectopically expressed in intact cells. ChIP for Sp2 was therefore examined on the transfected mouse promoter. As shown in Fig. 5(C, left) the presence of Sp2 on the DNA was observed both in control condition and after IFN stimulation. In these transfected cells, ChIP analysis indicated that IRF-1 also binds to this region, but this immunoprecipitation is dependant of the IFN- γ stimulation (Fig. 5(C, right)).

In contrast to the mouse promoter, no Sp2-binding site was observed in the human promoter in the vicinity of IRF-E. Transfac analysis indicated that one Sp2-binding site is present in the first exon of the human *socs1* gene (+102 to +106; 26749–26752, position on human genomic DNA Z46940). It was very difficult to amplify this region, which contains a high level of GC rich content, corresponding to 3'-end of the first exon. This renders the visualization of Sp2 binding to its target sequence after ChIP analysis

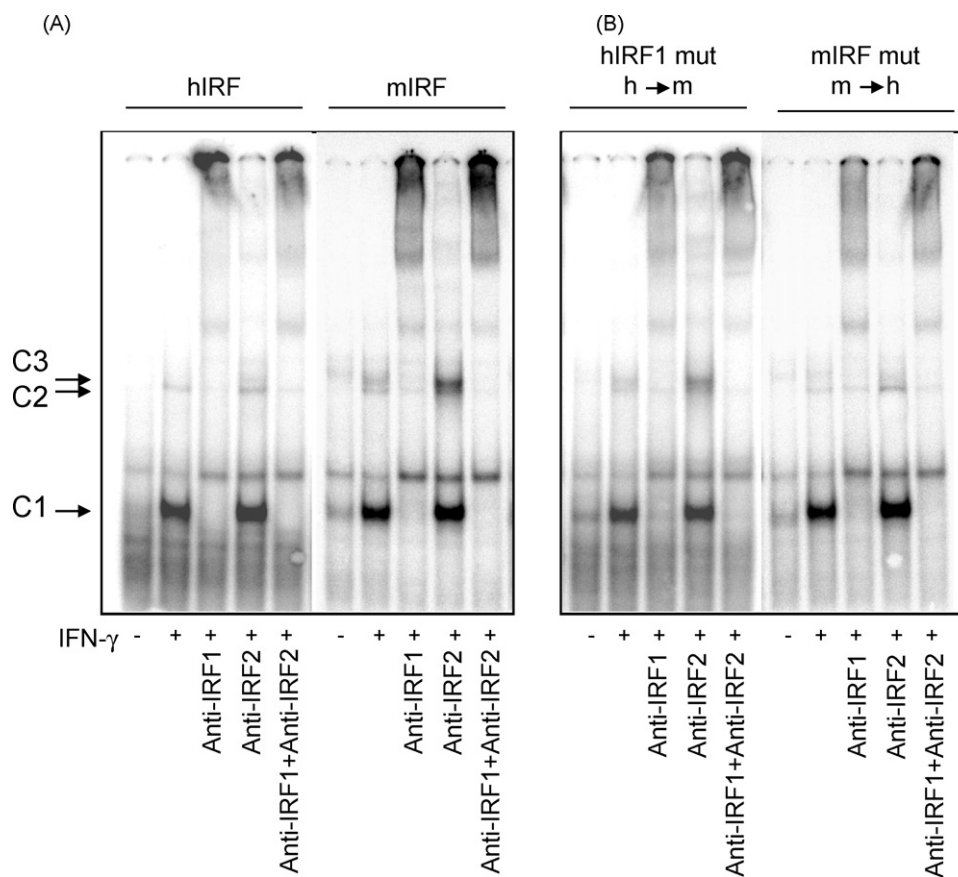


Fig. 4. Complexes present on the IRF-E. 40 bp radiolabeled probe containing the either wild type (A) human or mouse or mutated (B) human or mouse (see Table 1) IRF-E were used for EMSA and incubated with nuclear extracts of untreated or IFN- γ (10^3 U/ml for 2 h) treated HaCaT cells. Supershift experiments were performed by incubation with either anti-IRF-1 or -IRF-2 antibodies or both.

impossible even if the amplification of the region was performed in the presence of 1 M betaine and 5–10% DMSO.

3.6. Sp2 regulates IFN-induced gene expression and transcriptional activation

By EMSA and ChIP analysis we have shown that Sp2 is able to bind to the mouse proximal *socs1* promoter, we further examined if Sp2 affects IFN- γ -induced transcriptional activation of *msocs1* promoter by using siRNA to reduce the endogenous expression of Sp2 in HaCaT cells. A specific siRNA for Sp2 or a control siRNA was transfected into HaCaT cells. The IFN- γ -mediated transcriptional responses were measured using -952 *msocs1* luciferase reporter plasmid. As shown in Fig. 6(A) siRNA-mediated extinction of Sp2 expression resulted in some reduction of basal promoter activity, but the IFN- γ induction remains virtually unchanged (3.0-fold in the presence of siRNA compared to 3.59-fold in absence). Aliquots of cell lysates were analyzed by Western blotting to confirm reduced expression of Sp2 (Fig. 6(B)). To examine if Sp2 is implicated in the regulation of human *socs1* expression we first evaluated if the expression of a reporter plasmid containing a human DNA sequence including this putative Sp2-binding site is regulated by IFN- γ . To do so, we used the wt SOCS1 promoter (-743/+690), previously described by Hebenstreit et al., which contains the putative Sp2-binding site. No modification of luciferase activity was observed with this promoter construct after IFN- γ stimulation (data not shown).

To further examine if Sp2 participates in regulating IFN- γ -induced endogenous human *socs1* mRNA expression transcription, the level of *socs1* mRNA was determined by using quantitative real

time PCR after Sp2 extinction by siRNA experiment. As shown in Fig. 6(C) IFN- γ -induced *socs1* mRNA expression was dramatically reduced in Sp2 siRNA-treated cells. Taken together these results strongly suggest that Sp2 is implicated in the regulation of *socs1* gene in intact cells. This regulatory mechanism implies the involvement of chromatin-specific regulatory mechanisms which allow Sp2 to influence the expression of IFN- γ -induced genes.

4. Discussion

In the present study we isolated 5'-flanking regions of human and mouse *socs1* gene to analyze their regulation by IFN- γ in keratinocytes. The general structure of both human and mouse promoters appeared similar. Comparative analysis allows the identification of sites that are of functional importance. We and others identified two elements, IL-4 RE and IRF-E that are highly conserved in the two species of *socs1* promoter. These factors are likely to be essential regulators of *socs1* gene by cytokines (Hebenstreit et al., 2003; Saito et al., 2000; Travagli et al., 2004). We have shown that in human keratinocytes STAT1 is rapidly tyrosine phosphorylated after IFN- γ stimulation. Our results indicate that although STAT1 is functionally activated, it is not directly implicated in the *socs1* gene regulation.

The activation of *socs1* gene expression was completely abolished when the cells were stimulated by IFN- γ in the presence of protein synthesis inhibitor, thus indicating that inducible factors were implicated in *socs1* regulation. This observed effect is probably due to the binding of activated STAT1 to the GAS site in the *irf-1* promoter which is an essential event in *irf-1* gene regulation (Haque and Williams, 1994; Pine et al., 1994; Sims et al., 1993). The

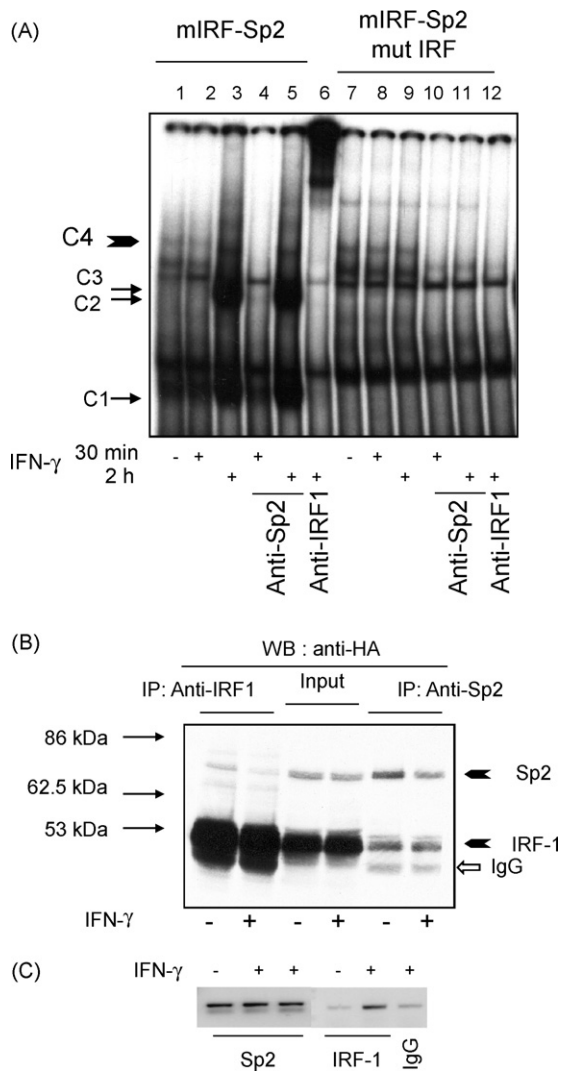


Fig. 5. Sp2 and IRF-1 are present in complexes both in vitro on promoter and in intact cells. (A) A 53 bp radiolabeled probe containing IRF-1 and putative Sp2-binding sites was used for EMSA analysis. Nuclear extracts from either 30 min or 2 h IFN- γ -stimulated were used untreated or after incubation with anti-Sp2 or IRF-1 antibodies. The nuclear extracts were incubated with the wt probe [mIRF-Sp2] (left) or with a mutated probe in which the IRF-E is mutated [mIRF-Sp2 mut IRF] (right). (B) HaCaT cells were transiently transfected with plasmids allowing ectopic expression for HA-IRF-1 and HA-Sp2. Cell lysates were immunoprecipitated with indicated antibodies. The presence of IRF-1 and Sp2 was visualized by Western blotting by anti-HA antibodies. Level of expression of HA-IRF-1 and HA-Sp2 in the transfected cells was controlled in the total cell lysate (Input). (C) ChIP analysis of Sp2 binding on the human *socs1* promoter and on the transfected mouse promoter (-952 *socs1*) after a 30 min or 2 h IFN- γ stimulation. After Sp2 or IRF-1 immunoprecipitation, a 171 bp amplicon of the transfected mouse *socs1* promoter was amplified by PCR. Representative image of agarose gels showing Sp2 and IRF-1 binding to the mouse *socs1* promoter.

IRF-1 transcription factor seems therefore to be the most important regulator of *socs1* transcription.

EMSA analysis indicated that two complexes are observed on the human IRF-E, the major one seems to correspond to monomeric form of IRF-1. The nature of the second complex if it contains dimeric form of IRF-1 represents only a very small amount of the complexes generated by IFN- γ . During this study, we have also cloned the human and the mouse *socs1* promoter. Despite the high homology between these two promoters, IFN- γ responsiveness was observed only with the mouse promoter. EMSA analysis indicated that an additional complex was observed on the mouse IRF-E, in addition to the two previously described complexes. After intro-

duction of a mutation which transforms the monomeric hIRF-E to a dimeric mouse IRF-E we observed the presence of this extra complex on the mutated hIRF-E. Thus, this observation reinforced the role of this additional DNA-protein complex.

Here we demonstrated that in contrast to the human *socs1* promoter, the mouse *socs1* promoter activity was enhanced by IFN- γ treatment in the human keratinocytes HaCaT cell line. This difference of expression between mouse and human promoters is also observed if the promoter activities were examined in mouse cell lines (data not shown). The shortest mouse fragment $-133/+44$ of 5'-flanking sequence contains most of the elements required for

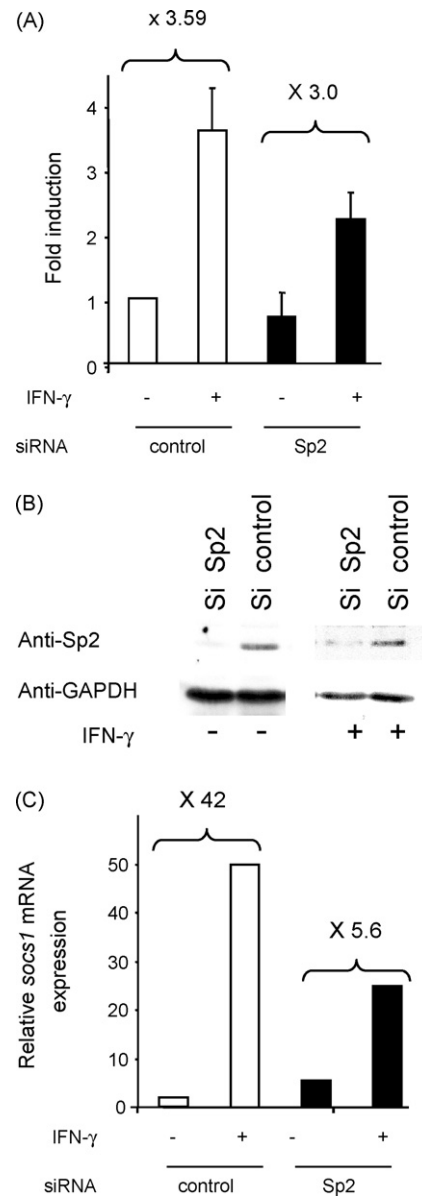


Fig. 6. Requirement of Sp2 for regulation of IFN- γ -induced *socs1* expression. (A) HaCaT cells were treated with control or Sp2 siRNA for 18 h. Cells were then transfected with -130 *socs1* for an additional 18 h lap of time and then stimulated or not with IFN- γ for an additional 7 h. The cells were harvested and assayed for luciferase activity. Values located on the top of each condition indicate the fold difference in the promoter activity in the IFN- γ -stimulated compared to non-stimulated cells. (B) The cells were lysed and an aliquot (50 μ g) of total cell lysates was blotted with anti-Sp2 or GAPDH antibodies. (C) Cells were treated with siRNA for 48 h prior to stimulation by IFN- γ for 3 h. Total RNA samples isolated from these cells were subjected to real time RT-PCR to determine relative *socs1* mRNA level. Values located at the top of each condition indicate the fold difference in the mRNA expression in the IFN- γ -stimulated compared to non-stimulated cells.

IFN- γ responsiveness. Site-directed mutagenesis of the IRF-E in the mouse promoter did not dramatically modify the reporter activity. This minimized the relevance of the binding of two IRF transcription factors in the regulation of *socs1* promoter and in contrast reinforced the role of another transcriptional regulator in the IFN response.

Several members of the IRF family of transcription factors are potent activators of IRF-E-dependent transcription. For example IRF-9 and IRF-3, which are present in a latent form prior to stimulation are activated by IFNs and are responsible for immediate activation of target genes. IRF-1, inducible after IFN, also activates transcription. On the other hand, other members of the IRF family, the prototype being IRF-2 repress IRF-E-dependent transcription. This repression is thought to contribute to the maintenance of IFN-inducible genes in a silent state prior to stimulation. ICSBP (IRF-8; IFN consensus sequence binding protein) is also a repressor of IRF-E-dependent transcription (Nelson et al., 1993; Weisz et al., 1992). The absence of IRF-2 induction after IFN- γ stimulation led us to exclude the implication of this member of the IRF family in the unresponsiveness of the human *socs1* promoter.

The interaction of IRF proteins with other transcription factors has been also described (Brass et al., 1996, 1999; Kuwata et al., 2002; Perkel and Atchison, 1998). TEL, a member of the Ets family, has been shown to be recruited to the IFN-stimulated response element (IRSE) in IFN- γ -stimulated macrophages and this recruitment is associated with an increased repression of IRSE-dependent transcription by allowing recruitment of HDAC to their target promoters (Kuwata et al., 2002). Sp2 has been also implicated in the repression of target gene expression by recruiting histone deacetylase to its promoter (Phan et al., 2004).

In our study we have characterized another transcriptional factor Sp2 which also interacts with the proximal region of the mouse promoter. This recruitment was found to be independent of IFN- γ and remained after IFN- γ stimulation. Sp2, which is a member of the Sp transcription factor family, has been shown to bind weakly to the TCR V α GT-box promoter element (Kingsley and Winoto, 1992). This consensus-binding sequence was then more precisely characterized and defined to be as 5'-GGGCGGGAC. Recombinant Sp2 binds to this sequence with a high affinity (Moorefield et al., 2004). More recently Sp2 has been shown to preferentially associate with the nuclear matrix within subnuclear foci and this association may play a role in Sp2-regulated transcription (Moorefield et al., 2006). Sp2 may participate in fastening GC rich region of chromosome regions to nuclear matrix. It is worth pointing out that a somatic matrix associated region is found in the human *socs1* gene (Kramer et al., 1998; Yoshikawa et al., 2001). Matrix-associated Sp2 may regulate *socs1* gene expression via maintaining structural conformation of DNA allowing transcription factors, which activity is regulated by growth factors, to interact with their binding sequence. Despite the direct interaction of Sp2 to its target sequences, Sp2 could be also able to interact with IRF-1 and this interaction is also observed on DNA indicating that by this way Sp2 is able to modulate IRF-1 transcriptional activity. To our knowledge, the interaction of Sp2 and IRF-1 we described in this study is the first example of the interaction between proteins of the IRF and Sp families. siRNA-mediated extinction of Sp2 leads to opposite outcomes in transcription on the transfected promoter and on the endogenous mRNA. With the former, siRNA causes virtually no modification of the expression, and with the latter results in transcriptional repression. These opposite effects strongly suggested that the transcriptional modification mediated by Sp2 depends upon chromatin structure. Three-dimensional chromatin structure involving the formation of interactions among distant regulatory elements has been described for IFN- γ -mediated *CIITA* and *socs1* gene transcription regulation (Abou El Hassan and Bremner, 2009; Ni et al., 2008). It has been shown that there are multiple distant

enhancers at the *socs1* locus spreading over 100 kb that mediated the establishment of the long distance chromatin loops between the distal enhancers and the proximal regions (Abou El Hassan and Bremner, 2009). In this study, implication of only the two transcription factors STAT1 and IRF-1 is described but it is likely that other transcription factors could be also implicated in the formation of a complex leading to a three-dimensional chromatin structure. It is tempting to speculate that Sp2, which interacts with nuclear matrix and IRF-binding region, could be also implicated in this regulation.

It has been shown that SOCS1 proteins were undetectable in healthy skin and in atopic dermatitis (AD) but highly expressed in the epidermis of psoriasis and allergic contact dermatitis (ACD) (Federici et al., 2002). These differences are probably due the prominent infiltration of IFN- γ -producing Th1 lymphocytes in ACD and psoriasis compared with AD (Bos and De Rie, 1999; Cavani et al., 2001; Girolomoni et al., 2001). IFN- γ is one of the cytokines which participate to the activation cycle of keratinocytes (Freedberg et al., 2001). In fact in the late stages of wound healing, the contraction of newly formed extracellular matrix produced by the fibroblasts is an important process. Keratinocytes have to contract the fibronectin-rich basement membrane. The signal that renders the keratinocytes able to contract is IFN- γ . It has been shown that the expression of keratin17 gene is one of the implicated gene in this event. *Socs1* gene expression is also regulated in keratinocytes and is implicated in the negative feedback of IFN- γ signal transduction, therefore allowing the activated keratinocytes to go back to their regular function.

Acknowledgements

We are grateful to I. Dusanter-Fourt, D. Hebenstreit and J.M. Horowitz for providing us with the different plasmids used in this study. The authors were supported by the French ministry of research fellowship for L.V. and by funds from INSERM and from GEFLUC Paris Ile de France.

References

- Abou El Hassan, M., Bremner, R., 2009. A rapid simple approach to quantify chromosome conformation capture. *Nucleic Acids Res* 37, e35.
- Albanesi, C., Cavani, A., Girolomoni, G., 1999. IL-17 is produced by nickel-specific T lymphocytes and regulates ICAM-1 expression and chemokine production in human keratinocytes: synergistic or antagonist effects with IFN-gamma and TNF-alpha. *J Immunol* 162, 494–502.
- Albanesi, C., Scarponi, C., Giustizieri, M.L., Girolomoni, G., 2005. Keratinocytes in inflammatory skin diseases. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 4, 329–334.
- Albanesi, C., Scarponi, C., Sebastiani, S., Cavani, A., Federici, M., Sozzani, S., Girolomoni, G., 2001. A cytokine-to-chemokine axis between T lymphocytes and keratinocytes can favor Th1 cell accumulation in chronic inflammatory skin diseases. *J Leukoc Biol* 70, 617–623.
- Alexander, W.S., Starr, R., Fenner, J.E., Scott, C.L., Handman, E., Sprigg, N.S., Corbin, J.E., Cornish, A.L., Darwiche, R., Owczarek, C.M., Kay, T.W., Nicola, N.A., Hertzog, P.J., Metcalf, D., Hilton, D.J., 1999. SOCS1 is a critical inhibitor of interferon gamma signaling and prevents the potentially fatal neonatal actions of this cytokine. *Cell* 98, 597–608.
- Baffis, V., Shrier, I., Sherker, A.H., Szilagyi, A., 1999. Use of interferon for prevention of hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients with hepatitis B or hepatitis C virus infection. *Ann Intern Med* 131, 696–701.
- Bos, J.D., De Rie, M.A., 1999. The pathogenesis of psoriasis: immunological facts and speculations. *Immunol Today* 20, 40–46.
- Brass, A.L., Kehrl, E., Eisenbeis, C.F., Storb, U., Singh, H., 1996. Pip, a lymphoid-restricted IRF, contains a regulatory domain that is important for autoinhibition and ternary complex formation with the Ets factor PU.1. *Genes Dev* 10, 2335–2347.
- Brass, A.L., Zhu, A.Q., Singh, H., 1999. Assembly requirements of PU.1–Pip (IRF-4) activator complexes: inhibiting function in vivo using fused dimmers. *EMBO J* 18, 977–991.
- Bray, N., Dubchak, I., Pachter, L., 2003. AVID: a global alignment program. *Genome Res* 13, 97–102.
- Cavani, A., Albanesi, C., Traidl, C., Sebastiani, S., Girolomoni, G., 2001. Effector and regulatory T cells in allergic contact dermatitis. *Trends Immunol* 22, 118–120.
- Cornish, A.L., Chong, M.M., Davey, G.M., Darwiche, R., Nicola, N.A., Hilton, D.J., Kay, T.W., Starr, R., Alexander, W.S., 2003. Suppressor of cytokine signaling-1 regulates signaling in response to interleukin-2 and other gamma c-dependent cytokines in peripheral T cells. *J Biol Chem* 278, 22755–22761.
- Darnell Jr, J.E., 1997. STATs and gene regulation. *Science* 277, 1630–1635.

- Darnell Jr., J.E., Kerr, I.M., Stark, G.R., 1994. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264, 1415–1421.
- De Sepulveda, P., Ilangumaran, S., Rottapel, R., 2000. Suppressor of cytokine signaling-1 inhibits VAV function through protein degradation. *J Biol Chem* 275, 14005–14008.
- Edwards, D.R., Mahadevan, L.C., 1992. Protein synthesis inhibitors differentially superinduce c-fos and c-jun by three distinct mechanisms: lack of evidence for labile repressors. *EMBO J* 11, 2415–2424.
- Ehret, G.B., Reichenbach, P., Schindler, U., Horvath, C.M., Fritz, S., Nabholz, M., Bucher, P., 2001. DNA binding specificity of different STAT proteins. Comparison of in vitro specificity with natural target sites. *J Biol Chem* 276, 6675–6688.
- Endo, T.A., Masuhara, M., Yokouchi, M., Suzuki, R., Sakamoto, H., Mitsui, K., Matsumoto, A., Tanimura, S., Ohtsubo, M., Misawa, H., Miyazaki, T., Leonor, N., Taniguchi, T., Fujita, T., Kanakura, Y., Komiya, S., Yoshimura, A., 1997. A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature* 387, 921–924.
- Federici, M., Giustizieri, M.L., Scarponi, C., Girolomoni, G., Albanesi, C., 2002. Impaired IFN-gamma-dependent inflammatory responses in human keratinocytes over-expressing the suppressor of cytokine signaling 1. *J Immunol* 169, 434–442.
- Frantsve, J., Schwaller, J., Sternberg, D.W., Kutok, J., Gilliland, D.G., 2001. Socs-1 inhibits TEL-JAK2-mediated transformation of hematopoietic cells through inhibition of JAK2 kinase activity and induction of proteasome-mediated degradation. *Mol Cell Biol* 21, 3547–3557.
- Freedberg, I.M., Tomic-Canic, M., Komine, M., Blumenberg, M., 2001. Keratins and the keratinocyte activation cycle. *J Invest Dermatol* 116, 633–640.
- Fujii, Y., Shimizu, T., Kusumoto, M., Kyogoku, Y., Taniguchi, T., Hakoshima, T., 1999. Crystal structure of an IRF-DNA complex reveals novel DNA recognition and cooperative binding to a tandem repeat of core sequences. *EMBO J* 18, 5028–5041.
- Girolomoni, G., Sebastiani, S., Albanesi, C., Cavani, A., 2001. T-cell subpopulations in the development of atopic and contact allergy. *Curr Opin Immunol* 13, 733–737.
- Greenberg, M.E., Hermanowski, A.L., Ziff, E.B., 1986. Effect of protein synthesis inhibitors on growth factor activation of c-fos, c-myc, and actin gene transcription. *Mol Cell Biol* 6, 1050–1057.
- Gregorieff, A., Pyronnet, S., Sonenberg, N., Veillette, A., 2000. Regulation of SOCS-1 expression by translational repression. *J Biol Chem* 275, 21596–21604.
- Gresser, I., 1997. Wherefore interferon? *J Leukoc Biol* 61, 567–574.
- Haque, S.J., Williams, B.R., 1994. Identification and characterization of an interferon (IFN)-stimulated response element-IFN-stimulated gene factor 3-independent signaling pathway for IFN-alpha. *J Biol Chem* 269, 19523–19529.
- Hebenstreit, D., Luft, P., Schmedlechner, A., Regl, G., Frischauf, A.M., Aberger, F., Duschl, A., Horejs-Hoek, J., 2003. IL-4 and IL-13 induce SOCS-1 gene expression in A549 cells by three functional STAT6-binding motifs located upstream of the transcription initiation site. *J Immunol* 171, 5901–5907.
- Hilton, D.J., Richardson, R.T., Alexander, W.S., Viney, E.M., Willson, T.A., Spriggs, N.S., Starr, R., Nicholson, S.E., Metcalf, D., Nicola, N.A., 1998. Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 114–119.
- Jegalian, A.G., Wu, H., 2002. Regulation of Socs gene expression by the proto-oncoprotein GFI-1B: two routes for STAT5 target gene induction by erythropoietin. *J Biol Chem* 277, 2345–2352.
- Kamizono, S., Hanada, T., Yasukawa, H., Minoguchi, S., Kato, R., Minoguchi, M., Hattori, K., Hatakeyama, S., Yada, M., Morita, S., Kitamura, T., Kato, H., Nakayama, K., Yoshimura, A., 2001. The SOCS box of SOCS-1 accelerates ubiquitin-dependent proteolysis of TEL-JAK2. *J Biol Chem* 276, 12530–12538.
- Kingsley, C., Winoto, A., 1992. Cloning of GT box-binding proteins: a novel Sp1 multigene family regulating T-cell receptor gene expression. *Mol Cell Biol* 12, 4251–4261.
- Kramer, J.A., Adams, M.D., Singh, G.B., Doggett, N.A., Krawetz, S.A., 1998. A matrix associated region localizes the human SOCS-1 gene to chromosome 16p13.13. *Somat Cell Mol Genet* 24, 131–133.
- Krebs, D.L., Hilton, D.J., 2001. SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem Cells* 19, 378–387.
- Kroger, A., Koster, M., Schroeder, K., Hauser, H., Mueller, P.P., 2002. Activities of IRF-1. *J Interferon Cytokine Res* 22, 5–14.
- Kuwata, T., Gongora, C., Kanno, Y., Sakaguchi, K., Tamura, T., Kanno, T., Basur, V., Martinez, R., Appella, E., Golub, T., Ozato, K., 2002. Gamma interferon triggers interaction between ICSBP (IRF-8) and TEL, recruiting the histone deacetylase HDAC3 to the interferon-responsive element. *Mol Cell Biol* 22, 7439–7448.
- Liu, E., Cote, J.F., Vuori, K., 2003. Negative regulation of FAK signaling by SOCS proteins. *EMBO J* 22, 5036–5046.
- Mansell, A., Smith, R., Doyle, S.L., Gray, P., Fenner, J.E., Crack, P.J., Nicholson, S.E., Hilton, D.J., O'Neill, L.A., Hertzog, P.J., 2006. Suppressor of cytokine signaling 1 negatively regulates Toll-like receptor signaling by mediating Mal degradation. *Nat Immunol* 7, 148–155.
- Metcalf, D., Mifsud, S., Di Rago, L., Nicola, N.A., Hilton, D.J., Alexander, W.S., 2002. Polycystic kidneys and chronic inflammatory lesions are the delayed consequences of loss of the suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS-1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 943–948.
- Moorefield, K.S., Fry, S.J., Horowitz, J.M., 2004. Sp2 DNA binding activity and trans-activation are negatively regulated in mammalian cells. *J Biol Chem* 279, 13911–13924.
- Moorefield, K.S., Yin, H., Nichols, T.D., Cathcart, C., Simmons, S.O., Horowitz, J.M., 2006. Sp2 localizes to subnuclear foci associated with the nuclear matrix. *Mol Biol Cell* 17, 1711–1722.
- Naka, T., Narazaki, M., Hirata, M., Matsumoto, T., Minamoto, S., Aono, A., Nishimoto, N., Kajita, T., Taga, T., Yoshizaki, K., Akira, S., Kishimoto, T., 1997. Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature* 387, 924–929.
- Nelson, N., Marks, M.S., Driggers, P.H., Ozato, K., 1993. Interferon consensus sequence-binding protein, a member of the interferon regulatory factor family, suppresses interferon-induced gene transcription. *Mol Cell Biol* 13, 588–599.
- Ni, Z., Abou El Hassan, M., Xu, Z., Yu, T., Bremner, R., 2008. The chromatin-remodeling enzyme BRG1 coordinates CIITA induction through many interdependent distal enhancers. *Nat Immunol* 9, 785–793.
- Perkel, J.M., Atchison, M.L., 1998. A two-step mechanism for recruitment of Pip by PU.1. *J Immunol* 160, 241–252.
- Phan, D., Cheng, C.J., Galfione, M., Vakar-Lopez, F., Tunstead, J., Thompson, N.E., Burgess, R.R., Najjar, S.M., Yu-Lee, L.Y., Lin, S.H., 2004. Identification of Sp2 as a transcriptional repressor of carcinoma embryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 in tumorigenesis. *Cancer Res* 64, 3072–3078.
- Pine, R., Canova, A., Schindler, C., 1994. Tyrosine phosphorylated p91 binds to a single element in the ISGF2/IRF-1 promoter to mediate induction by IFN alpha and IFN gamma, and is likely to autoregulate the p91 gene. *EMBO J* 13, 158–167.
- Ryo, A., Suizu, F., Yoshida, Y., Perrem, K., Liou, Y.C., Wulf, G., Rottapel, R., Yamaoka, S., Lu, K.P., 2003. Regulation of NF-kappaB signaling by Pin1-dependent prolyl isomerization and ubiquitin-mediated proteolysis of p65/RelA. *Mol Cell* 12, 1413–1426.
- Saito, H., Morita, Y., Fujimoto, M., Narazaki, M., Naka, T., Kishimoto, T., 2000. IFN regulatory factor-1-mediated transcriptional activation of mouse STAT-induced STAT inhibitor-1 gene promoter by IFN-gamma. *J Immunol* 164, 5833–5843.
- Schluter, G., Boinska, D., Nieman-Seyde, S.C., 2000. Evidence for translational repression of the SOCS-1 major open reading frame by an upstream open reading frame. *Biochem Biophys Res Commun* 268, 255–261.
- Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T., Hume, D.A., 2004. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 75, 163–189.
- Sims, S.H., Cha, Y., Romine, M.F., Gao, P.Q., Gottlieb, G., Deisseroth, A.B., 1993. A novel interferon-inducible domain: structural and functional analysis of the human interferon regulatory factor 1 gene promoter. *Mol Cell Biol* 13, 690–702.
- Stark, G.R., Kerr, I.M., Williams, B.R., Silverman, R.H., Schreiber, R.D., 1998. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 67, 227–264.
- Starr, R., Willson, T.A., Viney, E.M., Murray, L.J., Rayner, J.R., Jenkins, B.J., Gonda, T.J., Alexander, W.S., Metcalf, D., Nicola, N.A., Hilton, D.J., 1997. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 387, 917–921.
- Tanaka, N., Kawakami, T., Taniguchi, T., 1993. Recognition DNA sequences of interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2, regulators of cell growth and the interferon system. *Mol Cell Biol* 13, 4531–4538.
- Travagli, J., Letourneur, M., Bertoglio, J., Pierre, J., 2004. STAT6 and Ets-1 form a stable complex that modulates SOCS-1 expression by IL-4 in keratinocytes. *J Biol Chem* 279, 35182–35192.
- Ungureanu, D., Saharinen, P., Juntila, I., Hilton, D.J., Silvennoinen, O., 2002. Regulation of Jak2 through the ubiquitin-proteasome pathway involves phosphorylation of Jak2 on Y1007 and interaction with SOCS-1. *Mol Cell Biol* 22, 3316–3326.
- Weisz, A., Marx, P., Sharf, R., Appella, E., Driggers, P.H., Ozato, K., Levi, B.Z., 1992. Human interferon consensus sequence binding protein is a negative regulator of enhancer elements common to interferon-inducible genes. *J Biol Chem* 267, 25589–25596.
- Yasukawa, H., Sasaki, A., Yoshimura, A., 2000. Negative regulation of cytokine signaling pathways. *Annu Rev Immunol* 18, 143–164.
- Yoshikawa, H., Matsubara, K., Qian, G.S., Jackson, P., Groopman, J.D., Manning, J.E., Harris, C.C., Herman, J.G., 2001. SOCS-1, a negative regulator of the JAK/STAT pathway, is silenced by methylation in human hepatocellular carcinoma and shows growth-suppression activity. *Nat Genet* 28, 29–35.

ARTICLE 2

Socs1 regulates E-cadherin membrane expression and cell invasion in colorectal cancer cells.

Lyne Valentino, Martine Letourneur, Jacques Bertoglio, and Josiane Pierre.

Manuscrit en cours de rédaction

Introduction

L'extinction de l'expression du gène *Socs-1* par hyperméthylation de l'ADN semble exister dans de très nombreuses tumeurs. Cela témoigne probablement de l'importante activité anti-tumorale de la protéine SOCS-1.

L'étude par PCR méthylation spécifique, des profils de méthylation de plusieurs gènes potentiellement impliqués dans la tumorigénèse colique de Lin et al. rapporte que l'expression du gène *Socs-1* est significativement réduite dans les tumeurs comparées aux tissus sains adjacents (Lin et al., 2004). Le phénotype CIMP (CpG Island Methylator Phenotype) décrit une catégorie de tumeurs colorectales présentant une hyperméthylation de plusieurs gènes. Ce phénotype semble associé à l'apparition de la plupart des cancers colorectaux sporadiques et à un risque accru de métastases lymphatiques (Shen and Issa, 2002). Une analyse quantitative des profils de méthylation menée sur 195 échantillons par Weisenberger et al. suggérait déjà que la méthylation du gène *Socs-1* serait caractéristique du phénotype CIMP (Weisenberger et al., 2006). De manière intéressante, ce résultat est confirmé par l'étude d'Ogino et al. menée sur 920 échantillons. Les auteurs confirment que le gène *Socs-1* fait parti des 8 meilleurs marqueurs du phénotype CIMP (Ogino et al., 2007).

Parallèlement, les travaux de Hanada et al. ont mis en évidence, *in-vivo*, l'implication de la protéine SOCS-1 dans la cancérogenèse colique. Dans cette étude, des souris déficientes pour le gène *Socs-1* (souris *Socs-1*^{-/-Tg}) ont été générées. Traités par l'IFN- γ , ces animaux développent spontanément des tumeurs colorectales avec des mutations du gène *p53* au bout de six mois (Hanada et al., 2006). Dans les macrophages et les cellules tumorales, une augmentation de l'expression des protéines de l'inflammation iNOS et COX-2 a aussi été observée. Ces altérations semblent être les conséquences d'une hyper phosphorylation du facteur STAT-1. Les auteurs suggèrent donc que l'action anti-tumorale du gène *Socs-1* intervienne dans un contexte inflammatoire. La protéine SOCS-1 inhiberait les effets de

l'IFN- γ produit par les macrophages en régulant l'activité du facteur de transcription STAT-1. Les résultats n'indiquent pas de fonction de la protéine SOCS-1 dans la cellule épithéliale. Pourtant, dans les cellules dérivées d'hépatocarcinomes et de mélanomes (dans lesquelles l'expression de *Socs-1* est inhibée par méthylation), la réexpression de la protéine SOCS-1 provoque une inhibition de l'activité du facteur de transcription STAT-3. Dans les cellules hépatiques, cette inhibition est associée à une diminution de la prolifération cellulaire et une réduction des capacités de pousse en absence de support (Yoshikawa et al., 2001). Dans les cellules A375 (dérivées d'un mélanome) les auteurs ont observé une diminution des capacités d'invasion et d'angiogénèse, corrélées à une diminution du niveau d'expression de la protéase MMP-2, et des facteurs FGF et VEGF. *In-vivo*, ces modifications se traduisent par une réduction de la fréquence d'apparition de métastases cérébrales (Huang et al., 2008). Donc, en dépit des données qui suggèrent fortement des effets inhibiteurs de la protéine SOCS-1 sur le développement tumoral, les mécanismes de cette régulation n'ont pas encore été clairement mis en évidence.

A l'aide de deux lignées cellulaires isogéniques (SW480 et SW620) dérivées d'un adénocarcinome colique, nous nous sommes intéressés au rôle de la protéine SOCS-1 dans la progression tumorale colique.

Principaux résultats

Dans les cellules SW620 (issues d'une métastase ganglionnaire), l'expression du gène *Socs-1* est réprimée par méthylation de l'ADN. Lorsque l'expression de la protéine SOCS-1 est rétablie, on observe une modification de la morphologie cellulaire ainsi qu'une diminution des capacités migratoires et invasives des cellules. Parallèlement, dans les cellules SW480 (issues de la tumeur primaire) où l'ADN du gène *Socs-1* n'est pas méthylé, la surexpression de la protéine n'entraîne aucun changement de morphologie. *In-vivo*, des résultats préliminaires semblent indiquer que la protéine SOCS-1 pourrait être à l'origine d'une diminution du volume des tumeurs.

Les transformations phénotypiques des cellules métastatiques s'accompagnent d'une réexpression de la E-cadherine à la membrane. Des analyses d'immunohistochimie ont permis de localiser la E-cadherine, dans les cellules SW620 parentales au niveau de vésicules cytoplasmiques positives pour les protéines Rab4 et Rab11.

La surexpression de la protéine SOCS-1 dans les cellules métastatiques provoque aussi une modification du profil d'expression des isoformes de la p120^{ctn}. Dans les cellules SW620-

SOCS-1, l'expression de l'isoforme p120^{ctn}1A est inhibée et l'expression de l'isoforme 3A sensiblement augmentée.

De manière intéressante, la ré-extinction de l'expression de la protéine SOCS-1 (dans les cellules SW620-SOCS-1) à l'aide de sh-RNA provoque un retour au phénotype parental. L'étude complémentaire de plusieurs clones dans lesquels l'expression de la protéine est plus ou moins inhibée a mis en évidence un « effet dose ». Les variations des niveaux d'expression de la protéine SOCS-1 donnant lieu à plusieurs phénotypes intermédiaires.

Conclusion

L'objectif de cette étude était d'évaluer le rôle de la protéine SOCS-1 dans la progression tumorale colique. Les observations consécutives à la réexpression de la protéine dans les cellules métastatiques SW620 suggèrent que la protéine SOCS-1 serait impliquée dans le contrôle de l'apparition du phénotype invasif des cellules tumorales. Néanmoins, des travaux chez la souris sont encore nécessaires pour comparer le pouvoir métastatique des cellules SW620 surexprimant la protéine SOCS-1 à celui des cellules parentales.

Les modifications phénotypiques subies par les cellules SW620-SOCS-1 s'accompagnent d'une réexpression de la E-cadherine à la membrane. Mais nous n'avons pas encore clairement identifié le mécanisme de cette réexpression. Des travaux récents rapportent l'implication de la protéine SOCS-1 dans le trafic post-golgien. Il serait donc envisageable que la protéine SOCS-1 puisse participer à l'acheminement de la E-cadherine à la membrane, et ce possiblement en régulant l'expression de la p120^{ctn}.

INTRODUCTION

Colorectal cancer is one of the most common cancers in industrialized countries. Multiple well characterized mutations are necessary for the development of colon cancer, concerning mutations in oncogenes and tumour suppressor genes such as APC, K-ras, DCC and p53 (Korinek et al., 1997). Epigenetic mechanisms are also implicated in human neoplasia and constitute a functionally mechanism equivalent to classical genetic alterations. Aberrant DNA methylation of CpG islands has been widely in human colorectal tumours and is associated with gene silencing. The expression of genes implicated in controlling cell cycle, DNA repair, cell adhesion and apoptosis is often modulated by hypermethylation (Esteller, 2002).

Recently it has been demonstrated that suppressor of cytokine signaling-1 (*socs1*) was frequently silenced by methylation of CpG island in human hepatocellular carcinoma (Yoshikawa et al., 2001). Methylation of *socs1* in tumours of colorectal cancer patients has been also described (Fujitake et al., 2004; Lin et al., 2004). More recent studies indicated that *socs1* gene methylation is mainly associated with CIMP1 subclasses of colon cancer (Shen et al., 2007).

Socs1 is a member of a family of proteins which has been mainly described as negative regulators of JAK/STAT signaling (Valentino and Pierre, 2006). *Socs1* is relatively specific to IFN- γ /STAT1 and IL-4/STAT6. Although SOCS1 deficient mice (*Socs1*^{-/-}) are normal at birth, they die within 3 weeks of age due multiorgans inflammation as the result of a deregulated IFN- γ and other inflammatory cytokine signaling (Kubo et al., 2003; Naka et al., 1998; Starr et al., 1998a). More recently an important role of SOCS1 in cancer development has been provided by (Hanada et al., 2006). These authors demonstrated that *socs1*-deficient mice in which transgenic SOCS1 was expressed in splenic T and B cells (*SOCS1*^{-/-}Tg mice) spontaneously developed colorectal carcinomas with nuclear β -catenin accumulation and p53 mutations at 6 months of age. The expression of iNOS and COX-2 in both macrophages and tumour cells was also considerably higher and seemed to be a consequence of high level of STAT1 tyrosine phosphorylation and activation. Altogether this pointed out the role of *socs1*, as one of the candidate tumour suppressor gene for inflammation-associated colon cancer.

Based on these studies we hypothesized that *socs1* gene inactivation might participate in colon cancer development.

We have chosen to study the importance of *socs* gene in colon cancer cell lines. Therefore we have chosen to examine the consequence of ectopic expression of *socs1* in two isogenic

cancer cell lines, SW480 and SW620 which constitute a model of colon cancer progression (Leibovitz et al., 1976). SW480 have an epithelioid morphology, while metastasis-derived SW620 cells have a fibroblast-like morphology (Hewitt et al., 2000). These two cell lines displayed considerable differences in the migration capacity (Kubens and Zanker, 1998).

In the present study, we reported that *socs1* expression is silenced by methylation in the two cell lines. Using the ectopic *socs1* expressing SW620 cells we demonstrated a role of *socs1* in the regulation of invasion and cell-cell junctions.

MATERIAL AND METHODS

Plasmids, Reagents and antibodies

The myc-tagged SOCS-1 expressing vector is a generous gift from Dr. Yoshimura (Yasukawa et al., 1999a). PLKO.1 lentiviral puromycine vector (TRCN0000067419) was purchased from Open Biosystem and used to silence mouse SOCS-1 expression.

Monoclonal anti-e-cadherin (clone36), anti-p120^{ctn} (clone 98) antibodies were from BD transduction laboratories). Monoclonal anti-e-cadherin (clone HECD1) antibody was a generous gift of Pierre Roux. Polyclonal anti- β -catenin (C2206) and polyclonal anti-socs1 were from Sigma and Immuno biological laboratories respectively.

The anti-rabbit Tag Myc (9E10) antibody was from Upstate, and antibodies used for immunofluorescence analysis were from Molecular probes (Molecular Probes, Eugene, Oreg) (Alexa Fluor anti-mouse 488 and anti-rabbit 546).

Immunohistochemistry

Paraffin-embedded tumors and normal tissue sample from colon cancer patient were from Super bio Chips (Tissu Array). Immunohistochemistry was performed using rabbit anti-SOCS-1 antibody from Santa Cruz as described previously (Li et al., 2004).

Stained sections were viewed and photographed.

Cell culture and transfections

SW480 (CCL-228), SW620 (CCL-227) and HaCaT cells were maintained in DMEM supplemented with 10% foetal calf serum (FCS) and 1mM sodium pyruvate.

Transfection was performed using JET-PEI reagent as previously described (Travagli et al., 2004).

RNA isolation and RT-PCR

Total RNA was extracted with Trizol (Life technologies, Gaithersburg, MD, USA) as described by the manufacturer and quantified at OD 260nm and further treated with DNase from Roche. 2 μ g of total cellular RNA was reverse-transcribed using an oligo dT primer and 2 units of AMV reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, USA) and then used as template for PCR. The specific primers used and PCR reactions were performed as described (Travagli et al., 2004). 1 μ l of RT was amplified with the *socs1* and *irf-1* specific primers and

GAPDH specific primers and analysed by real time PCR using a Light Cycler (Roche) Results obtained with *Socs-1* and *irf-1* specific primers were normalized against *gapdh*.

DNA isolation and Methylation specific PCR

A phenol-chloroform procedure was used to isolate genomic DNA from 10⁶ cells (Maniatis et al., 1982). The methylation status of *socs1* was analyzed by methylation specific PCR after bisulfite treatment of DNA by using the methyl detector kit (Active motif®). Briefly, 500 ng of DNA was treated by sodium bisulfite in presence of hydroquinone for 9h at 50°C. Modified DNA was desalted using the DNA purification resin and amplified with oligonucleotide specific for unmethylated or methylated DNA. Primers for nested PCR were designed to flank the potential gene region allowing amplification of both methylated and unmethylated DNA.

Oligos for nested PCR for *Socs-1*: 5'- GYG TGA AGA TGG TTT YGG GAT TTA (forward), 5'- RAA ATT AAA AAA AAT ACR AAC CAA ATT CTC (reverse)

The primers used in the second run of PCR for detection of unmethylated *Socs-1* DNA (190 bp) 5'-TTA TGA GTA TTT GTG TGT ATT TTT AGG TTG GTT (forward), 5'-ACA CTA ACA AAACAA CTC CTA CAA CAA CCA (reverse) and *Socs-1* methylated DNA (170 bp) 5'- TTC GCG TGT ATT TTT AGG TCG GTC (forward), 5'- CGA AAC AAC TCC TAC AAC GAC CG (reverse). PCR conditions used for all PCR: 5min at 94°C followed by 35 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 59°C, 1 min at 72°C and final extension at 72°C for 10 min.

Immunoblot analysis

Cells were lysed in a buffer containing 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 10mM NEN 10 µg/ml aprotinin, 5 µg/ml leupeptin. Cellular extracts were separated either directly or after immunoprecipitation with appropriate antibodies through 8% SDS-PAGE and proceeded for Western Blotting as described (Travagli et al., 2004)

Immunofluorescence analysis

Cells were seeded on poly- Lysine (Sigma) coated cover slides for 24h. Cells were then rinsed in PBS prior to fixation in 3% PFA, permeabilization in PBS-TritonX100 0.1%, saturation in PBS-BSA 5% and incubated with required antibodies. For labelling procedure primary antibodies were visualized by incubation with Alexa Fluor 488 or alexa fluor 546 conjugated anti species immunoglobulin G as indicated. After three wash in 1X PBS cover slides were mounted onto slide with Dako (Dakocytomation) 1% hoescht (to stain nuclei) and processed for immunofluorescence microscopy (Zeiss, Apotome).

Wound healing assay

Wounds were created in confluent cells using a pipette tip. Cells were then rinsed twice with serum free medium in order to remove any free-floating cells and debris. Serum free medium was then added and culture dishes incubated at 37°C. Wound healing was observed at 0, 24, 48 and 72 hours and photographed. Each experiment was duplicated and repeated three times.

MTT Assay

Cells were seeded at 5×10^3 cells/well in 96-well plates and cultured in 100 μ l DMEM-0,1% FBS. Triplicate culture wells were set up for each experiment. At day 1, 2, 3 and 10 μ l MTT dye solution (5mg/ml) was added to each well and samples were incubated at 37°C for 3 hours. At the end of the incubation period, medium was removed and 100 μ l of stop solution (0,04M HCl in absolute isopropanol) was added. After the complete dissolution of the converted dye, the absorbance was read at OD at 570 nm using 96-well plate reader.

Anchorage-independent growth

A total of 5000 cells was plated in 1ml of DMEM with 0,3% low-melting agarose and 10% FBS and overlaid onto 1ml/35 mm dish of DMEM with 0,5% agarose and 10% FBS. After two weeks, plates were photographed.

In vivo studies

All animal experiments were conducted by Dr Pocart (Inserm U965). Tumorigenicity was assessed by subcutaneous flank inoculation of 10^6 cells in 6-week-old female athymic nude mice. Animals were assessed for 3 weeks after inoculation. Six mice were used for each clone.

Invasion assay

Cells were suspended at 2×10^5 per well in 12 well matrigel precoated transwell filter plates (BD BioCoat Matrigel Invasion Chambers) in serum-free medium. Serum containing medium (10%) was used as the chemo-attractant in the lower chamber. After 72h of incubation, cells that have invaded to the lower surface of the matrigel-coated membrane were fixed with 100% methanol, stained with toluidine blue and counted in 5 randomly selected fields under a light microscope. Data are expressed as mean \pm SD of at least 3 individual experiments.

LEGEND OF FIGURE:

FIGURE 1:

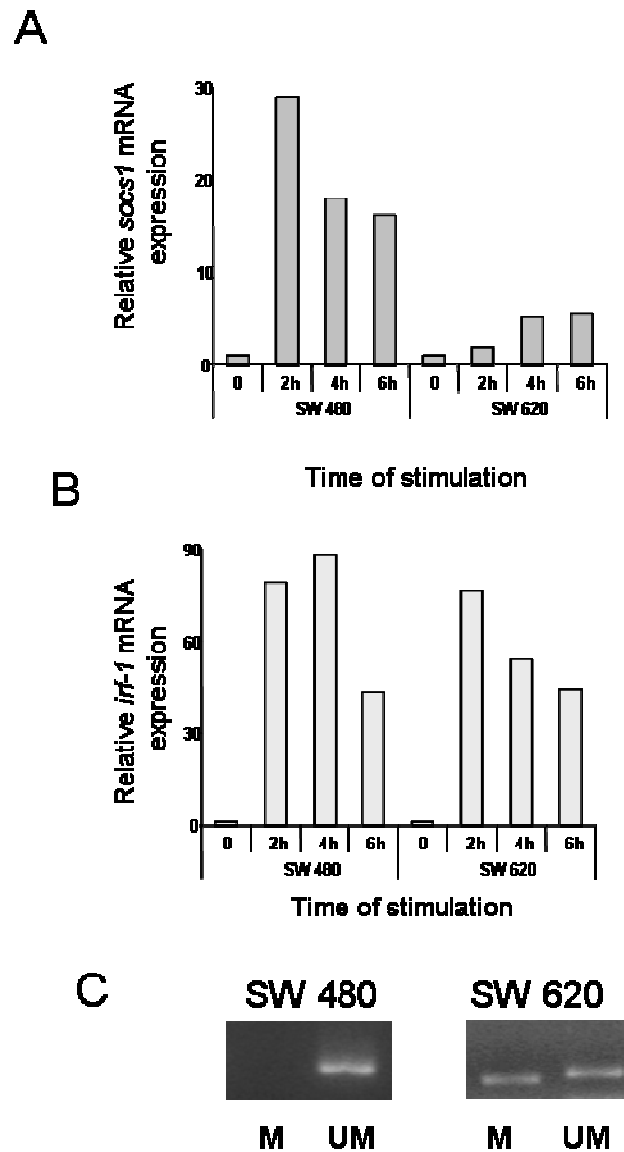


Figure 1: IFN-mediated *Socs1* induction in the colon cell lines SW480 and SW620

(A-B) Serum-starved SW620 or SW480 cells were stimulated for the indicated time with IFN- γ . Expression of *socs1* (A) or *irf-1*(B) mRNA relative to *gapdh* mRNA was determined by real time RT-PCR. The depicted graph is representative of an experiment that was replicated more than three times.

(C) Methylation specific PCR analysis of SW480 and SW620 cell lines. Visible bands in ‘U’ lanes are unmethylated 190 bp DNA products with unmethylated specific primers and those in ‘M’ lanes are methylated 170 bp DNA products with methylation specific primers.

FIGURE 2:

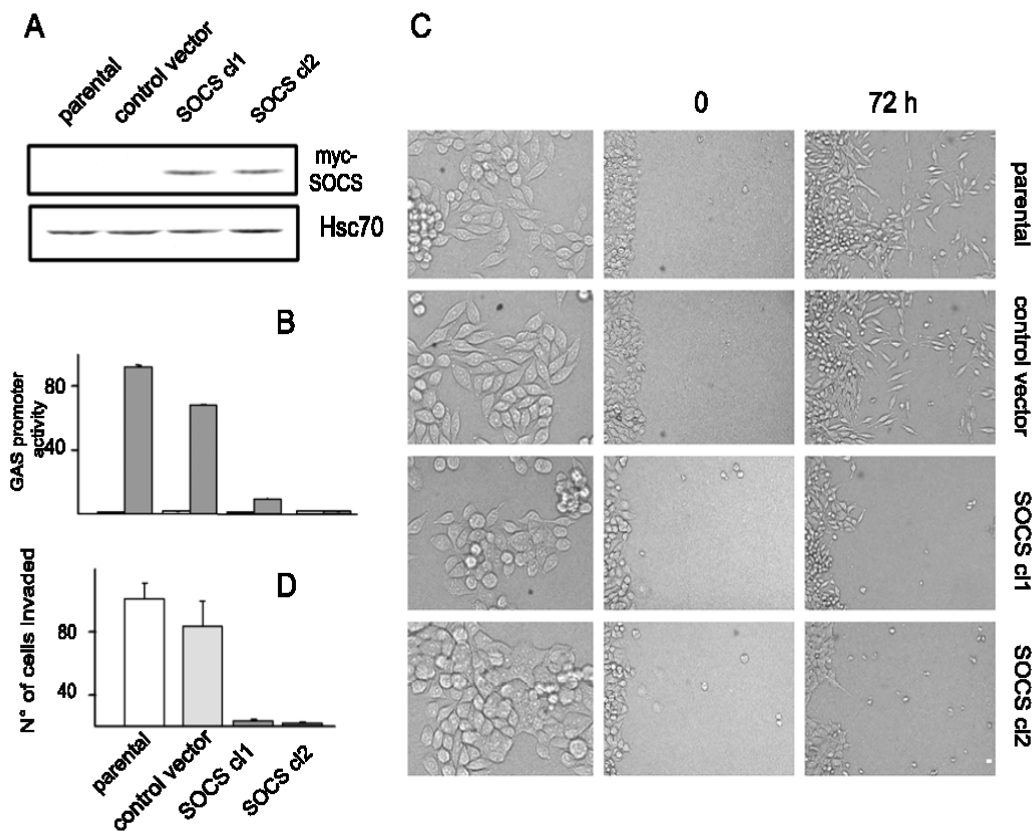


Figure 2: Consequences of overexpression of *socs1* in the metastatic colon SW620 cell line. (A) Immunoblot analysis for the expression of SOCS1 in SW620 cells, SW620^{control} and two independently selected clones of SW620 SOCS expressing cells. The expression of ectopic SOCS protein was visualized with anti-SOCS1 antibodies and migrated as a 31 kD protein. Hsc70 was used as control for protein loading. (B) SW620^{control} or SW620^{SOCS} cells were transfected with 3 μ g of GAS reporter plasmid and then stimulated or not with 10³ U/ml of IFN- γ for 6 h and analysed for GAS promoter activity. (C) Representative phase-contrast images of monolayer cultures of different SW620 cells (left). Representative photomicrographs of cell migration by monolayer wound- healing assay using the different SW620 cells. Photomicrographs were obtained 0 and 72 hours after scrape wounding, as described in material and methods. (D) A cell invasion assay was performed using 24-well transwells coated with matrigel. After 72h of plating, cells that invaded the coated membrane were fixed and counted.

FIGURE 3:

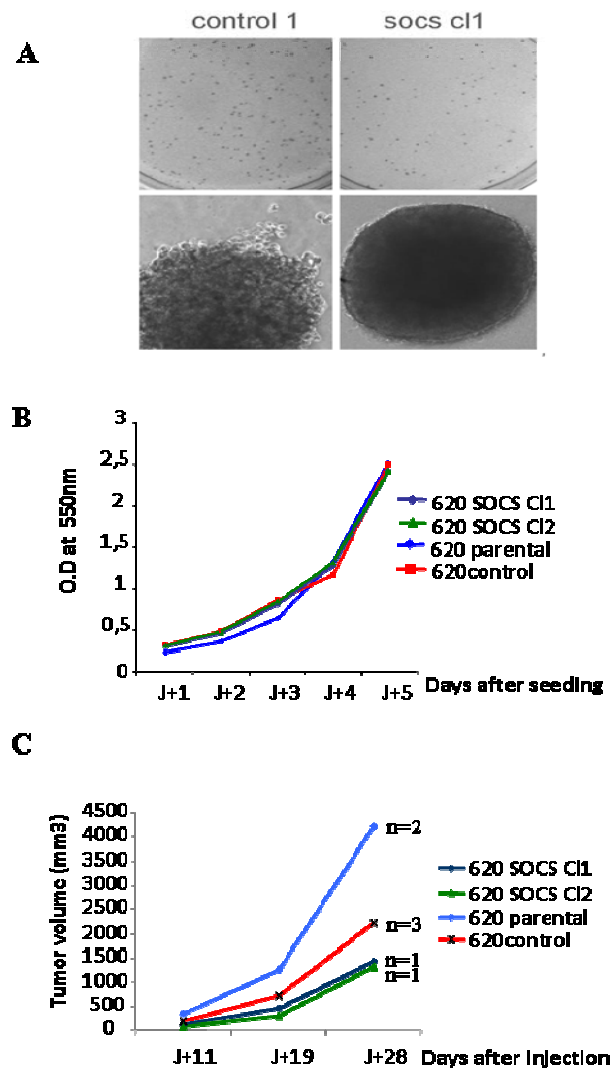


Figure 4: Effect of modulation of socs-1 expression on proliferation, anchorage-independent-growth and tumor xenograft

(A) Result of soft agar assay. Experiment was performed as described in Methods. Photographs were taken 2 weeks after seeding (upper). Difference in clone morphology is observable at high magnification (lower) **(Preliminary result)** (B) Cellular proliferation was measured in SW620^{control}, SW620^{socs}, and in parental cells using MTT assay. (C) Flank tumor xenografts after subcutaneous injection were monitored for SW620^{control}, parental cells and the two SW620^{socs} clones in nude mice. **(Preliminary result, initially n = 6 mice per group).**

FIGURE 4:

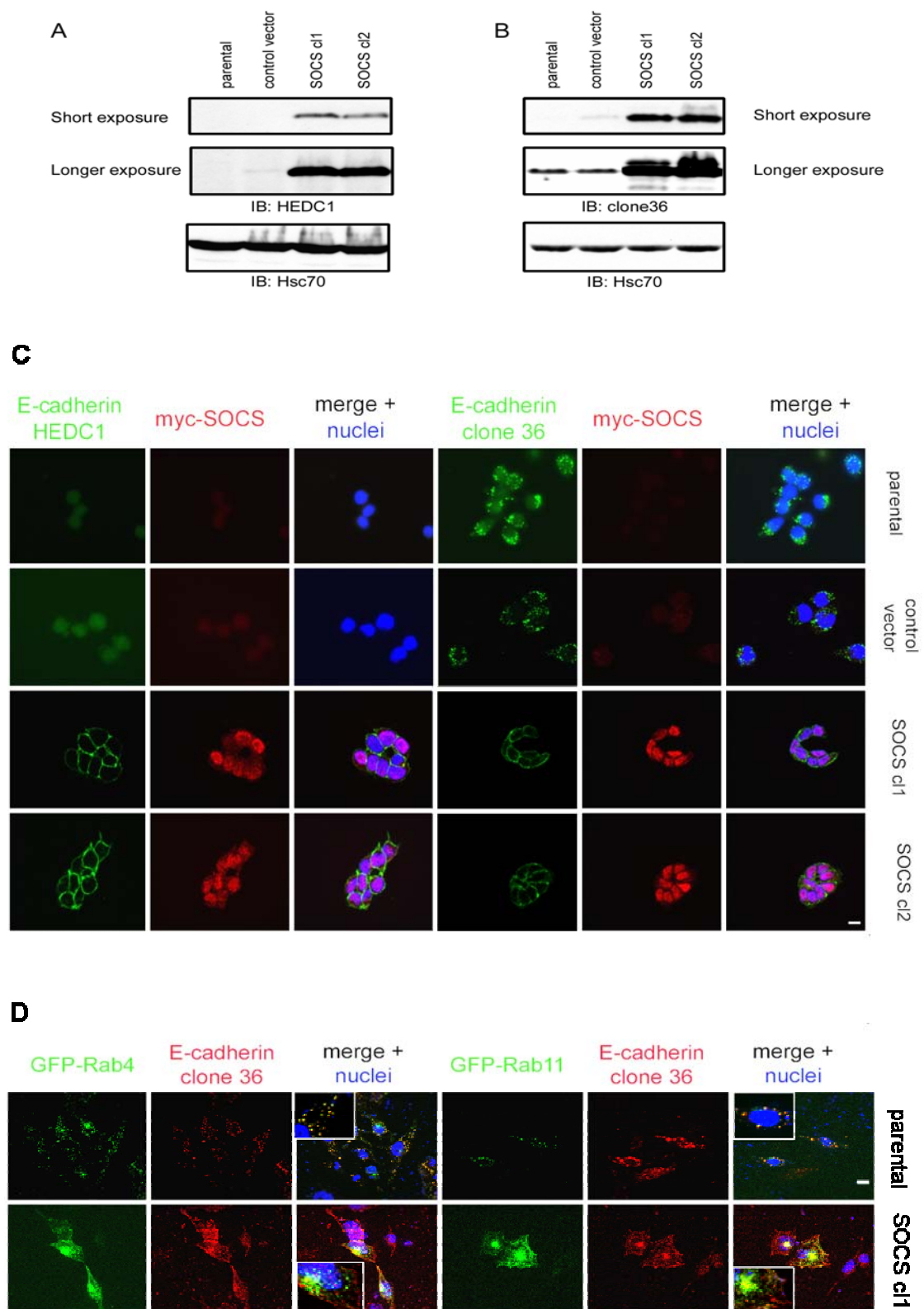


Figure 4: Effect of ectopic SOCS1 expression in the metastatic SW620 cells

(A and B) Western Blot analysis of SW620 cells stably expressing SOCS1 protein. Equal amounts of total protein were subjected to immunoblot using anti-e cadherin HEDC1 antibodies (A) and anti E-cadherin (clone 36) antibodies (B). Hsc70 was used as control protein loading in both conditions. (C) Co-immunofluorescence localization of E-cadherin (using either HEDC1 or clone 36 antibodies) and SOCS1 (with a myc-tagged antibody) in different SW620 cells. (D) E-cadherin (clone36, *red*) localisation was compared with transiently expressed GFP-Rab4 (*green*) or GFP-Rab 11 (*green*). Bars are 10 μ m (C-D). Insets in (D) show high-magnification images of the regions of the cell.

FIGURE 5:

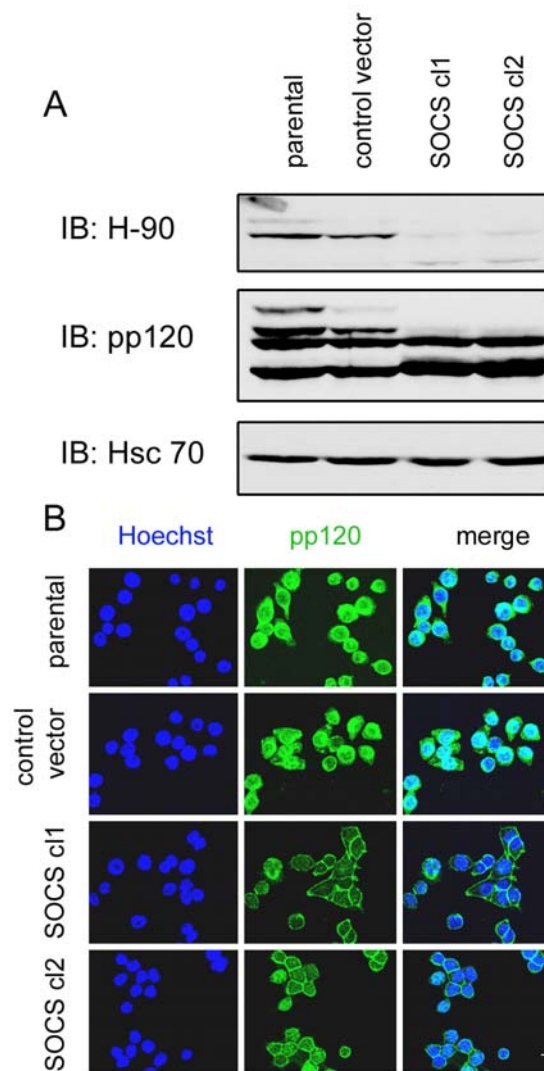


Figure 5: Consequence of SOCS1 expression on p120 ctn isoforms and localization

(A) p120^{ctn} isoforms expression was studied in cellular extracts from SW60WT , SW620^{control} , and SW620 SOCS expressing cells. Immunoblotting was performed with p120^{ctn} antibodies directed against isoform 1 (H-90) or all p120^{ctn} protein isoforms (pp120).

(B) Immunofluorescence localisation of p120 proteins using pp120 antibodies.

FIGURE 6:

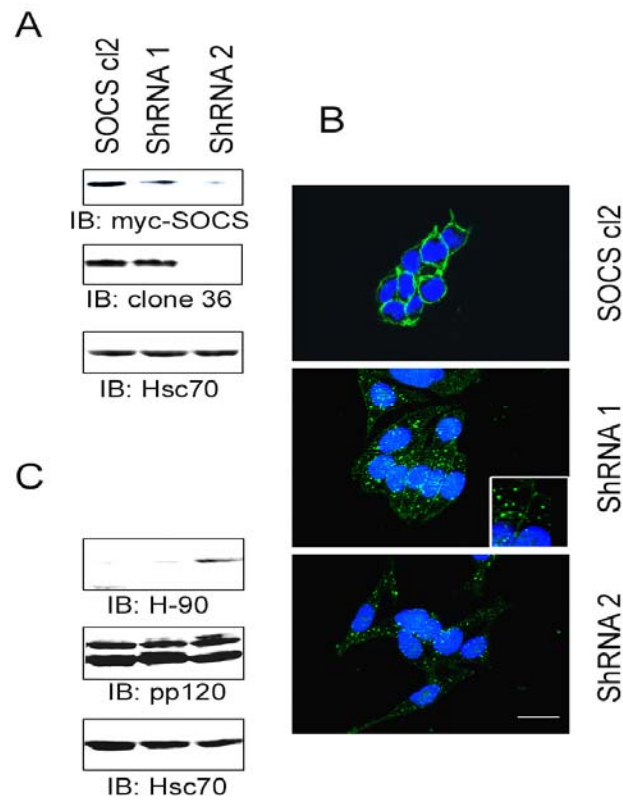


Figure 6: Effects of ShRNA-based inhibition of SOCS1 expression in SW620^{SOCS} c12 cells on E-cadherin expression.

(A) Western blot analysis of SW620^{SOCS} c12 cells stably expressing socs1 siRNA (SW620^{shRNA} cells). Equal amounts of total protein were subjected to immunoblot analysis using a anti-myc or a anti-Ecadherin antibody (clone 36). (C) The same lysates were subjected to immunoblot analysis using anti-p120^{ctn} antibodies. (B) Immunofluorescence localization of E-cadherin in SW620^{shRNA} c11 and SW620^{shRNA} c12 clones compared to the SOCS expressing SW620^{SOCS} c12 cell line.

RESULTS

Correlation of methylation of Socs1 DNA and absence of Socs1 induction in SW620 cells

We analysed the IFN mediated expression of two early responsive genes, *socs1* and *irf-1*, in the two isogenic colon carcinoma cells lines, derived from primary (SW480) and metastatic lesions (SW620) of a single colon cancer patient (Hewitt et al., 2000). As shown in figure 1A *socs1* mRNA appeared after two hours of stimulation and slightly decreased thereafter in the IFN-stimulated SW480 cell lines. In the SW620 cells we observed a barely detectable IFN-induced *socs1* mRNA expression. The maximal level observed is 5-6 folds less than that observed in SW480 cells. In contrast, in the two cell lines we observed a rapid induction of *irf-1* which remains detectable for at least 6 hours (figure 1B). Thus, the difference in activation of Socs1 was not attributable to a defect of IFN signal transduction pathway in these cells.

Methylation of *socs1* CpG island has been previously shown in some colon cancer cells (Fujitake et al., 2004; Lin et al., 2004; Yoshikawa et al., 2001) and in human hepatocellular carcinoma cell lines. In majority of cases a correlation of methylation of Socs1 CpG island and silencing has been described (Yoshikawa et al., 2001). We therefore analysed the methylation status of *socs1* gene by methylation specific PCR analysis (MSP) in the two cell lines using a set of primers design in exon II (Yoshikawa et al., 2001). Methylated PCR products were only observed in SW620 colorectal tumour cell lines but not in SW480 cell line (figure 1C). This epigenetic silencing of *socs1* in SW620 cell lines is consistent with the observed lack of IFN-mediated *socs1* induction.

To further confirm the results demethylation was done by culture with 5-azacytidine, a drug known to remove methyl group from the nucleotides. A 15mM 5-azacytidine treatment completely demethylated *socs1* and restored IFN responsiveness of *socs1* expression in SW620 cells (data not shown). Thus, results indicate that the inhibition of the IFN induced expression of Socs-1 in SW620 cell line correlates with methylation of the *socs-1* gene.

Socs1 is important for invasive properties of SW620 cells

Previously it has been shown that *socs1* is one of the candidate tumour suppressor genes for inflammation-associated colon cancer (Hanada et al., 2006). However, the precise molecular function of SOCS1 in cancer development is unknown. To determine whether *socs1* has a causal role in colon tumour progression and invasion, we manipulated the expression levels of

socs1 in the two isogenic cell lines SW480 and SW620. After neomycin selection we have isolated several clones expressing SOCS-1 protein and we have chosen to further investigate the biochemical and cellular function in two cell clones (SW620^{SOCS}c11 and SW620^{SOCS}c12) in comparison to the parental cells (SW620^{parental}) and to SW620 cells transfected with empty vector (SW620^{control}). The myc-tagged transfected SOCS1 protein migrated as 31 kD protein (Figure 2A).

Because SOCS1 inhibit cytokine responses and activation of the JAK/STAT pathway, we then addressed the question if over expressed SOCS1 in SW620 cell affect IFN- γ induced GAS-mediated regulation of a reporter luciferase promoter. This was assayed using a highly responsive STAT1-luciferase reporter gene containing five copies of STAT binding sites derived from the β -casein gene promoter (Moriggl et al., 1996). IFN treatment activated the β -casein constructs by 100 fold in extracts of SW620^{parental} and in SW620^{control} cells. SOCS1 was highly inhibitory toward IFN- γ induction of this reporter activity, which represented only 10% and 2% of the control experiment for the extracts of the SW620^{SOCS}c11 and SW620^{SOCS}c12 respectively (figure 2B).

In standard 2D cell culture (i.e., on plastic or glass) the morphologies induced by *socs1* expression differed markedly from the parental cell lines. The SW620^{parental} and SW620^{control} cell morphology appeared fibroblastoid in monolayer, whereas SW620^{SOCS} cells showed epithelial appearance and tended to form multicellular aggregates like the SW480 cells. In contrast overexpression of *socs1* in SW480, although the level of ectopic SOCS1 expression was similar to those observed in SW620 cells, no modification of cellular morphology was observed (data not shown). We then examined consequences of *socs1* expression in the two clones SW620^{SOCS}. A monolayer wound healing assay revealed almost no migration in SOCS expressing cells compared to parental and control cells (figure 2C). The two clones performed identically in this assay. In addition, using a Boyden chamber invasion assay, we observed a significant decrease in the invasion capacity of SOCS expressing cells (Figure 2D)

Socs-1 involvement in tumor growth

Based on previous results obtained in hepatocarcinoma derived cell lines (Yoshikawa et al., 2001), we postulated that SOCS-1 expression could affect tumor growth.

We first investigated the effect of the ectopic expression of *socs-1* on the rate of cellular proliferation. Tetrazolium salt (MTT) assay did not reveal any significant difference in cellular proliferation due to SOCS-1 expression (figure 3B). On the other hand, SW620^{SOCS}

cells demonstrated a decrease in number of colonies formed compared to SW620^{control} cells when cultured in soft agarose (figure 3A). For *in-vivo* study, cells from each group (SW620^{parental}, SW620^{control}, SW620^{SOCS}c11, and SW620^{SOCS}c12) were injected subcutaneously into the flanks of nude mice (n=6 for each group). By 4 weeks after injection, mice injected with the SW620^{SOCS} cells present smaller tumor volumes than animals injected with parental or control cells (figure 3C).

Socs1 regulates E-cadherin expression

Western blot analysis and immunofluorescence indicated that ectopic expression of *socs1* in SW620 cells increases E-cadherin expression. We have examined the E-cadherin protein expression by using mouse monoclonal antibodies directed against the extracellular domain of E-cadherin (HEDC1) as shown in figure 4A. E-cadherin was only observed in the SOCS expressing cells, even after a long exposure. In contrast, when using another monoclonal antibody directed against the cytoplasmic domain of human E-cadherin (clone 36), we observed a slight expression of E-cadherin which is dramatically enhanced in the SOCS expressing cells (figure 4B). To determine whether SOCS1 expression participates into a direct or indirect E-cadherin mRNA expression, we prepared total RNA from SW620 parental, SW620^{control vector} and the two SW620^{SOCS} clones and subjected it to real time RT-PCR analysis. We found that *SOCS1* expression did not modify E-cadherin mRNA expression compared to parental and control transfected cells (not shown). In addition no modification of E-cadherin promoter activity was observed in all the cells. Interestingly, mRNA expression levels of Snail or Slug, which are known to be involved in transcriptional repression of E-cadherin, were not affected by *Socs1* expression (Cano et al., 2000). Altogether these observations led us to eliminate a transcriptional regulation of E-cadherin expression.

SOCS-1 expression in SW620wt modified the intracellular pool of E-Cadherin

Immunofluorescence studies revealed that mostly the *SOCS1* expression was restricted to the nucleus. Increasing the exposure time during image acquisition revealed that SOCS1 was also expressed in low amounts within the cytoplasm (not shown). Western blot analysis revealed that ectopic SOCS1 protein is observed both in the nucleus and in the cytoplasm of the transfected cells. Nuclear localization sequence has been described in SOCS1 has been previously described leading to a nuclear accumulation when the protein is overexpressed (Dalpke et al., 2008; Lee et al., 2008).

Immunofluorescence studies, with HECD1, revealed a honeycomb pattern of E-cadherin at sites of cell-cell contact in all SW620^{socs1} clones, whereas no signal was observed with the SW620 and SW620^{control} cells (Figure 4C, left). Immunofluorescence studies with E-cadherin (clone 36) antibodies indicated that E-cadherin was seen intracellular in a punctuate, vesicular pattern in the cytoplasm in SW620 parental and SW620^{control vector} cells, whereas in the SW620^{socs} staining of endogenous E-cadherin appeared mostly at the cell surface, with some remaining of intracellular vesicles (Figure 4C, right).

E-cadherin colocalizes with recycling endosomes in SW620 wt cell lines

Numerous studies have indicated that cadherin function is a dynamic process (Le et al., 1999). The pool of E-cadherin undergoing endocytosis and recycling is markedly increased in cells without stable cell-cell contacts. In epithelial cells E-cadherin endocytosis and recycling proceeds via the rab compartment and exhibits 'short loop kinetics. Rab4 regulates traffic from early endosomes and recycling endosomes to the plasma membrane (van der Sluijs et al., 1992), whereas rab11 controls transport from early endosomes to recycling endosomes (Casanova et al., 1999; Ren et al., 1998). For these reasons we have examined the localisation of E-cadherin with these two GTPases in the SW620WT and SOCS1 expressing cells. As shown in figure 4D immunofluorescence studies indicates that in the parental cell lines we observed a colocalization of E-cadherin with rab4 and rab11, indicating that in the SW620 E-cadherin is mainly observed with the early and recycling endosomes. In addition in these cells no localization with Rab7, a late endosome-/lysosome-associated small GTPase, is observed (data not shown). These observations indicated that E-cadherin is only observed in the recycling compartment of the cells.

In contrast when the same experiment was performed in the SOCS1 expressing, there are no colocalization of E-cadherin with rab4 and rab11 indicating that the traffic of E-cadherin is dramatically increased.

Expression of p120ctn isoforms in parental and SOCS1 expressing cells

P120-catenin (p120ctn), a member of the Armadillo gene family, has emerged as a master regulator of cadherin stability (Ireton et al., 2002) Different isoforms of p120-catenin (p120ctn), are variably expressed in different tissues as a result of alternative splicing and the use of multiple translation initiation codons. When expressed in cancer cells, these isoforms may confer different properties with respect to cell adhesion and invasion (Anastasiadis et al., 2000; Davis et al., 2003) Previous works have shown that p120 ctn isoforms are expressed in

a cell type specific manner. To investigate p120ctn expression, we used two antibodies that recognize either a C-terminal epitope shared between all known p120ctn isoforms (BD/pp120) or an epitope exclusive to the longest p120ctn isoform (H-90). As shown in figure 5A, the Mab BD/pp120 recognized four major p120 bands in the parental and control cell lines, in contrast the two SOCS1 expressing clones expressed mainly band 3 and 4. In addition band 4 appeared to be tightly spaced doublet reflecting probably the result of post translational modifications. The antibody raised against an epitope near the N-terminus of isoform 1A of p120 detected a single band in both SW620 parental and - control vector but not in extracts from both SOCS1 expressing cells. This finding confirms that the expression of p120ctn isoform 1 is mainly observed in mesenchymal cell lines (Aho et al., 2002). Immunohistochemical analysis of the cells revealed distinct staining patterns. Whereas the Mab strongly and uniformly stained cytoplasm, a cell-cell adhesion junctions staining was observed in SOCS-1 expressing cells (figure 5B).

Ectopic expressed SOCS1 is responsible for membrane E-cadherin expression.

In experiments complementary to the overexpression studies, we used small hairpin RNA (shRNA) oligonucleotide-based inhibition of gene expression to show that SOCS-1 is directly implicated in the previous observation. Socs1 shRNA were stably transfected into SW620 SOCS cl2 as described in materials and methods. Two clones SW620 SOCS -ShRNA 1 and - ShRNA 2, exhibiting different levels of inhibition of SOCS1 protein expression as determined by Western Blot analysis, were selected for further study (figure 6A IB myc-SOCS). As shown in figure 6A (IB: clone 36) the level of E-cadherin expression followed the modification of SOCS1 expression level. This modification of SOCS1 level is also accompanied by a modification of E-cadherin traffic visualized by reappearance of vesicles of E-cadherin accumulation (figure 6B). This transformation is associated with the reappearance of the p120ctn isoform 1A in western-blot analysis (figure 6C).

REFERENCES

- Aho, S., Levansuo, L., Montonen, O., Kari, C., Rodeck, U., and Uitto, J. (2002). Specific sequences in p120ctn determine subcellular distribution of its multiple isoforms involved in cellular adhesion of normal and malignant epithelial cells. *J Cell Sci* *115*, 1391-1402.
- Anastasiadis, P. Z., and Reynolds, A. B. (2000). The p120 catenin family: complex roles in adhesion, signaling and cancer. *J Cell Sci* *113 (Pt 8)*, 1319-1334.
- Baetz, A., Koelsche, C., Strebovsky, J., Heeg, K., and Dalpke, A. H. (2008). Identification of a nuclear localization signal in suppressor of cytokine signaling 1. *Faseb J* *22*, 4296-4305.
- Cano, A., Perez-Moreno, M. A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M. J., del Barrio, M. G., Portillo, F., and Nieto, M. A. (2000). The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* *2*, 76-83.
- Casanova, J. E., Wang, X., Kumar, R., Bhartur, S. G., Navarre, J., Woodrum, J. E., Altschuler, Y., Ray, G. S., and Goldenring, J. R. (1999). Association of Rab25 and Rab11a with the apical recycling system of polarized Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell* *10*, 47-61.
- Davis, M. A., Ireton, R. C., and Reynolds, A. B. (2003). A core function for p120-catenin in cadherin turnover. *J Cell Biol* *163*, 525-534.
- Esteller, M. (2002). CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* *21*, 5427-5440.
- Fujitake, S., Hibi, K., Okochi, O., Kodera, Y., Ito, K., Akiyama, S., and Nakao, A. (2004). Aberrant methylation of SOCS-1 was observed in younger colorectal cancer patients. *J Gastroenterol* *39*, 120-124.
- Hanada, T., Kobayashi, T., Chinen, T., Saeki, K., Takaki, H., Koga, K., Minoda, Y., Sanada, T., Yoshioka, T., Mimata, H., *et al.* (2006). IFN γ -dependent, spontaneous development of colorectal carcinomas in SOCS1-deficient mice. *J Exp Med* *203*, 1391-1397.
- Hewitt, R. E., McMarlin, A., Kleiner, D., Wersto, R., Martin, P., Tsokos, M., Stamp, G. W., and Stetler-Stevenson, W. G. (2000). Validation of a model of colon cancer progression. *J Pathol* *192*, 446-454.
- Ireton, R. C., Davis, M. A., van Hengel, J., Mariner, D. J., Barnes, K., Thoreson, M. A., Anastasiadis, P. Z., Matrisian, L., Bundy, L. M., Sealy, L., *et al.* (2002). A novel role for p120 catenin in E-cadherin function. *J Cell Biol* *159*, 465-476.
- Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* *87*, 159-170.
- Kubens, B. S., and Zanker, K. S. (1998). Differences in the migration capacity of primary human colon carcinoma cells (SW480) and their lymph node metastatic derivatives (SW620). *Cancer Lett* *131*, 55-64.
- Kubo, M., Hanada, T., and Yoshimura, A. (2003). Suppressors of cytokine signaling and immunity. *Nat Immunol* *4*, 1169-1176.
- Le, T. L., Yap, A. S., and Stow, J. L. (1999). Recycling of E-cadherin: a potential mechanism for regulating cadherin dynamics. *J Cell Biol* *146*, 219-232.
- Lee, K. H., Moon, K. J., Kim, H. S., Yoo, B. C., Park, S., Lee, H., Kwon, S., Lee, E. S., and Yoon, S. (2008). Increased cytoplasmic levels of CIS, SOCS1, SOCS2, or SOCS3 are required for nuclear translocation. *FEBS Lett* *582*, 2319-2324.
- Leibovitz, A., Stinson, J. C., McCombs, W. B., 3rd, McCoy, C. E., Mazur, K. C., and Mabry, N. D. (1976). Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res* *36*, 4562-4569.
- Lin, S. Y., Yeh, K. T., Chen, W. T., Chen, H. C., Chen, S. T., Chiou, H. Y., and Chang, J. G. (2004). Promoter CpG methylation of tumor suppressor genes in colorectal cancer and its relationship to clinical features. *Oncol Rep* *11*, 341-348.

Maniatis, T., Fritsch, E., and Sambrook, J. (1982). *Molecular Cloning : A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor NY.

Moriggl, R., Gouilleux-Gruart, V., Jahne, R., Berchtold, S., Gartmann, C., Liu, X., Hennighausen, L., Sotiropoulos, A., Groner, B., and Gouilleux, F. (1996). Deletion of the carboxyl-terminal transactivation domain of MGF-Stat5 results in sustained DNA binding and a dominant negative phenotype. *Mol Cell Biol* *16*, 5691-5700.

Naka, T., Matsumoto, T., Narazaki, M., Fujimoto, M., Morita, Y., Ohsawa, Y., Saito, H., Nagasawa, T., Uchiyama, Y., and Kishimoto, T. (1998). Accelerated apoptosis of lymphocytes by augmented induction of Bax in SSI-1 (STAT-induced STAT inhibitor-1) deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 15577-15582.

Ren, M., Xu, G., Zeng, J., De Lemos-Chiarandini, C., Adesnik, M., and Sabatini, D. D. (1998). Hydrolysis of GTP on rab11 is required for the direct delivery of transferrin from the pericentriolar recycling compartment to the cell surface but not from sorting endosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 6187-6192.

Shen, L., Toyota, M., Kondo, Y., Lin, E., Zhang, L., Guo, Y., Hernandez, N. S., Chen, X., Ahmed, S., Konishi, K., *et al.* (2007). Integrated genetic and epigenetic analysis identifies three different subclasses of colon cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 18654-18659.

Starr, R., Metcalf, D., Elefanty, A. G., Brysha, M., Willson, T. A., Nicola, N. A., Hilton, D. J., and Alexander, W. S. (1998). Liver degeneration and lymphoid deficiencies in mice lacking suppressor of cytokine signaling-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 14395-14399.

Travagli, J., Letourneur, M., Bertoglio, J., and Pierre, J. (2004). STAT6 and Ets-1 form a stable complex that modulates SOCS-1 expression by IL-4 in keratinocytes. *J Biol Chem* *279*, 35182-35192.

Valentino, L., and Pierre, J. (2006). JAK/STAT signal transduction: Regulators and implication in hematological malignancies. *Biochem Pharmacol* *71*, 713-721.

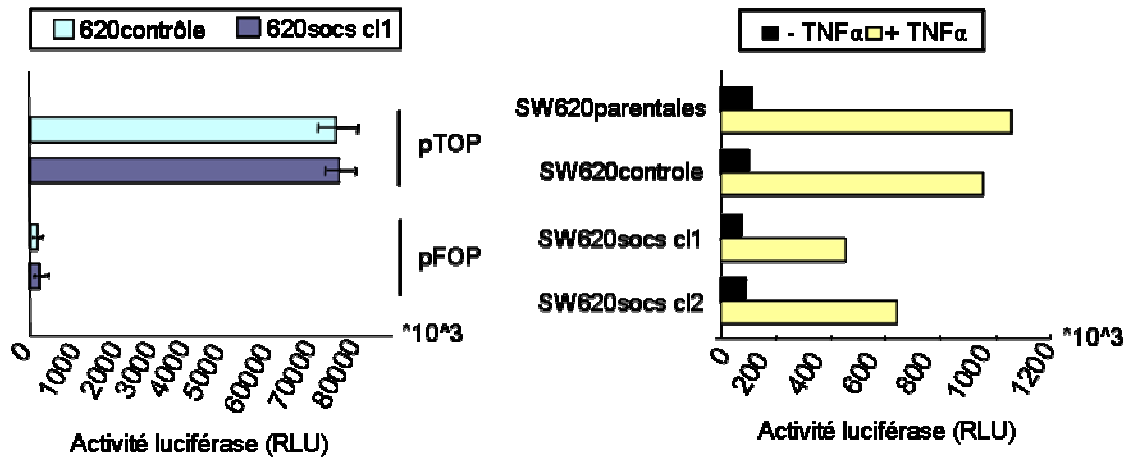
van der Sluijs, P., Hull, M., Webster, P., Male, P., Goud, B., and Mellman, I. (1992). The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway. *Cell* *70*, 729-740.

Yasukawa, H., Misawa, H., Sakamoto, H., Masuhara, M., Sasaki, A., Wakioka, T., Ohtsuka, S., Imaizumi, T., Matsuda, T., Ihle, J. N., and Yoshimura, A. (1999). The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *Embo J* *18*, 1309-1320.

Yoshikawa, H., Matsubara, K., Qian, G. S., Jackson, P., Groopman, J. D., Manning, J. E., Harris, C. C., and Herman, J. G. (2001). SOCS-1, a negative regulator of the JAK/STAT pathway, is silenced by methylation in human hepatocellular carcinoma and shows growth-suppression activity. *Nat Genet* *28*, 29-35.

RESULTATS COMPLEMENTAIRES

Effet de la surexpression de la protéine SOCS-1 sur les voies de signalisation Wnt/ β -catenine et NF κ B



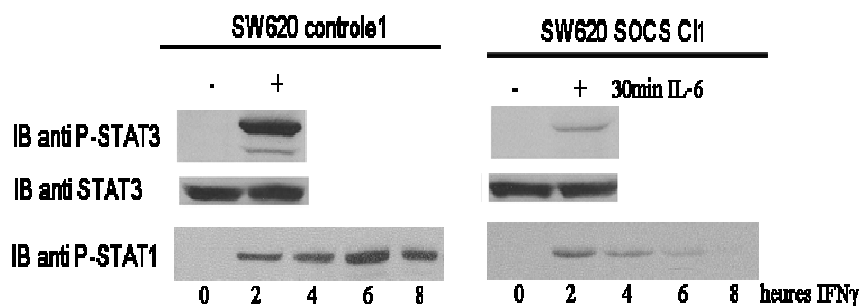
Les voies de signalisation Wnt/ β -catenine et NF κ B ont un rôle majeur dans la carcinogenèse colorectale. L'activation de la voie NF κ B dans les stades tardifs serait associée à la diminution de l'expression de la E-cadherine et à l'invasion tumorale ; Alors que dans la majorité des tumeurs coliques, des mutations du gène *Apc* sont à l'origine d'une accumulation nucléaire de la β -catenine et d'une dérégulation de l'expression de nombreux gènes impliqués dans la prolifération et la migration cellulaires.

Des études rapportent que dans les cellules SW480, la E-cadherine est à l'origine d'une inhibition de la signalisation β -catenine/TCF-Lef (Gottardi et al., 2001). Lors d'expériences d'immunofluorescence, nous avons observé que la réexpression de la E-cadherine dans les clones SW620^{SOCS} était accompagnée d'une relocalisation partielle de la β -catenine à la membrane. Nous avons alors émis l'hypothèse qu'une diminution de la quantité de β -catenine nucléaire pourrait expliquer les modifications phénotypiques observées dans les cellules surexprimant la protéine SOCS-1. Pour explorer cette possibilité, nous avons transfecté dans nos cellules les plasmides rapporteurs pTOPflash et pFOPflash. Ces derniers comportant respectivement des éléments de réponse TCF natifs ou mutés suivis par un gène codant pour la luciférase. Une forte activité transcriptionnelle est obtenue avec le plasmide pTOPflash dans les cellules contrôles. Mais cette activité n'est pas inhibée dans les cellules SW620^{SOCS}. Une analyse complémentaire d'extraits cytoplasmiques et nucléaires par western-blot indique qu'une grande quantité de β -catenine demeure dans le noyau des cellules SW620^{SOCS}. Ces résultats laissent penser que la relocalisation partielle de la β -catenine à la membrane dans les

cellules SW620^{SOCS} ne serait donc pas un événement majeur responsable de leur transformation phénotypique.

Parallèlement, nous avons mesuré l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription NFκB. plusieurs études rapportent en effet un rôle régulateur de la protéine SOCS-1 sur l'activation de ce facteur. Il a par exemple été observé que des MEFs *Socs1*^{-/-} sont plus sensibles au TNF-α que les cellules sauvages (Alexander and Hilton, 2004). Pour évaluer l'activité du facteur NFκB dans nos cellules, nous avons mesuré l'activité transcriptionnelle d'un plasmide rapporteur comportant 3 éléments de réponse consécutifs en amont du gène codant pour la luciférase. Comme le montre le graphique (à droite), l'expression de la protéine SOCS-1 ne modifie pas significativement l'activité transcriptionnelle basale du facteur NFκB. Par contre, elle semble diminuer l'activation de la transcription en réponse à une stimulation par le TNF-α (résultat d'une expérience représentative). Cette observation suggère qu'en présence de la protéine SOCS-1 certains effets du TNF-α ou plus globalement du facteur NFκB pourraient être inhibés.

Les facteurs de transcription STAT-1 et STAT-3 ne sont pas constitutivement activés dans les cellules SW620 parentales

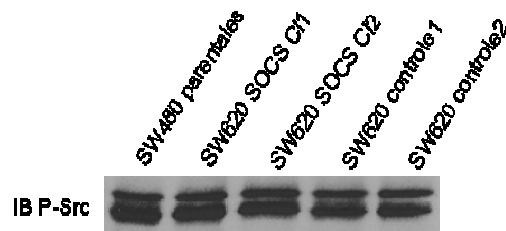


La protéine STAT-3 est un facteur de transcription bien connu pour son potentiel oncogénique. Différents mécanismes provoquent l'activation aberrante de ce facteur dans les cancers (Bromberg, 2002). Dans certaines cellules dérivées de carcinomes coliques, l'inhibition de la signalisation JAK-3/STAT-3 provoque une inhibition du cycle cellulaire, une augmentation de l'apoptose ainsi qu'une diminution de l'invasion cellulaire (Lin et al., 2005; Xiong et al., 2008).

Dans les cellules SW620, nous n'avons pas détecté de phosphorylation du facteur STAT-3 (ni du facteur STAT-1) à l'état basal. Une activation constitutive de ce facteur ne peut donc pas

être à l'origine du phénotype de nos cellules parentales. Par contre, la surexpression de la protéine SOCS-1 diminue fortement l'intensité de la phosphorylation des facteurs STAT-1 et STAT-3 respectivement induite par une stimulation par l'IFN- γ ou l'IL-6.

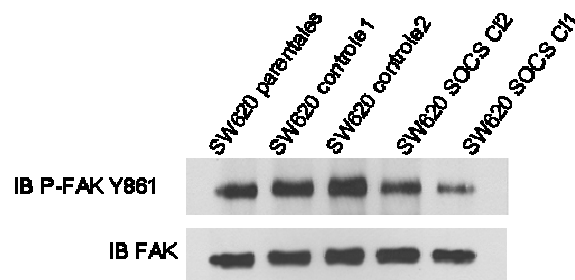
La surexpression de la protéine SOCS-1 ne semble pas modifier l'activité de la kinase Src dans les cellules SW620



L'oncoprotéine Src est impliquée dans la régulation de nombreux processus physiopathologiques (Frame, 2004). Dans des cellules épithéliales il a été démontré que l'activation de l'oncoprotéine Src provoque une endocytose du complexe de la E-cadherine (Fujita et al., 2002). Par ailleurs, dans les cancers coliques, la kinase Src est souvent suractivée et associée au processus métastatique (Jones et al., 2002). Ainsi, dans les cellules tumorales coliques SW480 et HCT116, la surexpression d'une protéine Src constitutivement active provoque une dérégulation de la E-cadherine et une EMT (Avizienyte et al., 2002). Le modèle proposé par les auteurs suggère que la sur-activation de la kinase Src dans les cellules tumorales coliques est à l'origine d'une hyper-phosphorylation de la p120^{ctn} et d'une dérégulation du trafic de la E-cadherine (Avizienyte et al., 2002).

La kinase Src possède plusieurs sites d'autophosphorylation nécessaires à son activation maximale. Par des expériences de western-blot, nous avons analysé la phosphorylation de la kinase Src sur son site d'autophosphorylation Y418 (Anticorps anti-Src pY⁴¹⁸ Biosource). Cette approche ne nous a pas permis de mettre en évidence d'effet significatif de la surexpression de la protéine SOCS-1 sur l'activation de la kinase Src. Nous avons ensuite compléter notre analyse à l'aide d'un anticorps anti-Cst1 (fourni par le Dr Serge Roche). Nous avons ainsi vérifié que l'expression et la phosphorylation des SFK (Src Family Kinase) Fyn et Yes n'étaient modifiées dans nos cellules.

Effet de la surexpression de la protéine SOCS-1 sur l'activation et le niveau d'expression de la kinase FAK



La protéine FAK (Focal Adhesion Kinase) est à la fois un substrat de la kinase Src et une cible des protéines SOCS. Liu et ses collaborateurs ont démontré que les protéines SOCS-1 et SOCS-3 interagissent *in-vitro* avec la kinase FAK phosphorylée sur son résidu tyrosine 397. Cette interaction provoque une poly-ubiquitination de la kinase et sa dégradation par le protéasome (Liu et al., 2003a). La protéine FAK participe à la transduction des signaux transmis par les intégrines et intervient dans la régulation de la prolifération, de la différenciation et de la migration cellulaire (Schaller, 2001). Dans des cellules épithéliales MDCK et CHO, la surexpression de la kinase FAK autorise la prolifération cellulaire en absence de support et augmente la migration cellulaire (Cary et al., 1996; Frisch et al., 1996). Parallèlement, plusieurs études rapportent une augmentation du niveau d'expression de la kinase FAK dans les cancers colorectaux. Par des analyses d'immunohistochimie couplées à des mesures de PCR en temps réel, l'équipe de Lark a démontré que l'expression de la kinase FAK était significativement augmentée dans les tumeurs coliques primaires comparées aux tissus sains adjacents. Et de la même façon, l'expression de la kinase est plus forte dans les métastases que dans les tumeurs primaires (Lark et al., 2003).

Dans nos cellules, l'expression de la protéine SOCS-1 ne provoque pas de diminution de l'expression de la protéine FAK. Par contre on observe dans les cellules SW620^{SOCS} une diminution de la phosphorylation de la kinase FAK sur son résidu Y861.

L'activation de la kinase FAK se fait de façon séquentielle. Dans un premier temps, un stimulus (activation d'une intégrine par exemple) provoque l'autophosphorylation de la kinase sur son résidu Y397. Cette modification crée alors un site d'ancrage pour la kinase Src, qui va à nouveau phosphoryler la protéine FAK, mais cette fois sur son résidu Y861. De manière intéressante, la régulation de la protéine FAK par la protéine SOCS-1 repose sur

l'interaction entre le résidu Y397 phosphorylé de la première avec le domaine SH2 de la seconde (Liu et al., 2003a). Lorsqu'elle est surexprimée, la protéine SOCS-1 pourrait donc inhiber l'activation de la kinase FAK par Src en empêchant l'interaction Src/Y397.

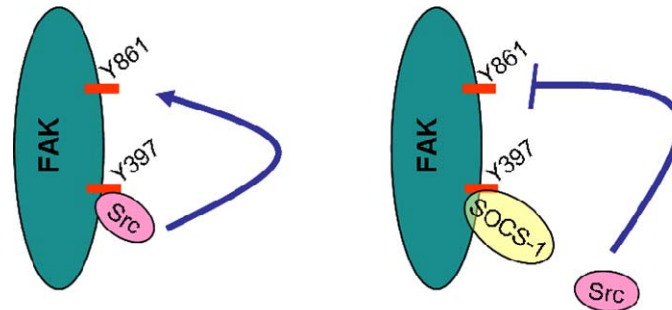


Figure 27 : Modèle d'inhibition de l'activation de la kinase FAK par la protéine SOCS-1
 En se fixant au site d'autophosphorylation de la kinase FAK, la protéine SOCS-1 pourrait empêcher l'action de la kinase Src.

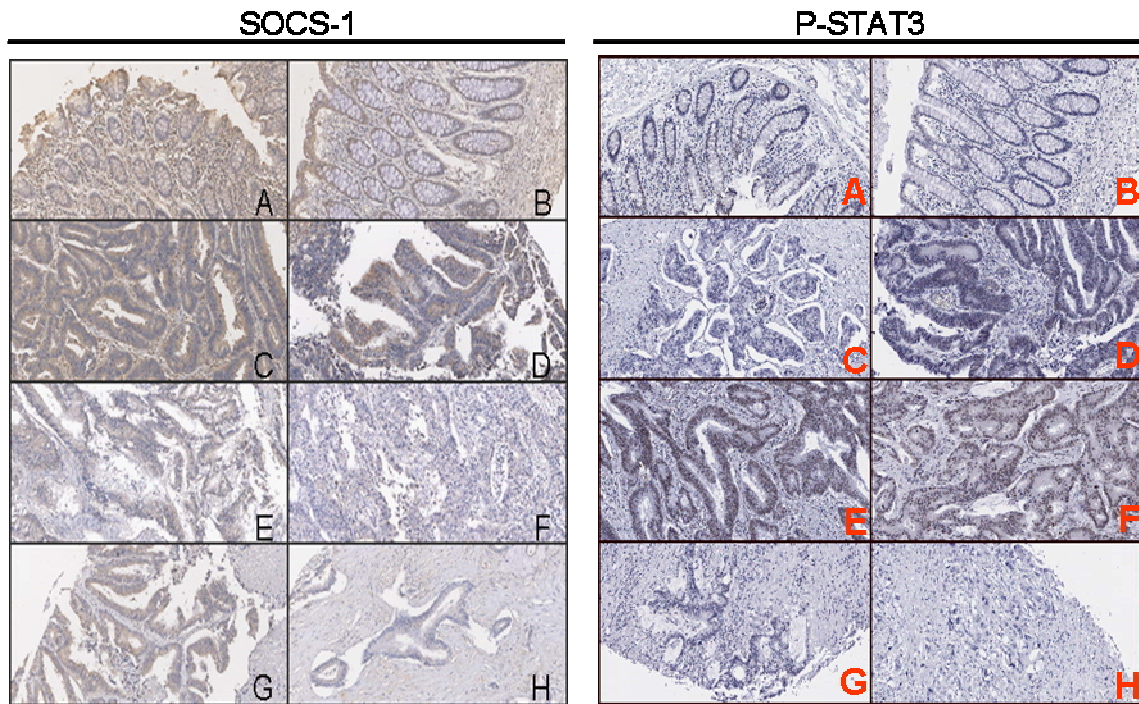
In-vivo, la diminution de l'expression de SOCS-1 semble associée à la progression tumorale et à une augmentation de la phosphorylation du facteur STAT3.

L'expression des protéines SOCS-1 (Anticorps anti SOCS-1 N-18 sc7006) et STAT3 phosphorylée (Anticorps anti P-STAT3 sc-9131) ont été examinées par immunohistochimie (IHC), sur les mêmes 59 échantillons de tissus coliques (Lames CDA2 Super Bio Chips).

Dans les tissus sains et les adénocarcinomes bien différenciés, l'intensité du marquage de la protéine SOCS-1 est toujours forte. Par contre, dans les carcinomes moins différenciés et les métastases, le marquage tend à être plus souvent faible. Ainsi, le pourcentage d'échantillon présentant une expression forte de la protéine SOCS-1 est maximal pour les tissus sains et les adénocarcinomes bien différenciés alors qu'il n'est plus que de 33% (3/9) pour les métastases. Entre, les carcinomes moins différenciés présentent un pourcentage intermédiaire de 54% (12/22). Une diminution de l'expression de la protéine SOCS-1 est aussi observée lorsque les échantillons sont classés selon le score TNM de l'UICC (Union Internationale Contre le Cancer) qui définit différents stades dans la progression tumorale colique.

Analyse statistique des marquages d'IHC :

	n	Niveau d'expression de SOCS-1			
		faible		forte	
Age du patient n=54					
<55	28	8	29%	20	71%
≥55	24	6	25%	18	75%
	+ 2 inconnus				
Sexe n=54					
homme	32	8	25%	24	75%
femme	22	7	32%	15	68%
Localisation de la tumeur n=37					
colon ascendant	8	4	50%	4	50%
Caecum	3	1	33%	2	67%
colon descendant	2	0	0%	2	100%
Rectum	6	2	33%	4	67%
colon sigmoïd	14	3	21%	11	79%
colon transverse	4	0	0%	4	100%
Localisation des metastases n=9					
Poumon	2	1	50%	1	50%
Ganglion lymphatique	4	2	50%	2	50%
Ovaire	3	3	100%	0	0%
Histologie n=45					
Tissu sain	8	0	0%	8	100%
Carcinome bien différencié	15	0	0%	15	100%
Carcinome moy. différencié	18	7	39%	11	61%
Carcinome peu différencié	1	1	100%	0	0%
Carcinome mucineux	3	2	67%	1	33%
Stade (UICC) n=46					
II	13	1	8%	12	92%
III	16	6	38%	10	63%
IV	8	3	38%	5	63%
metastase	9	5	56%	4	44%



Des images représentatives des résultats obtenus pour le marquage de la protéine SOCS-1 (à gauche) et de la protéine STAT-3 phosphorylée (à droite) ont été acquises.

Dans les échantillons correspondant à du tissu colique sain (**A-B**) ou des adénocarcinomes bien différenciés (**C-D**), le marquage de la protéine SOCS-1 est fort alors que celui de P-STAT3 est absent ou faible. Inversement, dans les échantillons issus d'adénocarcinomes peu différenciés (**E-F**) la diminution de l'expression de la protéine SOCS-1 correspond à l'apparition d'un fort marquage de la protéine STAT-3 phosphorylée. De façon générale, les tissus métastatiques (localisés dans le poumon (**G**) ou dans les ganglions (**H**)) présentent un marquage faible pour la protéine SOCS-1. L'analyse du marquage de la protéine STAT-3 phosphorylée dans ces tissus a été rendue plus délicate par le nombre restreint d'échantillons et leur qualité.

Ces observations suggèrent néanmoins que le marquage de la protéine P-STAT3 serait inversement corrélé à celui de la protéine SOCS-1. Ce qui peut laisser penser qu'*in vivo*, au cours de la progression tumorale colique, une diminution de l'expression de la protéine SOCS-1, pourrait être à l'origine d'une levée d'inhibition sur la phosphorylation du facteur de transcription STAT-3.

Discussion

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressées au gène suppresseur de tumeur *Suppressor of cytokine signalling-1*. Dans un premier temps nous avons étudié la régulation du promoteur humain proximal du gène *Socs-1* en réponse à l'IFN- γ , un de ses meilleurs inducteurs. Parallèlement, des données expérimentales récentes, indiquant que l'inhibition de l'expression du gène *Socs-1* serait un phénomène important dans l'apparition et la progression de certaines tumeurs solides, nous nous sommes engagés dans une étude plus fonctionnelle. Cette dernière a pour objectif de caractériser le ou les mécanisme(s) qui peuvent supporter l'action anti-tumorale de la protéine SOCS-1 dans la progression maligne colique.

REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DU GENE *Socs-1* EN REPONSE à L'IFN- γ

L'expression du gène *Socs-1* est induite par de nombreuses cytokines. Ces dernières activent principalement la voie de signalisation JAK/STAT.

L'IFN- γ est une cytokine d'action pleiotropique (Stark et al., 1998). Produit par les cellules NK et les cellules T activées, l'IFN- γ est aussi un des plus puissants inducteurs de l'expression du gène *Socs-1* (Alexander, 2002). Les mécanismes d'activation du promoteur murin du gène *Socs-1* par l'IFN- γ ont été décrits par l'équipe de Saito (Saito et al., 2000). Par contre, les données concernant les mécanismes d'activation du promoteur humain sont plutôt limitées.

Comparaison structurale du promoteur humain et du promoteur murin du gène *Socs-1* :

Pour identifier les facteurs de transcription potentiellement impliqués dans la régulation de promoteur humain du gène *Socs-1* en réponse à l'IFN- γ , nous avons choisi l'approche de l'analyse comparative (entre promoteur humain et murin).

Nous avons ainsi observé que la région promotrice proximale humaine présente une seule séquence IRF-E, alors que le promoteur murin porte deux séquences IRF-E consécutives et partiellement chevauchantes. Le promoteur murin présente aussi une séquence GAS supplémentaire.

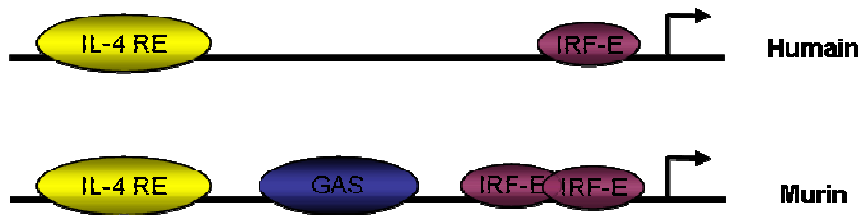


Figure 28 : Comparaison de la région proximale du promoteur humain et du promoteur murin du gène *Socs-1*

Le promoteur humain ne possède qu'un seul site de fixation pour le facteur IRF-1 (en violet) alors que le promoteur murin en présente deux. Une séquence GAS (en bleu) additionnelle est aussi présente sur ce promoteur. Par contre, les deux régions promotrices possèdent trois sites potentiels de liaison pour le facteur de transcription STAT-6 qui constitue un IL-4 RE (IL-4 Response Element) (en jaune).

Des expériences d'EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assays) et de ChIP (Chromatine Immuno Precipitation) nous ont permis de démontrer que le facteur IRF-1 venait se fixer aux niveaux des IRF-E en réponse à une stimulation par l'IFN- γ . Néanmoins, la transformation du simple IRF-E humain en double IRF-E murin (et inversement) n'a pas entraîné de modification significative de l'activité des promoteurs. En effet, nous n'avons observé, ni une diminution de l'activation du promoteur murin, ni une meilleure induction de la transcription avec le promoteur humain. Ces résultats indiquent que le double IRF-E n'est pas la séquence déterminante de l'activation transcriptionnelle en réponse à l'IFN- γ . Nous avons alors émis l'hypothèse de l'intervention d'autres facteurs.

Les facteurs de transcription de la famille SP

Sur le promoteur humain, à proximité du double IRF-E, nous avons localisé une séquence consensus pouvant être reconnue par le facteur de transcription Sp2.

Les facteurs de transcription Sp forment une petite famille de protéine dont Sp1 est le prototype. A ce jour, cette famille compte 4 membres, Sp1 à 4. La protéine Sp1 a été initialement identifiée comme un facteur de transcription qui se lie à plusieurs motifs « GC-box » et qui active la transcription au niveau du promoteur du virus SV40 et de la thymidine kinase (Suske, 1999). Les quatre membres de la famille Sp partagent des domaines structuraux communs. Ces protéines contiennent trois motifs en doigts de zinc dans leur région C-terminale et des domaines riches en glutamine adjacents à des stretches de sérine/thréonine dans leur portion N-terminale (**figure 29**).



Figure 29 : Structure des facteurs de transcription de la famille Sp

Les motifs en doigts de zinc (en noir) sont au nombre de trois et se situent dans la région carboxy-terminale. Les facteurs de la famille Sp se caractérisent aussi par des régions riches en glutamine (en rouge) et en Sérine/Thréonine (en jaune).

En dehors de leur structure commune, la comparaison des séquences des protéines Sp indique que la protéine Sp2 se détache des trois autres (Suske, 1999). Ainsi, le facteur Sp2 ne reconnaît pas des motifs GC-box, mais plutôt des motifs GT-box (Kingsley and Winoto, 1992). La protéine Sp2 reconnaît la séquence 5'-GGGCGGGAC avec une forte affinité (Moorefield et al., 2004).

Dans notre étude, nous avons mis en évidence l'association du facteur de transcription Sp2 avec le promoteur murin du gène *Socs-1* au niveau d'une séquence consensus située à proximité du double IRF-E. Cette interaction est par ailleurs indépendante d'une stimulation par l'IFN- γ . Lorsqu'on éteint l'expression du facteur Sp2 par interférence ARN, l'activité basale du promoteur murin est diminuée. Par contre le rapport d'induction en réponse à l'IFN- γ reste inchangé. Il semblerait donc que le facteur de transcription Sp2 soit impliqué dans le maintien du niveau d'expression basal de l'ARNm de *Socs-1* et non pas dans l'activation de la transcription.

Mécanisme d'action du facteur Sp2 sur le promoteur humain du gène *Socs-1*

Il a été montré que le facteur de transcription Sp2 s'associe préférentiellement à la matrice nucléaire. Cette association pourrait moduler l'activité transcriptionnelle du facteur (Moorefield et al., 2006). Le facteur Sp2 pourrait ainsi participer au maintien des régions riches en GC des chromosomes au niveau de la matrice nucléaire. De manière intéressante, des zones de contact avec la matrice nucléaire ont été observées pour le gène *Socs-1* humain (Kramer et al., 1998; Yoshikawa et al., 2001).

Nous avons localisé une potentielle séquence consensus pour le facteur Sp2 dans le premier exon. Mais nos analyses d'immunoprécipitation de la chromatine ne nous ont pas permis de démontrer sa fixation sur cette séquence. Pourtant, l'utilisation de SiRNA dirigés contre les

ARNm *Sp2* provoque une forte diminution de la quantité d'ARNm *Socs-1* induite en réponse à l'IFN- γ . Nous avons aussi observé que le promoteur humain du gène *Socs-1* n'était pas activé par l'IFN- γ lorsqu'il est transfecté de façon transitoire alors que dans les mêmes conditions, cette construction est régulée par l'IL-4 (Travagli et al., 2004). Cette observation a soulevé la question de l'importance de la structure chromatinienne dans la régulation de la transcription du gène *Socs-1* humain. En effet, la présence de plusieurs « enhancers » dans le gène *Socs-1* a été mise en évidence. Ces « enhancers » autoriseraient des réorganisations chromatinienne et des régulations transcriptionnelles « à distance » (Abou El Hassan and Bremner, 2009). Ce phénomène a aussi été décrit pour le gène *CIITA*, lui aussi induit par l'IFN- γ (Ni et al., 2008).

On peut donc imaginer que le facteur Sp2, en s'associant à la matrice nucléaire, est essentiel à la formation des structures chromatinienne nécessaire à la régulation transcriptionnelle du gène *Socs-1* humain en réponse à une stimulation par l'IFN- γ .

Au cours de nos investigations, nous avons aussi mis en évidence une interaction directe entre les facteurs IRF-1 et Sp2 sur l'ADN en réponse à une stimulation par l'IFN- γ . Cette interaction observée aussi bien sur le promoteur murin que sur le promoteur humain, ne semble pas avoir été décrite auparavant. Nous avons émis l'hypothèse que cette interaction pourrait moduler l'activité transcriptionnelle du facteur IRF-1, mais ce phénomène n'a pas été caractérisé au niveau fonctionnel.

REEXPRESSION DE LA PROTEINE SOCS-1 ET TRANSFORMATION DU PHENOTYPE METASTATIQUE

Les résultats d'analyses de PCR Méthylation Spécifique (MSP) réalisées par trois équipes indépendantes sur plus de 300 échantillons de tumeurs primaires au total, indiquent que le gène *Socs-1* est fréquemment hyper-méthylé chez les patients atteints de cancers colorectaux (Fujitake et al., 2004; Hibi et al., 2005; Lin et al., 2004). Dans le modèle murin, des travaux démontrent que des souris transgéniques *Socs-1*^{-/-} (*Socs-1*^{-/-}Tg) développent spontanément des tumeurs colorectales au bout de quelques mois lorsqu'elles sont traitées par l'IFN- γ (Hanada

et al., 2006). Ces données supportent l'hypothèse que l'inhibition de l'expression de la protéine SOCS-1 participe à la tumorigenèse colique.

L'inhibition de l'expression du gène *Socs-1* par hyperméthylation est aussi observée dans d'autres types de tumeurs solides. Dans des cellules dérivées d'hépatocarcinomes, la réexpression de la protéine SOCS-1 provoque une inhibition de la prolifération cellulaire induite par l'activité constitutive du facteur STAT-3. Par contre, il n'y a pas de donnée spécifique concernant le rôle de la protéine SOCS-1 dans les tumeurs colorectales. Nous nous sommes donc proposé d'étudier les conséquences de l'inhibition du gène *Socs-1* dans la cancérogenèse colique.

Répression de l'expression du gène *Socs-1* dans les cellules SW620 et conséquences de la réexpression de la protéine

La lignée SW620 a été établie à partir des cellules métastatiques d'un patient atteint d'un cancer colorectal et non traité (Leibovitz et al., 1976). Le couple de lignées cellulaires SW480 (dérivée de la tumeur primaire du patient) et SW620 a été validé comme un modèle de progression tumorale colique (Hewitt et al., 2000).

Lors d'expériences préliminaires, nous avons observées que dans la lignée SW620, malgré une phosphorylation de STAT-1 qui semble normale, l'IFN- γ n'induit pas d'augmentation de l'expression du gène *Socs-1*. Des analyses de PCR méthylation spécifique (MSP) et l'utilisation d'un agent déméthylant, nous avons par la suite permis de mettre en évidence l'inhibition de l'expression du gène *Socs-1* par méthylation aberrante de l'ADN au niveau de l'exon 2.

Pour analyser les conséquences de l'inhibition de l'expression du gène *Socs-1* dans le phénotype des cellules SW620, nous avons choisi de surexprimer la protéine en générant des clones stables. Dans les cellules SW620, la surexpression de la protéine SOCS-1 a provoqué une transformation de la morphologie cellulaire. Les cellules SW620-SOCS ont acquis une morphologie de type épithélial ressemblant à celle des cellules SW480. Par contre, dans les cellules SW480 nous n'avons observé aucun changement. Des tests phénotypiques indiquent que les capacités migratoires et invasives des cellules SW620-SOCS sont très réduites comparées aux cellules parentales.

Ces modifications phénotypiques s'accompagnent d'une réexpression de la E-cadherine à la membrane dans les cellules SW620-SOCS. Des analyses d'immunofluorescence ont aussi

permis d'observer une relocalisation partielle de la β -caténine et la p120caténine (p120^{ctn}) à la membrane et suggèrent donc une reformation des complexes des jonctions adhérentes (JAs).

L'importance de la protéine SOCS-1 en tant que régulateur de la carcinogénèse colique a été renforcée par nos expériences préliminaires *in-vivo*. Injectées en sous-cutanées chez la souris nude, les cellules SW620-SOCS semblent former des tumeurs moins rapidement que les cellules exprimant le vecteur vide ou les cellules parentales. D'autre part, notre analyse d'échantillons de tumeurs coliques par immunohistochimie semble indiquer que l'expression de la protéine SOCS-1 est perdue au cours du développement tumoral colique. La perte d'expression de la protéine SOCS-1 semble positivement corrélée à la perte de la différenciation cellulaire et à la progression tumorale.

In-vitro, lorsque l'expression de la protéine SOCS-1 est ré-éteinte par interférence ARN (dans les cellules SW620-SOCS) nous avons constaté une inhibition de la relocalisation membranaire de la E-cadhérine et une réapparition des capacités migratoires et invasives des cellules. Ce résultat indique que les transformations phénotypiques que nous observons sont spécifiquement liées au niveau d'expression de la protéine SOCS-1.

En définitive, il semble que la surexpression de la protéine SOCS-1 dans les cellules métastatiques SW620 soit responsable d'une inhibition de leurs caractères invasifs.

L'hypothèse d'une perturbation du trafic post-golgien dans les cellules SW620

Dans les cellules parentales, la E-cadhérine est localisée dans des structures cytoplasmiques ressemblant à des vésicules. On observe dans ces cellules un marquage fluorescent punctiforme au lieu du marquage membranaire caractéristique de la E-cadherine. Par contre, dans les cellules SW620-SOCS, comme dans les cellules de la lignée SW480, on détecte un marquage classique, en nid d'abeille.

Après avoir écarté les hypothèses d'inhibition génique (MSP) et de répressions transcriptionnelles (PCR semi-quantitative et tests d'activation transcriptionnelle), nous nous sommes concentrées sur les mécanismes de régulation post-traductionnels de la E-cadherine. Nous avons alors constaté que les études rapportant une endocytose aberrante de la E-cadherine dans les cancers sont de plus en plus nombreuses (Mosesson et al., 2008). Nous avons donc tenté de mettre directement en évidence une endocytose constitutive de la E-cadherine dans les cellules SW620 parentales.

De nombreux récepteurs sont internalisés par la voie d'endocytose dépendante de la clathrine. Parmi les mieux connus se trouvent, les récepteurs aux LDL et à la transferrine, qui sont recyclés à la membrane, et le récepteur à l'EGF qui est dégradé suite à son internalisation (Goldstein et al. 1985). Les immuno-marquages de la transferrine internalisée et de la E-cadherine n'ont pas permis de co-localiser ces protéines dans les cellules parentales.

Dans le schéma classique de la voie endocytaire, les compartiments terminaux sont les lysosomes. Nous avons marqué ce sous compartiment dans nos cellules à l'aide de LysoTracker® (Invitrogen – Molecular Probes). Le marquage obtenu, ne correspond pas à celui de la E-cadherine. La protéine ne semble donc pas se trouver au niveau des lysosomes. Nous avons aussi eu recours à des inhibiteurs de la formation des vésicules d'endocytose (chloroquine, dynasore) (Kirchhausen et al., 2008; Schneider and Trouet, 1981). Aucun n'a permis de relocalisée la E-cadherine à la membrane des cellules parentales. Enfin, nos mesures de la demi-vie de la E-cadherine par incorporation de S₃₅ n'ont pas montré de différence significative entre les cellules parentales et les cellules SW620-SOCS.

Les mécanismes précis de l'adressage de la E-cadherine à la membrane plasmique ne sont pas exactement connus. A sa sortie du TGN (Trans golgi Network), la E-cadherine semble localisée au niveau des PGC (Post-Golgi Carriers) (Lock and Stow, 2005). Ces PGC sont des structures de transport post-golgien de type tubulo-vesiculaire (Lippincott-Schwartz et al., 2000). Les PGCs bourgeonnent à partir de la membrane du TGN, puis s'associent aux microtubules et se déplacent dans le cytoplasme. Ces structures fusionnent ensuite avec la membrane plasmique où elles délivrent leur contenu (Toomre et al., 1999).

Dans les cellules SW620 parentales, nous avons pu localiser la E-cadherine au niveau de vésicules positives pour la protéine Rab-4, d'une part, et pour la protéine Rab-11 d'autre part. Les outils utilisés (vecteurs Rab4-GFP et Rab11-GFP) ne nous ont pas permis de vérifier si ces vésicules pouvaient être à la fois positives pour les protéines Rab-4 et Rab-11.

Une analyse de l'exocytose de la E-cadherine dans des cellules MDCK vivantes a démontré que les molécules de E-cadherine sortant du TGN sont délivrées dans un compartiment intermédiaire correspondant à des endosomes de recyclage positifs pour Rab-11 (Lock and Stow, 2005). Il se pourrait alors que les co-localisations observées entre la E-cadherine et Rab-4 d'une part et Rab-11 d'autre part, ne témoignent pas d'une endocytose de la E-cadherine. Au contraire, au regard de l'ensemble de nos résultats, elles pourraient refléter une perturbation de l'exocytose. Les vésicules positives pour la protéine Rab-11 correspondraient

à des vésicules d'exocytose (sorties du TGN) bloquées dans leur trafic intracellulaire. Et les vésicules positives pour la protéine Rab-4, des vésicules de recyclage elles aussi bloquées.

A l'heure actuelle, aucun lien direct entre l'expression de la protéine SOCS-1 et la régulation de la E-cadherine n'a été rapporté. Par contre, des travaux récents impliquent la protéine SOCS-1 dans le trafic de la protéine HIV-gag (Nishi et al., 2009; Ryo et al., 2008). On peut donc imaginer, dans notre modèle cellulaire, un mécanisme par lequel la réexpression de la protéine SOCS-1 pourrait provoquer une inhibition du phénotype invasif des cellules SW620WT en rétablissant le trafic post-golgien de la E-cadherine.

Un rôle de la p120^{ctn}?

En plus de son rôle dans l'adhésion cellulaire, la p120^{ctn} serait impliquée dans le trafic intracellulaire. Il a été démontré que la p120^{ctn} pourrait réguler l'organisation des microtubules autour du centrosome et qu'elle interagirait directement avec la kynésine (Roczniak-Ferguson and Reynolds, 2003). La possibilité d'un transport de la p120^{ctn} le long des microtubules grâce à des moteurs comme la dynéine ou la kynésine n'est pas exclue (Franz and Ridley, 2004). En effet, l'association de la p120^{ctn} avec la kinésine semble favoriser la transport du complexe E-cadherine/ β -caténine vers la membrane plasmique (Chen et al., 2003b).

Dans la cellule, de nombreuses isoformes de la p120^{ctn} peuvent être générées par épissage alternatif et à partir de plusieurs sites d'initiation de la transcription (Keirsebilck et al., 1998) (**figure 30**). Ces isoformes pourraient avoir des localisations cellulaires propres et pourraient moduler l'adhésion ainsi que l'invasion cellulaire de manière spécifique selon le contexte et le type cellulaire (Aho et al., 2002) (Liu et al., 2007) (Liu et al., 2009). Dans ses travaux, Yanagisawa démontre l'importance du niveau d'expression relatif des différentes isoformes, les unes par rapports aux autres (Yanagisawa et al., 2008).

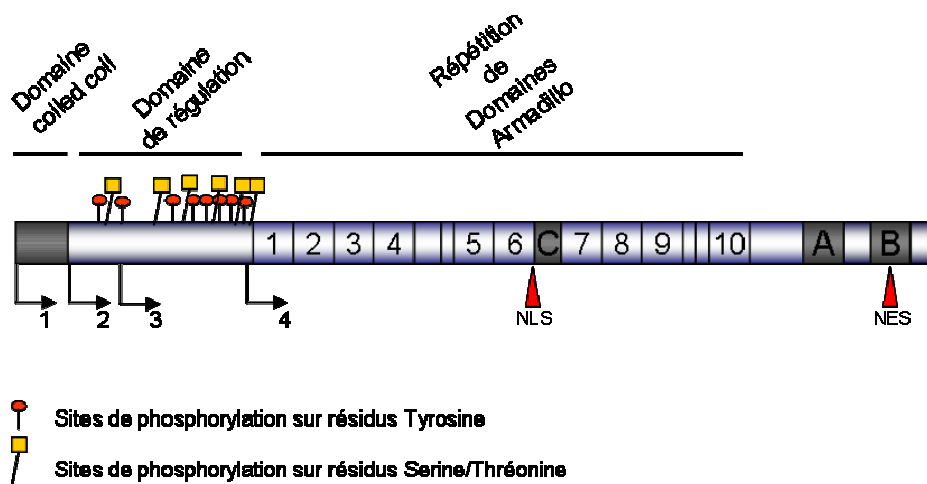


Figure 30 : Structure de p120^{ctn}

Les répétitions Armadillo 1 à 5 permettent l'interaction entre la p120^{ctn} et les cadhérines. Le domaine N-terminal contient un domaine coiled-coil et un domaine de régulation. Ce dernier comporte les huit sites de phosphorylation, substrats de la kinase Src. (D'après Mariner 2001)

Les GTPases de la famille Rho sont avant tout décrits comme des régulateurs clef du cytosquelette d'actine. Mais ces protéines ont bien d'autres fonctions. Elles interviennent par exemple dans la régulation de l'adhésion cellulaire, le trafic ou encore dans le contrôle de la transcription (Kaibuchi et al., 1999). Généralement, ces protéines cyclent entre un état actif, où elles sont liées au GTP, et un état inactif, où elles sont liées au GDP. Dans leur forme active, les GTPases Rho interagissent avec plusieurs effecteurs pour induire des réponses cellulaires variées. Les protéines GEFs (Guanine Exchange Factors) favorisent l'échange du GDP en faveur du GTP alors que les protéines GAPs (GTPases activating proteins) catalysent l'hydrolyse du GTP. L'activité des GTPases est aussi régulée par les protéines GDI (Guanine nucleotide dissociation inhibitors). Ces dernières inhibent l'interaction des GTPases Rho avec leurs GEFs et/ou leurs effecteurs (Kaibuchi et al., 1999).

Il a été démontré que la p120^{ctn} possède une activité Rho GDI. Apparemment la p120^{ctn} est capable d'inhiber l'activité de la GTPase RhoA et aurait tendance à augmenter celles des GTPases Cdc42 et Rac (Grosheva et al., 2001; Wildenberg et al., 2006).

In-vitro, toutes les isoformes de la p120^{ctn} sont capables de se lier à la GTPase RhoA. Cette interaction repose sur l'intégrité de la région centrale de la protéine p120^{ctn} (aa 622 à 628) (Anastasiadis et al., 2000). Par contre, le domaine N-terminal de la protéine doit être présent pour l'inhibition effective de l'activité de la GTPase. Seule l'isoforme 1A possède un

domaine N-terminal intacte et est donc capable d'inhiber RhoA (Yanagisawa et al., 2008). Ainsi, l'invasion cellulaire induite par la surexpression de l'isoforme 1A serait liée à une inhibition de l'activité de la GTPase RhoA (Anastasiadis et al., 2000). La p120^{ctn} peut aussi interagir avec la p190RhoGAP pour inhiber Rho de façon indirecte (Wildenberg et al., 2006). Lorsqu'elle est activée, la p190RhoGAP transloque du cytoplasme à la membrane, où elle va se lier à la p120^{ctn} engagée dans les jonctions adhérentes. Elle inhibe alors l'activité de Rho autour des complexes de la E-cadherine.

Au final la p120^{ctn} peut jouer deux rôles différents dans la progression tumorale : i) La perte de l'expression de la p120^{ctn} provoque la déstabilisation de la E-cadherine membranaire, ii) En absence de E-cadhérine à la membrane, la p120^{ctn} délocalisée peut moduler l'activité des GTPases Rho. Dans les deux cas, la migration et l'invasion cellulaire sont favorisées.

Lors de notre étude, après avoir observé la réexpression de la E-cadherine à la membrane dans les cellules SW620-SOCS, nous avons analysé le statut de la p120^{ctn}. Lorsqu'on compare par western-blot, l'expression de la p120^{ctn} dans les cellules parentales et dans les cellules SW620-SOCS, on obtient un profil différent. Dans les cellules surexprimant la protéine SOCS-1, le signal correspondant à l'isoforme 1 a disparu.

Comme le domaine N-terminal de la protéine p120^{ctn} contient de nombreux sites de phosphorylation qui permettent notamment de réguler son interaction avec la GTPase RhoA (Castano et al., 2007) ; nous avons émis l'hypothèse que la protéine SOCS-1 pourrait reconnaître l'isoforme 1A via des résidus tyrosine phosphorylés du domaine N-terminal et provoquer sa dégradation par le protéasome. Mais l'utilisation d'inhibiteurs du protéasome (bortezomib, Mg132) n'a pas permis d'inhiber la disparition de l'isoforme 1A dans les cellules SW620-SOCS. Néanmoins, il n'est pas exclue que des expériences complémentaires pourraient nous permettre de corréler une modulation de l'activité de la GTPase RhoA à la modification du profil d'expression de la p120^{ctn} (et à la diminution des capacités migratoires et invasives) dans les cellules SW620-SOCS.

Perspectives expérimentales

Nos résultats indiquent un lien entre la surexpression de la protéine SOCS-1 et la modulation du phénotype métastatique des cellules SW620, apparemment à travers un mécanisme qui permet la réexpression de la E-cadherine à la membrane plasmique. Mais des investigations supplémentaires sont nécessaires pour confirmer et caractériser le mécanisme original suggéré par nos données.

A court-terme, nos investigations viseront à caractériser le ou les mécanismes sous-jacent(s) de la transformation du phénotype dans les cellules SW620-SOCS.

- Grace à un vecteur d'expression codant pour l'isoforme 1A de la p120ctn, nous souhaitons mettre en évidence l'importance de l'inhibition de l'expression de la forme longue de la protéine dans les cellules SW620-SOCS.
- Parallèlement, l'exploitation de mutants fonctionnels de la protéine SOCS-1 (SOCS-1RK, SOCS-1 Δ SH2, SOCS-1 Δ SOCS-box) générés lors nos travaux, devraient nous permettre de déterminer quel(s) domaines de la protéine est (sont) critique(s) pour la transformation du phénotype cellulaire.
- L'hypothèse d'une régulation du trafic cellulaire par la protéine SOCS-1 devra être testée. Dans un premier temps, des expériences d'immunofluorescence seront envisagées. Elles pourraient nous permettre de déterminer si la protéine SOCS-1 peut interagir avec les microtubules, et le cas échéant, si elle peut favoriser le transport vésiculaire en stabilisant ces structures.

Parallèlement, les études chez la souris devront être reprises et complétées pour confirmer les effets de la protéine SOCS-1 sur le phénotype invasif des cellules tumorales *in-vivo*. Dans un premier temps, de nouvelles injections de cellules en sous-cutané pour la détermination de la vitesse de formation des tumeurs seront réalisées. Puis, les capacités métastatiques des cellules surexprimant la protéine SOCS-1 seront comparées à celle des cellules sauvages, quatre semaines après inoculation intra-splénique.

Le couple de lignées SW480 et SW620 n'est pas le seul modèle qui permette l'étude des stades tardifs du cancer colorectal. Les lignées cellulaires Isreco 1, 2 et 3 ont aussi été établies à partir des cellules cancéreuses coliques. La lignée Isreco est dérivée de la tumeur primaire

alors que les lignées Isreco 2 et 3 sont des cellules métastatiques hépatique et péritonéales (Cajot et al., 1997). Il pourrait être intéressant de caractériser les statuts du gène *Socs-1* (MSP) et de la protéine E-cadherine dans ces modèles. Cette étude pourrait être élargie à d'autres lignées de carcinomes coliques (HT29, HCT116, colo205, CaCo2...) ou à d'autres types tumoraux comme les mélanomes dans lesquels la protéine SOCS-1 semble impliquée dans la formation des métastases (Huang et al., 2008).

Enfin, notre travail repose sur une surexpression de la protéine SOCS-1 dans des cellules où l'expression du gène est réprimée par hyperméthylation de l'ADN. L'identification d'un modèle cellulaire (de préférence épithélial) dans lequel la protéine SOCS-1 est détectable à l'état basal, nous permettrait la démarche inverse. En effet, il serait intéressant d'inhiber l'expression de la protéine SOCS-1 dans ces cellules et d'observer les conséquences phénotypiques. Cela permettrait de consolider fortement nos résultats.

CONCLUSION

Dans nos travaux, nous avons d'abord étudié les mécanismes d'induction du gène *Socs-1* en réponse à l'IFN- γ . Cette étude a permis de mettre en évidence l'importance des facteurs de transcription IRF-1 et Sp2. Cette étude a aussi soulevé la question du mécanisme d'action du facteur de transcription Sp2 au niveau du promoteur humain.

Trois études épidémiologiques indépendantes concluent que la méthylation du gène *Socs-1* est un phénomène associé aux cancers colorectaux (Fujitake et al., 2004; Hibi et al., 2005; Lin et al., 2004). En analysant par immunohistochimie, des échantillons de tissus provenant de tumeurs colorectales, nous avons pour notre part constaté que la perte d'expression de la protéine SOCS-1 est associée à la dédifférenciation cellulaire et à la progression tumorale. La répression de l'expression du gène *Socs-1* par méthylation de l'ADN a aussi été rapportée dans d'autres types tumoraux dont des hépato-carcinomes et des tumeurs du sein. Dans des lignées dérivées de ces types tumoraux, la réexpression de la protéine provoque respectivement une inhibition de la croissance tumorale et la suppression de la formation de métastases cérébrales (Huang et al., 2008; Yoshikawa et al., 2001).

Les investigations menées lors de ce travail de thèse ont donc eu pour but de déterminer le ou les mécanismes régissant l'activité anti-tumorale de la protéine SOCS-1 dans les cancers colorectaux. Pour cela nous avons utilisés les cellules coliques métastatiques SW620 dans lesquelles l'expression du gène *Socs-1* est justement réprimée par hyper-méthylation de l'ADN. Nos résultats suggèrent un mécanisme original dans lequel la protéine SOCS-1 participerait à la régulation du trafic intracellulaire de la E-cadherine. Cette hypothèse qui reste à valider est néanmoins supportée par les résultats récents de Nishi et al. Cette équipe rapporte l'implication de la protéine SOCS-1 dans le transport de la protéine HIV-gag, le long des microtubules (Nishi et al., 2009).

Une régulation effective des caractères invasifs par la protéine SOCS-1, impliquerait cette dernière dans des processus tardifs de la tumorigenèse colique et notamment celui de la formation des métastases.

Grâce à une étude chez la souris, Hanada et ses collaborateurs ont démontré *in-vivo* le rôle de la protéine SOCS-1 dans l'initiation de la tumorigenèse colorectale (Hanada et al., 2006). Le modèle proposé par les auteurs suggère que la protéine SOCS-1 participe à la régulation des effets des cytokines pro-inflammatoires au niveau de l'épithélium colique.

Les données épidémiologiques montrent en effet un lien entre une situation d'inflammation tissulaire chronique et une transformation maligne au niveau de ce tissu. Ainsi, chez les patients atteints de colite ulcéraire ou de la maladie de Crohn, le risque de cancer colorectal

est dix fois plus élevé que dans la population générale. De la même façon, les patients qui présentent une cirrhose ou une fibrose hépatique sont très fortement exposés au développement d'un hépatocarcinome. La fibrose est une composante essentielle de la réaction inflammatoire chronique. C'est le dernier stade avant la cirrhose. Plusieurs travaux rapportent la méthylation du gène *Socs-1* dans les hépatocarcinomes et des analyses statistiques démontrent que cette répression génique est fortement corrélée à la cirrhose ou la présence de fibrose (Okochi et al., 2003; Yoshida et al., 2004). Les auteurs suggèrent que la méthylation du gène *Socs-1* pourrait intervenir avant l'apparition du carcinome. Ce qui implique que la protéine SOCS-1 serait nécessaire à la prévention de la carcinogénèse hépatique sur terrain fibrotique. Cette conclusion vient conforter les résultats des travaux de Hanada et de ses collaborateurs. En effet, leur étude souligne l'importance de l'inhibition, par la protéine SOCS-1, des effets de l'IFN- γ produit par les macrophages. En absence de la protéine SOCS-1, l'hyper-phosphorylation du facteur STAT-1 induite par l'IFN- γ , provoquerait indirectement les lésions de l'ADN responsables de l'initiation tumorale. Au final, dans ce travail, *Socs-1* est défini comme un gène suppresseur de tumeur colique sur terrain inflammatoire.

Le knock-out du gène *Socs-1* a mis en évidence son rôle indispensable dans la régulation des effets de l'IFN γ (Marine et al., 1999). Mais une autre étude démontre que des animaux double-KO *Socs-1*^{-/-} *IFN γ* ^{-/-} souffrent toujours de maladies inflammatoires. Et bien que la maladie et la mort prématurée des animaux soient évitées en supprimant l'IFN γ , leur espérance de vie reste significativement plus courte que celle des animaux sauvages (Metcalf et al., 2002). Cette observation suggère que la protéine SOCS-1 est aussi un régulateur important des effets d'autres cytokines pro-inflammatoires que l'IFN γ ^{-/-}, *in-vivo*. Parallèlement, *in-vitro*, il a été démontré que la protéine SOCS-1 pouvait inhiber les signaux provenant de plusieurs médiateurs de l'inflammation (Alexander, 2002).

L'inflammation chronique se caractérise par l'infiltration du tissu par des mononucléaires (macrophages, lymphocytes...). Ces cellules produisent de grandes quantités de cytokines, de facteurs de croissance et d'espèces réactives à l'oxygène qui peuvent intervenir à tous les stades de la progression tumorale (**figure 31**). Par exemple, les chémokines seraient associées à l'invasion et à la formation de métastases en contrôlant la migration cellulaire (Lu et al., 2006). De manière très intéressante, on retrouve des cellules de l'inflammation au niveau du stroma tumoral et même à l'intérieur des tumeurs (Macarthur et al., 2004).

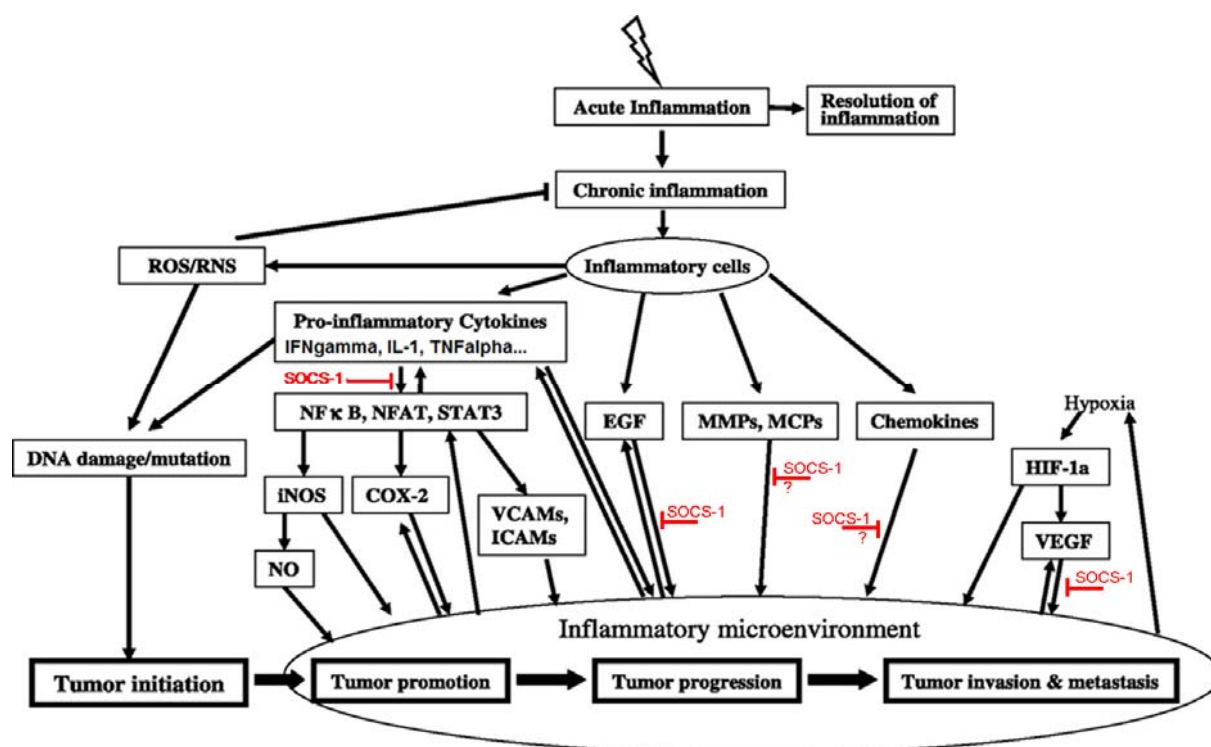


Figure 31 : Mécanismes impliquant l'inflammation dans la cancérogénèse

Le schéma illustre les interactions complexes qui existent entre les médiateurs de l'inflammation et la progression tumorale. Les médiateurs de l'inflammation peuvent être impliqués dans les grands processus cellulaires associés à la carcinogénèse (transformation cellulaire, inhibition de l'apoptose, adhésion cellulaire, angiogénèse, prolifération cellulaire). De manière intéressante la protéine SOCS-1 pourrait inhiber les effets de plusieurs médiateurs de l'inflammation. (D'après Lu et al 2006 et Hanada et al 2006)

Au cours de nos investigations, nous avons analysé les conséquences de la réexpression de la protéine SOCS-1 dans les cellules SW620 sur certaines voies de signalisation. Et en particulier des voies de signalisation impliquées dans la carcinogénèse colique. Nous n'avons relevé ni variation de l'activité transcriptionnelle de la β -caténine, ni diminution de l'activation de la kinase Akt en réponse à une stimulation par l'IGF-1. Par contre, la surexpression de la protéine SOCS-1 provoque une diminution de l'activation du facteur STAT-3 en réponse à l'IL-6 et du facteur NFκB en réponse à une stimulation par le TNF- α . On pourrait donc envisager que le rôle de la protéine SOCS-1 dans la tumorigénèse colique ne se limite pas à une inhibition des effets de l'IFN- γ . D'autant plus qu'une action des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF- α sur la cellule épithéliale colique pourraient expliquer l'hyperactivation des facteurs STAT-3 et NFκB observée chez les souris *Socs1*^{-/-}Tg par Hanada. Les effets de ces cytokines pourraient participer à la tumorigénèse colique tardive en activant la migration cellulaire par exemple. Cette hypothèse impliquerait la protéine SOCS-1 à plusieurs niveaux du processus de cancérogénèse colique. L'inhibition de

l'expression de la protéine SOCS-1 favoriserait l'initiation tumorale au niveau de la paroi colorectale touchée par une inflammation chronique (absence de régulation des effets de l'IFN γ) et par la suite favoriserait la croissance tumorale, l'invasion et la migration cellulaire (défaut de régulation des signaux provenant d'autres facteurs sécrétés par les cellules inflammatoires ou la tumeur elle-même).

Les fonctions anti-tumorales de la protéine SOCS-1 associées à l'inhibition de l'activation du facteur STAT-3 et des effets de l'IFN γ sont bien décrites. Ces régulations s'appuient sur l'inhibition de la kinase JAK-2 par la protéine SOCS-1. Mais la protéine SOCS-1 possède plusieurs autres propriétés (régulation de la dégradation par le protéasome, régulation de l'apoptose, régulation du trafic intracellulaire...). Il n'est donc pas exclu que d'autres mécanismes moléculaires plus complexes soient encore à mettre en évidence afin de compléter la caractérisation de la fonction anti-tumorale de la protéine SOCS-1. Des investigations devront par exemple permettre d'élucider les mécanismes de régulation du facteur NFkB et de la E-cadhérine par la protéine SOCS-1.

Enfin, sachant que l'expression du gène *Socs-1* est inhibée dans d'autres types de tumeurs solides (cancers de l'estomac, hépato-carcinomes, cancers du sein, mélanomes...), il est envisageable que ce gène ait une action anti-tumorale étendue qui pourrait en faire une cible thérapeutique.

ANNEXE

REVIEW

JAK/STAT signal transduction: Regulators and implication in haematological malignancies

VALENTINO Lyne, PIERRE Josiane

Biochem Pharmacologie 2006 (l) 71, 713-721

La voie JAK/STAT est la principale voie de signalisation activée réponse à des stimulations par des cytokines, des hormones ou des facteurs de croissance. Les facteurs de transcription de la famille STAT sont alors activés par les kinases de la famille JAKs. Par la suite, les monomères de facteurs STATs se dimérisent puis transloquent dans le noyau où ils régulent l'expression de nombreux gènes cibles.

Des mutations activatrices de la protéine JAK2 et des protéines chimères constitutivement actives impliquant le domaine JH1 de JAK2 ont été mises en évidence dans désordres myéloprolifératifs. Ces observations démontrent l'importance de la régulation de l'intensité et de la durée des signaux transmis par la voie de signalisation JAK/STAT.

Normalement, la régulation négative de la voie JAK/STAT est assurée par différentes familles protéines : i) les protéines tyrosine phosphatases, ii) les protéines PIAS et, iii) les protéines de la famille SOCS. Les protéines de la famille SOCS inhibent la signalisation des cytokines par différents mécanismes. Grâce à leur domaine SH2, les protéines SOCS inhibent la transduction du signal en interagissant avec les phosphotyrosines du récepteur activé ou avec les kinases JAKs. Parallèlement, les protéines SOCS participent à la dégradation de certains substrats en interagissant et en régulant l'activité enzymatique des E3 ligases de type ESC. De manière intéressante, dans les cellules cancéreuses, des altérations de l'expression des gènes *Socs-1* et *Shp-1* ont été observé.

Cette revue traite des altérations de la voie JAK/STAT rencontrées dans les syndromes néoplasiques. Les fonctions et les implications des principales protéines régulatrices de cette voie en physiopathologie y sont aussi discutées.

available at www.sciencedirect.comjournal homepage: www.elsevier.com/locate/biochempharm

Commentary

JAK/STAT signal transduction: Regulators and implication in hematological malignancies

Lyne Valentino, Josiane Pierre *

Inserm U749, Faculté de Pharmacie, 5, rue JB Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Signal transduction
JAK/STAT pathway
Regulation of STAT activity
Oncogenesis

Abbreviations:

BCR, break cluster region
EPO, erythropoietin
ETV6, ets translocation variant gene 6
GH, growth hormone
GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
IL, interleukin
JAK, Janus kinase
JH, JAK homology
PCM 1, pericentriolar material 1
PIAS, protein inhibitors of activated STAT
PRL, prolactin
PTP, protein tyrosine phosphatase
SHP, Src-homology 2 (SH2)-containing phosphatase
SOCS, suppressors of cytokine signaling
STAT, signal transducers and activators of transcription
TEL, translocated ETS leukaemia
TPO, thrombopoietin
TYK2, tyrosine kinase-2

ABSTRACT

Signal transducers and activators of transcription (STATs) comprise a family of several transcription factors that are activated by a variety of cytokines, hormones and growth factors. STATs are activated through tyrosine phosphorylation, mainly by JAK kinases, which lead to their dimerization, nuclear translocation and regulation of target genes expression. Stringent mechanisms of signal attenuation are essential for insuring appropriate, controlled cellular responses. Among them phosphotyrosine phosphatases (SHPs, CD45, PTP1B/TC-PTP), protein inhibitors of activated STATs (PIAS) and suppressors of cytokine signaling (SOCS) inhibit specific and distinct aspects of cytokine signal transduction. SOCS proteins bind through their SH2 domain to phosphotyrosine residues in either cytokine receptors or JAK and thus can suppress cytokine signaling. Many recent findings indicate that SOCS proteins act, in addition, as adaptors that regulate the turnover of certain substrates by interacting with and activating an E3 ubiquitin ligase. Thus, SOCS proteins act as negative regulators of JAK/STAT pathways and may represent tumour suppressor genes. The discovery of oncogenic partner in this signaling pathway, more especially in diverse hematologic malignancies support a prominent role of deregulated pathways in the pathogenesis of diseases. Fusion proteins implicating the JH1 domain of JAK2 (TEL-JAK2, BCR-JAK2), leading to deregulated activity of JAK2, have been described as the result of translocation. Somatic point mutation in JH2 domain of JAK2 (JAK2^{V617F}), leading also to constitutive tyrosine phosphorylation of JAK2 and its downstream effectors was reported in myeloproliferative disorders. Furthermore, silencing of *socs-1* and *shp-1* expression by gene methylation is observed in some cancer cells.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

* Corresponding author. Tel.: +33 1 4683 5483; fax: +33 1 4683 5496.

E-mail address: josiane.pierre@cep.u-psud.fr (J. Pierre).

0006-2952/\$ – see front matter © 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

doi:10.1016/j.bcp.2005.12.017

1. Introduction

Cytokines are secreted glycoproteins, which regulate diverse biological process through their interaction with multi-subunit receptor complexes. Binding of cytokine to cell surface receptors results in receptor oligomerization and activation of the Janus Kinase (JAK) family of tyrosine kinases [JAK1, JAK2, JAK3 and tyrosine kinase-2 (TYK2)]. Activated JAKs phosphorylate the cytoplasmic domain of the receptor, thereby creating recruitment sites for signaling proteins, such as STATs (signal transducers and activators of transcription). STATs are phosphorylated by JAKs, dimerize and subsequently migrate to the nucleus where they regulate gene transcription. The pathways that convey signals from the cell surface to the nucleus are tightly controlled. At least three different classes of negative regulators exist to limit the strength and duration of cytokine responsiveness. These include protein tyrosine phosphatases, such as Src-homology 2 (SH2)-containing phosphatase-1 (SHP-1), CD45 and PTP1B/TC-PTP, protein inhibitors of activated STATs (PIAS) and the suppressors of cytokine signaling (SOCS). SOCS gene expression is rapidly induced upon cytokine stimulation, and by a wide range of other stimuli including LPS, insulin and chemokines.

A number of diseases including cancer are linked to deregulation of tyrosine kinases. Constitutive activation of JAK2 and STATs are believed to mediate neoplastic transformation and promote abnormal cell proliferation in various malignancies.

In this review, we will discuss a number of deregulation of tyrosine kinase JAK2 associated with hematopoietic neoplasia and will focus on inducible negative regulators and their implication in oncogenesis.

1.1. JAK/STAT signaling pathways

JAK tyrosine kinases play critical roles in cytokine signaling in haematopoietic cells. Activation of JAKs occurs as a consequence of ligand-induced aggregation of receptor-associated JAKs and their subsequent autophosphorylation. JAKs are involved in the signal transduction of type I receptors (i.e. for IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL13, GM-CSF, GH, PRL, EPO and TPO) as well as of type II cytokine receptors (for IFN- α , - β , - γ). Four human JAKs have been identified: JAK1, JAK2, JAK3 and TYK2. JAKs share common domains, termed JAK homology (JH) domains 1-7, numbered from the C- to the N-terminus (Fig. 1). The JH7 domain associates with the proline rich conserved region in cytokine receptors termed Box1, while the JH1

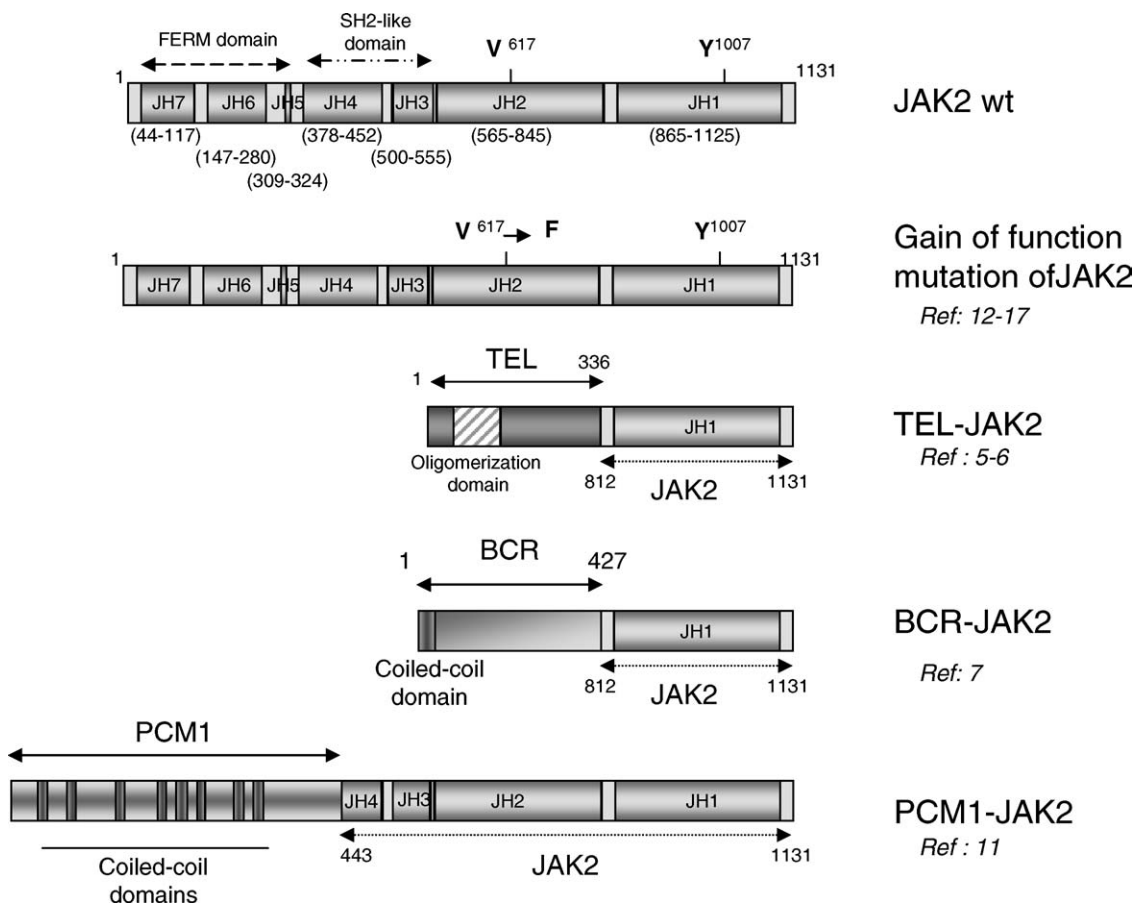


Fig. 1 – Schematic representation of JAK2, somatic point mutation of JAK2, TEL-JAK2, BCR-JAK2, and PCM1-JAK2 fusion proteins. Proteins are represented with their functional domains and motifs (grey boxes on PCM1 and BCR correspond to coiled-coils, shaded box on TEL to oligomerization domain). JH1-7 are the different domain of JAK2, with JH1 and JH2 corresponding to the kinase and the pseudokinase domain respectively.

Table 1 – Molecular abnormalities of regulators of JAK/STAT pathways frequently detected in myeloproliferative disorders

Molecular abnormality	Disease
PTPN11 mutations	Juvenile myelomonocytic leukaemia (JMML) [39] Myelodysplastic syndrome (MDS) Childhood acute myeloid leukaemia (AML)
Loss of PIAS3 expression	Anaplastic lymphoma kinase-positive T/null-cell lymphoma (ALK ⁺ TCL) [52]
Loss of PIASy expression	Myelodysplastic syndrome (MDS) [53]
Mutations of <i>socs-1</i>	Primary mediastinal B-cell lymphoma [101]
Loss of SOCS-1 expression	Primary mediastinal B-cell lymphoma [102]

domain carries the catalytic phosphotyrosine kinase domain [1]. The function of JH2 domain, which is a pseudokinase domain, is not completely defined, but there is growing evidence that it regulates both the basal activity of the JAK kinase and receptor induced activation of the catalytic function [2]. The JH3–JH4 region shares some similarity with SH2 domains but lacks phosphotyrosine binding ability, and the JH4–JH7 region constitutes the band 4.1 domain [also known as FERM domain (four-point-one, Ezrin, Radixin, Moesin)] [3,4]. The FERM domain is involved in the interactions between JAKs and other kinases. The only JAK family member known so far to be involved in human leukaemia is JAK2 (Table 1).

Two fusion genes that involve the JH1 domain of JAK2 have been described, the first one being *ETV6/TEL-JAK2*, which arises as a consequence of a t(9;12) in patients with chronic myeloproliferative diseases or acute lymphoblastic leukaemias [5,6]. The second one *BCR-JAK2* was observed in a single individual with atypical chronic myelogenous leukaemia (CML) [7]. The amino-terminal region of TEL contains the pointed (PNT) domain, which mediates oligomerization of TEL fusion proteins [8]. Similarly, BCR has been shown to contain an oligomerization motif which is required to activate the BCR fusion proteins [9]. Another translocation fuses the *PCM1* gene to the *JAK2* gene in patients with atypical CML and related myeloproliferative disorders, but in this case the *PCM1-JAK2* fusion protein implicates the JH1 and JH2 domain of JAK2 [10,11] (Fig. 1).

JAK2 kinase has been also described to be activated as the result of somatic point mutation in JH2 domain (Val⁶¹⁷Phe) in myeloproliferative disorders (MPD) (such as polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET) or myelofibrosis with myeloid metaplasia (MMM), atypical MPD and myeloproliferative syndrome [12–17]) (Fig. 1). The pseudo kinase suppressed basal JAK2 activity by lowering the V_{max} of the kinase domain but does not affect the K_m value. Three inhibitory regions, namely IR1 (residues 619–670), IR2 (725–757) and IR3 (758–807), have been defined in the pseudokinase domain [2]. Val⁶¹⁷ is just N-terminal to IR1 and is conserved in JAK2 ortholog of various animals from fish, frog, bird to mice [17]. One can predict that the replacement of Val by Phe in JAK2 should cause major conformation changes. This may disrupt the inhibitory function of the pseudokinase domain and thus cause deregulation of the kinase domain. Functional analysis

demonstrates that this mutation confers cytokine-independent growth in vitro, deregulates signaling pathways downstream of JAK2 and causes autonomous proliferation in a murine model.

Fused to a “dimerizing” protein such as TEL, BCR or PCM1, JAK2 is probably more strongly activated than that which occurs as a consequence of Val⁶¹⁷Phe mutation. This dimerization leads to diseases such as acute leukaemia or CML which are more aggressive than PV or ET. The chromosomal region containing *JAK2* gene has been also described to be amplified in Hodgkin’s lymphomas [18].

In normal physiological conditions, activated JAKs phosphorylate additional targets, including both the receptor itself and the STATs. STATs are latent transcription factors that reside in the cytoplasm until they become activated by tyrosine phosphorylation. Activated STATs rapidly translocate into the nucleus, where they bind to specific sequences in the promoter regions of their target genes and stimulate their transcription [19]. STATs, like many signal-responsive transcription factors, are found to be regulated by coactivators belonging to the histone acetyl transferases involved in chromatin remodelling [20,21]. The terminal transactivation domain of some STATs contains a serine residue that can modulate the transcriptional activity of STAT [22] and seems to be important in coregulator recruitment, which interacts either directly or through other coactivator proteins [23,24].

The role of constitutively activated STATs, particularly STAT3 and STAT5, in cellular transformation has been established by in vitro and in vivo studies and is extensively reviewed elsewhere [25 and references herein]. The mechanisms by which activated STAT can promote tumourigenesis, appear to be involved at least in part, in deregulated cell growth and/or prevention of apoptosis [26]. Activated STAT3, observed in ovarian cancer cell, is localized not only to nuclei but also to focal adhesion in these cells and may therefore contribute to enhanced cell invasiveness [27]. The reports that STAT1-deficient mice develop spontaneous and chemically induced tumours more rapidly compared to wild-type mice and that STAT1-deficient cells are more resistant to agents that induce apoptosis strongly support the argument that STAT1 acts as a tumour suppressor [28].

2. Regulation of STAT activity

2.1. Constitutive suppressors

2.1.1. Tyrosine phosphatases

As STATs are activated by tyrosine phosphorylation, phosphotyrosine phosphatases are likely to play a role in STAT deactivation. Three families of tyrosine phosphatases are implicated in negative regulation of JAK/STAT signaling pathways.

The first to be described were the SH2-containing tyrosine phosphatases that include SHP1 (previously named PTP1C) and SHP2 (previously named PTP1D). These phosphatases are characterized by the presence of two SH2 domains N-terminal of the canonical 250 amino-acid-long tyrosine phosphatase domain. These enzymes are mainly cytoplasmic; their SH2 domains allow association with phospho-tyrosines present on

activated receptors or on signaling molecules as well as on activated JAKs. This association triggers activation of the phosphatase domain and the subsequent dephosphorylation of the substrate. In case of a receptor, STATs will no longer be recruited to it and thus will no longer be phosphorylated and activated. SHP1 is mainly expressed in hematopoietic cells but it is also present in epithelial or smooth muscle cells [29], as opposed to SHP2 which is ubiquitously expressed. SHP1 and SHP2 shared 55% homology at the protein level. Mice deficient for SHP1 display important immunological and hematopoietic dysfunctions, and hyperphosphorylation of JAK1 and JAK2 following IFN α , GH or EPO treatment was observed. This gene is frequently altered in cancer cells. Hypermethylation of normally unmethylated CpG islands of tumour suppressor genes is associated with transcriptional silencing and thus is assumed to play an important role in cancer development and progression [30,31]. High-frequency silencing of haematopoietic cell-specific protein tyrosine phosphatase *shp-1* gene by promoter methylation was detected in various kinds of leukaemia and lymphomas [32,33], myeloma [34] and acute myeloid leukaemia [35].

Deletion of SHP2 gene is embryonic lethal for mice, thus revealing a major role for SHP2 in development. SHP2 can inhibit signaling from IL6 and gp130-containing receptors, but SHP2 can also function as a positive factor by stabilizing JAK2 protein or inducing src kinase activation [36]. Mutations of SHP2 (PTPN11), occur in ~50% of individuals with Noonan syndrome. Some of these patients develop myeloproliferative disease, which usually resolves but can develop into leukaemia (Table 1) [37–39].

The second type of tyrosine phosphatase that was reported to negatively affect JAK/STAT signaling pathways is the transmembrane tyrosine phosphatase CD45. CD45 is expressed in hematopoietic cells [40]. It exhibits two phosphatase domains in its intracellular part, but only one seems to be active. CD45 regulates T-cell and B-cell antigen receptor signals in T and B lymphocytes [41]. Mice deficient for CD45 show hyperactivation of JAK1 and JAK3, associated with a loss of antigen responses in T and B lymphocytes. However, CD45 has no major effect on cytokine signaling. Moreover, both the SHPs and CD45 do not directly associate with the JAK kinase domain, suggesting that other tyrosine phosphatases may deactivate the JAKs.

The PTP1B (Phospho-Tyrosine Phosphatase 1B) and TC-PTP (T Cell Protein Tyrosine Phosphatase) tyrosine phosphatases show great similarities in their catalytic domain. PTP1B is expressed in many tissues and is located on the cytosolic face of the endoplasmic reticulum due to a hydrophobic sequence at its C-terminal end [42]. TC-PTP is mainly hematopoietic and alternative splicing of its gene allows expression of two distinct proteins, a p45 nuclear form called TC45 or TC-PTP α , and a p48 cytoplasmic form called TC48 or TC-PTP β . Both PTP1B and TC-PTP selectively recognize a motif centered on the characteristic double tyrosine residues present in the JAK activation loop, but each exhibits different specificity for surrounding residues: PTP1B only interacts with the D/E-pYpY-K/R sequence present in JAK2 and TYK2 while TC-PTP interacts with the D/E-pYpY-T/V sequence present in JAK1 and JAK3. This interaction leads to selective JAK dephosphorylation and subsequent deactivation. In addition, the nuclear

TC45/TC-PTP β is responsible for deactivation of nuclear STAT1 and STAT3, and probably also STAT5 [43]. In accordance with these observations, mice deficient for PTP1B showed hyperphosphorylation of JAK2, while the absence of functional TC-PTP in mice induces anemia and splenomegaly responsible for perinatal death of the animals.

2.1.2. Protein inhibitors of activated STATs (PIAS)

Mammalian protein inhibitors of activated STAT (PIAS) were initially identified as negative regulators of STAT signaling. The PIAS family consists of PIAS1, PIAS3, PIASx and PIASy (for review see [44]). Recent studies indicate that PIAS have a small ubiquitin-like modifier (SUMO)-E3-ligase activity (for review see [45]). Co-immunoprecipitation assays have shown that PIAS3 and PIASx interact with STAT3 and STAT4 respectively, while PIAS1 and PIASy are able to interact with STAT1 [45]. These PIAS-STAT interactions negatively regulate the activity of the specific STAT(s) in the complex. It seems that the SUMO E3 ligase activity of STAT is not implicated in the regulation of STAT. It has been proposed that PIAS1 and PIAS3 function by blocking the DNA binding activity of STAT1 and STAT3 respectively [46,47]. In contrast PIASx and PIASy repress the transcriptional activity of STAT1 and STAT4 by recruiting corepressor molecules such as histone deacetylases (HDACs) [48,49]. Gene-targeting studies in mice have been carried out to understand the physiological functions of PIAS proteins in cytokine signaling. *Pias1*^{-/-} mouse embryonic fibroblasts showed an unexpected specificity in gene regulation. After stimulation by IFN, the removal of PIAS1 results in the increased expression of only some IFN-induced genes [50]. It has been shown that the differential effect of PIAS1 on the binding of STAT1 to the promoters of STAT1 target genes contributes to the observed PIAS1 specificity. PIAS1 has more profound effects on genes containing weak STAT1-binding sites than on genes containing a strong STAT1-binding site. In contrast no alteration of IFN responsive genes was observed in *piasy*^{-/-} cells which can be the result of redundancy in PIAS proteins [51].

Cells derived from patients with anaplastic lymphoma kinase-positive T/null-cell lymphoma which express the nucleophosmin (NPM)/ALK chimeric kinase as the result of a translocation show continuous activation of STAT3 due to the loss of PIAS3 (Table 1) [52]. Furthermore DNA microarray analysis indicate that *piasy* is active in normal hematopoietic stem cells (HSC) or pluripotent stem cells in the indolent stage of myelodysplastic syndrome (MDS), but that the expression of the gene is suppressed in the cells on transition to the advanced stage of MDS (Table 1) [53]. This indicates that the loss of *piasy* may therefore contribute directly to the growth of MDS blasts and stage progression.

2.2. Inducible suppressors: suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins

In addition to the constitutive negative regulators of cytokine signaling, the inducible SH2 containing proteins belonging to the SOCS family have been described. Cytokine-inducible SH2 containing protein (CIS) was the first member of the family identified, as an immediate-early gene product induced by IL-2, IL-3 and EPO [54]. CIS then binds to

phosphorylated Y401 of the EPO receptor, the binding site for STAT5, thereby suppressing STAT5-mediated signaling [55]. Subsequently, three groups identified a protein similar to CIS, termed Suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS-1), JAK-Binding protein (JAB), and STAT-induced STAT Inhibitor-1 (SSI-1) [56-58]. SOCS proteins are a family of at least eight members which bind through their SH2 domain to phosphotyrosine residues either in cytokine receptors (in the case of SOCS-2, SOCS-3, and CIS) [54,59,60] or JAKs (in the case of SOCS-1) [57]. They can suppress cytokine signaling either by inhibiting the activity of JAKs, or by competition with STATs for phosphorylated docking sites on the receptors, or by targeting bound signaling proteins to the ubiquitin proteasome pathway through the SOCS box, which is part of an E3 ubiquitin ligase [61]. Thus, the SOCS box may act as a bridge between SOCS-SH2 interacting proteins and E3 ubiquitin ligase, and regulate protein turnover by targeting proteins for polyubiquitination and proteasome-mediated degradation. SOCS-1 can ubiquitinate and regulate the half life of VAV [62], of JAK [63-65], the IRS1 and IRS2 adaptor proteins [66]. It has been observed that SOCS proteins also promote polyubiquitination and degradation of Focal Adhesion Kinase (FAK) in a SOCS box-dependent manner and inhibit FAK-dependent signaling events [67].

The level of SOCS-1 seems to be tightly controlled at different level. Transcription of *socs-1* mRNA is rapidly induced by many cytokines. The presence of GAS elements in the proximal region of CIS, SOCS-1 or SOCS-3 promoters has been described by several laboratories, the implication of the activated STAT in their regulation has been shown upon EPO, IFN and IL-4 stimulation [68-71].

It has been also reported that SOCS-1 protein stability is tightly regulated. Stabilization of SOCS proteins by inhibitors of the proteasome, suggests that cells may regulate SOCS-1 level through the proteasome pathway [72]. Association of Elongin BC and the SOCS box has been suggested to alter the stability of the SOCS-1 protein. A recent report indicates that SOCS-1 is found to colocalize and biochemically copurify with the microtubule organizing complex (MTOC) and its associated 20S proteasome. SOCS-1 may target JAK1, in a SH2 dependent manner, to a perinuclear location resembling the MTOC-associated 20S proteasome, this observation was only shown in the case of overexpression of the two proteins SOCS-1 with JAK1 [73]. Phosphorylation by PIM kinases prolongs the half-life of the SOCS-1 protein and potentiates the inhibitory effect of SOCS-1 on JAK-STAT activation [74].

SOCS-1 may function as a tumour suppressor gene and its down regulation may contribute to tumour progression [75]. Overexpression of SOCS-1 suppresses the growth of cells transformed either by an oncogenic form of the KIT receptor or by the TEL-JAK2 fusion protein, but implicates different function of SOCS-1 proteins, since the presence of SH2 domain of SOCS-1 is required for the inhibition of TEL-JAK2, whereas it is not required for the inhibition of KIT [76]. Direct transcriptional repression of the *socs-1* tumour suppressor gene by proto-oncoproteins has been described either for the transcriptional repressor GFI-1B [77] or the transcription factor ETS-1 [71]. More recently it has been shown that the hepatitis C virus (HCV) core protein down regulates the expression of *socs-1* gene, by interfering with the intracel-

lular signaling pathway, and may thus contribute to the pathogenesis in HCV infection including hepatocarcinogenesis [78].

In the exploration of the mechanisms underlying the down-regulation of *socs-1* gene, it has been reported that the silencing of the *socs-1* gene by hypermethylation is associated with the development of hepatocellular carcinoma [79-81]. Methylation of CpG islands in the region of tumour suppressor genes induces a block to transcriptional initiation. The sites responsible for silencing tumour suppressor genes generally reside in the promoter (or 5' UTR) region. However some exceptional observations have been reported, where these sites are located in exons or introns [82]. In the case of the *socs-1* gene, hypermethylation occurs also inside the translated exon2. Subsequent studies found hypermethylation of *socs-1* in different solid tumours [83-89] as well as in haematopoietic diseases [90-97]. In most cases, the restoration of SOCS-1 in cell lines suppressed cell growth. The inactivation of *socs-1* gene by aberrant methylation leads, at least partially, to an activation of effectors of JAK/STAT pathways [97]. The finding that *socs-1* is frequently silenced in malignancies, mainly as a result of hypermethylation, reinforced the idea that *socs-1* may function as a tumour suppressor gene. The expression of *socs-3*, which shows the highest homology to *socs-1*, has also been reported to be invalidated by methylation in hepatocellular carcinoma. The loss of *socs-3* expression confers cell advantage in growth and migration by enhancing JAK/STAT and FAK signaling [98]. *socs-3* methylation is also frequently observed in head and neck squamous cell carcinoma [99] and as for all the previous described examples it is associated with activation of the JAK/STAT pathway and of expression of downstream target genes.

Recently, amplification of the JAK2 gene and constitutive phosphorylation of JAK2 in primary mediastinal large B-cell lymphoma (MedB-1 cell line) has been described [100]. The constitutive activation is not associated with an overexpression at the protein level, but is due to delayed protein degradation. This is caused by a biallelic mutation of SOCS-1 which abrogates SOCS box function of the protein [101]. Thus the assumption is that mutated and loss of function of *socs-1* might be the cause for sustained activation and low turnover of JAK2. A large biallelic chromosomal deletion on 16p13.13 including the entire SOCS-1 gene was observed in Karpas 1106P, another primary mediastinal large B-cell lymphoma cell line [102]. In addition the simultaneous loss of function by gene methylation of *shp-1* and *socs-1* is observed in the pathogenesis of myeloma [34].

Constitutive activation of JAK/STAT pathways or inactivation of negative regulators of JAK/STAT pathways is observed in several myeloproliferative diseases. Although activation of JAK/STAT pathways leads to enhanced expression of *socs-1*, constitutive activation of JAK2 by either point mutation or by fusion proteins exhibit transforming properties often linked to STAT activation [5,75,103]. Escape from the SOCS-1 negative feedback could be due to the nature of the JAK2 fusion protein in which the JH1 conformation might be different from the wild type JAK2. The connection between aberrant activation of JAK/STAT pathways and silencing of *socs-1* is not demonstrated even though it is tempting to speculate that the events leading to most aggressive

pathologies might implicate at the same time deregulation of positive and negative regulators of JAK/STAT pathways.

3. Conclusion

Negative regulation of signal transduction is necessary for an appropriate cellular and physiological response to cytokine stimulation. Over the past few years, several different mechanisms by which cytokine signaling is attenuated have been identified. The discovery of oncogenic partner in this signaling pathway, more especially in diverse hematologic malignancies supports a prominent role of deregulated pathways in the pathogenesis of diseases. The functional relationship between JAK2 activation and SOCS-1 hypermethylation remains speculative, but they may collaborate in pathogenesis.

Acknowledgements

We thank Jacques Bertoglio, Isabelle Dusanter-Fourt, and Joel Raingeaud for helpful discussion and critical reading of the manuscript. The authors were supported by the French ministry of research fellowship for L.V. and by funds from INSERM.

REFERENCES

- [1] Leonard WJ, O'Shea JJ. Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol* 1998;16:293–322.
- [2] Saharinen P, Takaluoma K, Silvennoinen O. Regulation of the Jak2 tyrosine kinase by its pseudokinase domain. *Mol Cell Biol* 2000;20:3387–95.
- [3] Girault JA, Labesse G, Mornon JP, Callebaut I. Janus kinases and focal adhesion kinases play in the 4.1 band: a superfamily of band 4.1 domains important for cell structure and signal transduction. *Mol Med* 1998;4:751–69.
- [4] Kampa D, Burnside J. Computational and functional analysis of the putative SH2 domain in Janus Kinases. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;278:175–82.
- [5] Lacronique V, Boureux A, Valle VD, Poirel H, Quang CT, Mauchauffe M, et al. A TEL-JAK2 fusion protein with constitutive kinase activity in human leukaemia. *Science* 1997;278:1309–12.
- [6] Peeters P, Raynaud SD, Cools J, Wlodarska I, Grosgeorge J, Philip P, et al. Fusion of TEL, the ETS-variant gene 6 (ETV6), to the receptor-associated kinase JAK2 as a result of t(9;12) in a lymphoid and t(9;15;12) in a myeloid leukemia. *Blood* 1997;90:2535–40.
- [7] Griesinger F, Hennig H, Hillmer F, Podleschny M, Steffens R, Pies A, et al. A BCR-JAK2 fusion gene as the result of a t(9;22)(p24;q11.2) translocation in a patient with a clinically typical chronic myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2005;44:329–33.
- [8] Golub TR, Goga A, Barker GF, Afar DE, McLaughlin J, Bohlander SK, et al. Oligomerization of the ABL tyrosine kinase by the Ets protein TEL in human leukemia. *Mol Cell Biol* 1996;16:4107–16.
- [9] McWhirter JR, Galasso DL, Wang JY. A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins. *Mol Cell Biol* 1993;13:7587–95.
- [10] Reiter A, Walz C, Watmore A, Schoch C, Blau I, Schlegelberger B, et al. The t(8;9)(p22;p24) is a recurrent abnormality in chronic and acute leukemia that fuses PCM1 to JAK2. *Cancer Res* 2005;65:2662–7.
- [11] Bousquet M, Quelen C, De Mas V, Duchayne E, Roquefeuil B, Delsol G, et al. The t(8;9)(p22;p24) translocation in atypical chronic myeloid leukaemia yields a new PCM1-JAK2 fusion gene. *Oncogene* 2005;24:7248–52.
- [12] Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005;365:1054–61.
- [13] James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005;434:1144–8.
- [14] Steensma DP, Dewald GW, Lasho TL, Powell HL, McClure RF, Levine RL, et al. The JAK2 V617F activating tyrosine kinase mutation is an infrequent event in both “atypical” myeloproliferative disorders and the myelodysplastic syndrome. *Blood* 2005;106:1207–9.
- [15] Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005;352:1779–90.
- [16] Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 2005;7:387–97.
- [17] Zhao R, Xing S, Li Z, Fu X, Li Q, Krantz SB, et al. Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. *J Biol Chem* 2005;280:22788–92.
- [18] Joos S, Granzow M, Holtgreve-Grez H, Siebert R, Harder L, Martin-Subero JI, et al. Hodgkin's lymphoma cell lines are characterized by frequent aberrations on chromosomes 2p and 9p including REL and JAK2. *Int J Cancer* 2003;103:489–95.
- [19] Darnell Jr JE. STATs and gene regulation. *Science* 1997;277:1630–5.
- [20] Horvai AE, Xu L, Korzus E, Brard G, Kalafus D, Mullen TM, et al. Nuclear integration of JAK/STAT and Ras/AP-1 signaling by CBP and p300. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:1074–9.
- [21] Zhang JJ, Vinkemeier U, Gu W, Chakravarti D, Horvath CM, Darnell Jr JE. Two contact regions between Stat1 and CBP/p300 in interferon gamma signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:15092–6.
- [22] Decker T, Kovarik P. Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene* 2000;19:2628–37.
- [23] Litterst CM, Pfitzner E. An LXXLL motif in the transactivation domain of STAT6 mediates recruitment of NCoA-1/SRC-1. *J Biol Chem* 2002;277:36052–60.
- [24] Valineva T, Yang J, Palovuori R, Silvennoinen O. The transcriptional co-activator protein p100 recruits histone acetyltransferase activity to STAT6 and mediates interaction between the CREB-binding protein and STAT6. *J Biol Chem* 2005;280:14989–96.
- [25] Bromberg J. Stat proteins and oncogenesis. *J Clin Invest* 2002;109:1139–42.
- [26] Catlett-Falcone R, Landowski TH, Oshiro MM, Turkson J, Levitzki A, Savino R, et al. Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* 1999;10:105–15.
- [27] Silver DL, Naora H, Liu J, Cheng W, Montell DJ. Activated signal transducer and activator of transcription (STAT) 3 localization in focal

- adhesions and function in ovarian cancer cell motility. *Cancer Res* 2004;64:3550–8.
- [28] Stephanou A, Latchman DS. STAT-1: a novel regulator of apoptosis. *Int J Exp Pathol* 2003;84:239–44.
- [29] Banville D, Stocco R, Shen SH. Human protein tyrosine phosphatase 1C (PTPN6) gene structure: alternate promoter usage and exon skipping generate multiple transcripts. *Genomics* 1995;27:165–73.
- [30] Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 2003;349:2042–54.
- [31] Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 1999;21:163–7.
- [32] Oka T, Ouchida M, Koyama M, Ogama Y, Takada S, Nakatani Y, et al. Gene silencing of the tyrosine phosphatase SHP1 gene by aberrant methylation in leukemias/lymphomas. *Cancer Res* 2002;62:6390–4.
- [33] Zhang Q, Wang HY, Marzec M, Raghunath PN, Nagasawa T, Wasik MA. STAT3- and DNA methyltransferase 1-mediated epigenetic silencing of SHP-1 tyrosine phosphatase tumor suppressor gene in malignant T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:6948–53.
- [34] Chim CS, Fung TK, Cheung WC, Liang R, Kwong YL. SOCS1 and SHP1 hypermethylation in multiple myeloma: implications for epigenetic activation of the Jak/STAT pathway. *Blood* 2004;103:4630–5.
- [35] Johan MF, Bowen DT, Frew ME, Goodeve AC, Reilly JT. Aberrant methylation of the negative regulators RASSF1A SHP-1 and SOCS-1 in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2005;129:60–5.
- [36] Fischer P, Lehmann U, Sobota RM, Schmitz J, Niemand C, Linnemann S, et al. The role of the inhibitors of interleukin-6 signal transduction SHP2 and SOCS3 for desensitization of interleukin-6 signalling. *Biochem J* 2004;378:449–60.
- [37] Johannes JM, Garcia ER, De Vaan GA, Weening RS. Noonan's syndrome in association with acute leukaemia. *Pediatr Hematol Oncol* 1995;12:571–5.
- [38] Araki T, Mohi MG, Ismat FA, Bronson RT, Williams IR, Kutok JL, et al. Mouse model of Noonan syndrome reveals cell type- and gene dosage-dependent effects of Ptpn11 mutation. *Nat Med* 2004;10:849–57.
- [39] Tartaglia M, Niemeyer CM, Fragale A, Song X, Buechner J, Jung A, et al. Somatic mutations in PTPN11 in juvenile myelomonocytic leukemia, myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Nat Genet* 2003;34:148–50.
- [40] Trowbridge IS, Thomas ML. CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Annu Rev Immunol* 1994;12:85–116.
- [41] Hermiston ML, Xu Z, Weiss A. CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu Rev Immunol* 2003;21:107–37.
- [42] Frangioni JV, Beahm PH, Shifrin V, Jost CA, Neel BG. The nontransmembrane tyrosine phosphatase PTP-1B localizes to the endoplasmic reticulum via its 35 amino acid C-terminal sequence. *Cell* 1992;68:545–60.
- [43] ten Hoeve J, de Jesus Ibarra-Sanchez M, Fu Y, Zhu W, Tremblay M, David M, et al. Identification of a nuclear Stat1 protein tyrosine phosphatase. *Mol Cell Biol* 2002;22:5662–8.
- [44] Schmidt D, Muller S. Members of the PIAS family act as SUMO ligases for c-Jun and p53 and repress p53 activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:2872–7.
- [45] Shuai K, Liu B. Regulation of gene-activation pathways by PIAS proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2005;5:593–605.
- [46] Liu B, Liao J, Rao X, Kushner SA, Chung CD, Change DD, et al. Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:10626–31.
- [47] Chung CD, Liao J, Liu B, Rao X, Jay P, Perte P, et al. Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science* 1997;278:1803–5.
- [48] Liu B, Gross M, ten Hoeve J, Shuai K. A transcriptional corepressor of Stat1 with an essential LXXLL signature motif. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:3203–7.
- [49] Aurora T, Liu B, He H, Kim J, Murphy TL, Murphy KM, et al. PIASx is a transcriptional co-repressor of signal transducer and activator of transcription 4. *J Biol Chem* 2003;278:21327–30.
- [50] Liu B, Mink S, Wong KA, Stein N, German C, Dempsey PW, et al. PIAS1 selectively inhibits interferon-inducible genes and is important in innate immunity. *Nat Immunol* 2004;5:891–8.
- [51] Roth W, Dustman C, Kieslinger M, Gilmozzi A, Irmer D, Kremmer E, et al. PIASy-deficient mice display modest defects in IFN and Wnt signalling. *J Immunol* 2004;173:6189–99.
- [52] Zhang Q, Raghunath PN, Xue L, Majewski M, Carpentieri DF, Odum N, et al. Multilevel dysregulation of STAT3 activation in anaplastic lymphoma kinase-positive T/null-cell lymphoma. *J Immunol* 2002;168:466–74.
- [53] Ueda M, Ota J, Yamashita Y, Choi YL, Ohki R, Wada T, et al. DNA microarray analysis of stage progression mechanism in myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* 2003;123:288–96.
- [54] Yoshimura A, Ohkubo T, Kiguchi T, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, et al. A novel cytokine-inducible gene CIS encodes an SH2-containing protein that binds to tyrosine-phosphorylated interleukin 3 and erythropoietin receptors. *Embo J* 1995;14:2816–26.
- [55] Verdier F, Chretien S, Muller O, Varlet P, Yoshimura A, Gisselbrecht S, et al. Proteasomes regulate erythropoietin receptor and signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) activation. Possible involvement of the ubiquitinated Cis protein. *J Biol Chem* 1998;273:28185–90.
- [56] Starr R, Willson TA, Viney EM, Murray LJ, Rayner JR, Jenkins BJ, et al. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 1997;387:917–21.
- [57] Endo TA, Masuhara M, Yokouchi M, Suzuki R, Sakamoto H, Mitsui K, et al. A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature* 1997;387:921–4.
- [58] Naka T, Narazaki M, Hirata M, Matsumoto T, Minamoto S, Aono A, et al. Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature* 1997;387:924–9.
- [59] Schmitz J, Weissenbach M, Haan S, Heinrich PC, Schaper F. SOCS3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130. *J Biol Chem* 2000;275:12848–56.
- [60] Greenhalgh CJ, Metcalf D, Thaus AL, Corbin JE, Uren R, Morgan PO, et al. Biological evidence that SOCS-2 can act either as an enhancer or suppressor of growth hormone signaling. *J Biol Chem* 2002;277:40181–4.
- [61] Kile BT, Schulman BA, Alexander WS, Nicola NA, Martin HM, Hilton DJ. The SOCS box: a tale of destruction and degradation. *Trends Biochem Sci* 2002;27:235–41.
- [62] De Sepulveda P, Okkenhaug K, Rose JL, Hawley RG, Dubreuil P, Rottapel R. Socs1 binds to multiple signalling proteins and suppresses steel factor-dependent proliferation. *Embo J* 1999;18:904–15.
- [63] Ungureanu D, Saharinen P, Junttila I, Hilton DJ, Silvennoinen O. Regulation of Jak2 through the ubiquitin-proteasome pathway involves phosphorylation of Jak2

- on Y1007 and interaction with SOCS-1. *Mol Cell Biol* 2002;22:3316–26.
- [64] Kamizono S, Hanada T, Yasukawa H, Minoguchi S, Kato R, Minoguchi M, et al. The SOCS box of SOCS-1 accelerates ubiquitin-dependent proteolysis of TEL-JAK2. *J Biol Chem* 2001;276:12530–8.
- [65] Frantsve J, Schwaller J, Sternberg DW, Kutok J, Gilliland DG. Socs-1 inhibits TEL-JAK2-mediated transformation of hematopoietic cells through inhibition of JAK2 kinase activity and induction of proteasome-mediated degradation. *Mol Cell Biol* 2001;21:3547–57.
- [66] Rui L, Yuan M, Frantz D, Shoelson S, White MF. SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. *J Biol Chem* 2002;277:42394–8.
- [67] Liu E, Cote JF, Vuori K. Negative regulation of FAK signaling by SOCS proteins. *Embo J* 2003;22:5036–46.
- [68] Verdier F, Rabionet R, Gouilleux F, Beisenherz-Huss C, Varlet P, Muller O, et al. A sequence of the CIS gene promoter interacts preferentially with two associated STAT5A dimers: a distinct biochemical difference between STAT5A and STAT5B. *Mol Cell Biol* 1998;18:5852–60.
- [69] Saito H, Morita Y, Fujimoto M, Narazaki M, Naka T, Kishimoto T. IFN regulatory factor-1-mediated transcriptional activation of mouse STAT-induced STAT inhibitor-1 gene promoter by IFN-gamma. *J Immunol* 2000;164:5833–43.
- [70] Hebenstreit D, Luft P, Schmiedlechner A, Regl G, Frischau AM, Aberger F, et al. IL-4 and IL-13 Induce SOCS-1 Gene Expression in A549 Cells by Three Functional STAT6-Binding Motifs Located Upstream of the Transcription Initiation Site. *J Immunol* 2003;171:5901–7.
- [71] Travaglini J, Letourneur M, Bertoglio J, Pierre J. STAT6 and Ets-1 form a stable complex that modulates SOCS-1 expression by IL-4 in keratinocytes. *J Biol Chem* 2004;279:35182–9.
- [72] Zhang JG, Farley A, Nicholson SE, Willson TA, Zugaro LM, Simpson RJ, et al. The conserved SOCS box motif in suppressors of cytokine signaling binds to elongins B and C and may couple bound proteins to proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;96:2071–6.
- [73] Vuong BQ, Arenzana TL, Showalter BM, Losman J, Chen XP, Mostecky J, et al. SOCS-1 localizes to the microtubule organizing complex-associated 20S proteasome. *Mol Cell Biol* 2004;24:9092–101.
- [74] Chen XP, Losman JA, Cowan S, Donahue E, Fay S, Vuong BQ, et al. Pim serine/threonine kinases regulate the stability of Socs-1 protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:2175–80.
- [75] Kishimoto T, Kikutani H. Knocking the SOCS off a tumor suppressor. *Nat Genet* 2001;28:4–5.
- [76] Rottapel R, Ilangumaran S, Neale C, La Rose J, Ho JM, Nguyen MH, et al. The tumor suppressor activity of SOCS-1. *Oncogene* 2002;21:4351–62.
- [77] Jegalian AG, Wu H. Regulation of Socs gene expression by the proto-oncoprotein GFI-1B: two routes for STAT5 target gene induction by erythropoietin. *J Biol Chem* 2002;277:2345–52.
- [78] Miyoshi H, Fujie H, Shintani Y, Tsutsumi T, Shinzawa S, Makuuchi M, et al. Hepatitis C virus core protein exerts an inhibitory effect on suppressor of cytokine signaling (SOCS)-1 gene expression. *J Hepatol* 2005;43:757–63.
- [79] Miyoshi H, Fujie H, Moriya K, Shintani Y, Tsutsumi T, Makuuchi M, et al. Methylation status of suppressor of cytokine signaling-1 gene in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 2004;39:563–9.
- [80] Yoshikawa H, Matsubara K, Qian GS, Jackson P, Groopman JD, Manning JE, et al. SOCS-1, a negative regulator of the JAK/STAT pathway, is silenced by methylation in human hepatocellular carcinoma and shows growth-suppression activity. *Nat Genet* 2001;28:29–35.
- [81] Okochi O, Hibi K, Sakai M, Inoue S, Takeda S, Kaneko T, et al. Methylation-mediated silencing of SOCS-1 gene in hepatocellular carcinoma derived from cirrhosis. *Clin Cancer Res* 2003;9:5295–8.
- [82] Li B, Goyal J, Dhar S, Dimri G, Evron E, Sukumar S, et al. CpG methylation as a basis for breast tumor-specific loss of NES1/kallikrein 10 expression. *Cancer Res* 2001;61:8014–21.
- [83] Fukushima N, Sato N, Sahin F, Su GH, Hruban RH, Goggins M. Aberrant methylation of suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS-1) gene in pancreatic ductal neoplasms. *Br J Cancer* 2003;89:338–43.
- [84] Nagai H, Naka T, Terada Y, Komazaki T, Yabe A, Jin E, et al. Hypermethylation associated with inactivation of the SOCS-1 gene, a JAK/STAT inhibitor, in human hepatoblastomas. *J Hum Genet* 2003;48:65–9.
- [85] Fujitake S, Hibi K, Okochi O, Kodera Y, Ito K, Akiyama S, et al. Aberrant methylation of SOCS-1 was observed in younger colorectal cancer patients. *J Gastroenterol* 2004;39:120–4.
- [86] Lin SY, Yeh KT, Chen WT, Chen HC, Chen ST, Chiou HY, et al. Promoter CpG methylation of tumor suppressor genes in colorectal cancer and its relationship to clinical features. *Oncol Rep* 2004;11:341–8.
- [87] Oshimo Y, Kuraoka K, Nakayama H, Kitadai Y, Yoshida K, Chayama K, et al. Epigenetic inactivation of SOCS-1 by CpG island hypermethylation in human gastric carcinoma. *Int J Cancer* 2004;112:1003–9.
- [88] Sutherland KD, Lindeman GJ, Choong DY, Wittlin S, Brentzell L, Phillips W, et al. Differential hypermethylation of SOCS genes in ovarian and breast carcinomas. *Oncogene* 2004;23:7726–33.
- [89] To KF, Chan MW, Leung WK, Ng EK, Yu J, Bai AH, et al. Constitutional activation of IL-6-mediated JAK/STAT pathway through hypermethylation of SOCS-1 in human gastric cancer cell line. *Br J Cancer* 2004;91:1335–41.
- [90] Chen CY, Tsay W, Tang JL, Shen HL, Lin SW, Huang SY, et al. SOCS1 methylation in patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2003;37:300–5.
- [91] Galm O, Yoshikawa H, Esteller M, Osieka R, Herman JG. SOCS-1, a negative regulator of cytokine signaling, is frequently silenced by methylation in multiple myeloma. *Blood* 2003;101:2784–8.
- [92] Liu TC, Lin SF, Chang JG, Yang MY, Hung SY, Chang CS. Epigenetic alteration of the SOCS1 gene in chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2003;123:654–61.
- [93] Uehara E, Takeuchi S, Tasaka T, Matsuhashi Y, Yang Y, Fujita M, et al. Aberrant methylation in promoter-associated CpG islands of multiple genes in therapy-related leukemia. *Int J Oncol* 2003;23:693–6.
- [94] Ekmekci CG, Gutierrez MI, Siraj AK, Ozbek U, Bhatia K. Aberrant methylation of multiple tumor suppressor genes in acute myeloid leukemia. *Am J Hematol* 2004;77:233–40.
- [95] Luo H, Rose P, Barber D, Hanratty WP, Lee S, Roberts TM, et al. Mutation in the Jak kinase JH2 domain hyperactivates Drosophila and mammalian Jak-Stat pathways. *Mol Cell Biol* 1997;17:1562–71.
- [96] Watanabe D, Ezoe S, Fujimoto M, Kimura A, Saito Y, Nagai H, et al. Suppressor of cytokine signaling-1 gene silencing in acute myeloid leukaemia and human haematopoietic cell lines. *Br J Haematol* 2004;126:726–35.
- [97] Brakensiek K, Langer F, Schlegelberger B, Kreipe H, Lehmann U. Hypermethylation of the suppressor of

- cytokine signalling-1 (SOCS-1) in myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* 2005;130:209-17.
- [98] Niwa Y, Kanda H, Shikauchi Y, Saiura A, Matsubara K, Kitagawa T, et al. Methylation silencing of SOCS-3 promotes cell growth and migration by enhancing JAK/STAT and FAK signalings in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2005;24:6406-17.
- [99] Weber A, Hengge UR, Bardenheuer W, Tischoff I, Sommerer F, Markwarth A, et al. SOCS-3 is frequently methylated in head and neck squamous cell carcinoma and its precursor lesions and causes growth inhibition. *Oncogene* 2005;24:6699-708.
- [100] Guiter C, Dusanter-Fourt I, Copie-Bergman C, Boulland ML, Le Gouvello S, Gaulard P, et al. Constitutive STAT6 activation in primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood* 2004;104:543-9.
- [101] Melzner I, Bucur AJ, Bruderlein S, Dorsch K, Hasel C, Barth TF, et al. Biallelic mutation of SOCS-1 impairs JAK2 degradation and sustains phospho-JAK2 action in the MedB-1 mediastinal lymphoma line. *Blood* 2005;105:2535-42.
- [102] Melzner I, Weniger MA, Bucur AJ, Bruderlein S, Dorsch K, Hasel C, et al. Biallelic deletion within 16p13.13 including SOCS-1 in Karpas1106P mediastinal B-cell lymphoma line is associated with delayed degradation of JAK2 protein. *Int J Cancer* 2005.
- [103] Lacronique V, Boureux A, Monni R, Dumon S, Mauchauffe M, Mayeux P, et al. Transforming properties of chimeric TEL-JAK proteins in Ba/F3 cells. *Blood* 2000;95:2076-83.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abou El Hassan, M., and Bremner, R. (2009). A rapid simple approach to quantify chromosome conformation capture. *Nucleic Acids Res* 37, e35.

Aguirre-Ghiso, J. A. (2007). Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer* 7, 834-846.

Ahmed, C. M., Dabelic, R., Waiboci, L. W., Jager, L. D., Heron, L. L., and Johnson, H. M. (2009). SOCS-1 mimetics protect mice against lethal poxvirus infection: identification of a novel endogenous antiviral system. *J Virol* 83, 1402-1415.

Ahmed, S., and Nawshad, A. (2007). Complexity in interpretation of embryonic epithelial-mesenchymal transition in response to transforming growth factor-beta signaling. *Cells Tissues Organs* 185, 131-145.

Aho, S., Levansuo, L., Montonen, O., Kari, C., Rodeck, U., and Uitto, J. (2002). Specific sequences in p120ctn determine subcellular distribution of its multiple isoforms involved in cellular adhesion of normal and malignant epithelial cells. *J Cell Sci* 115, 1391-1402.

Akira, S. (1999). Functional roles of STAT family proteins: lessons from knockout mice. *Stem Cells* 17, 138-146.

Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., and Clarke, M. F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 3983-3988.

Al-Sukhni, W., Aronson, M., and Gallinger, S. (2008). Hereditary colorectal cancer syndromes: familial adenomatous polyposis and lynch syndrome. *Surg Clin North Am* 88, 819-844, vii.

Albertson, D. G., Collins, C., McCormick, F., and Gray, J. W. (2003). Chromosome aberrations in solid tumors. *Nat Genet* 34, 369-376.

Alexander, W. S. (2002). Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2, 410-416.

Alexander, W. S., and Hilton, D. J. (2004). The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. *Annu Rev Immunol* 22, 503-529.

Alexander, W. S., Starr, R., Fenner, J. E., Scott, C. L., Handman, E., Sprigg, N. S., Corbin, J. E., Cornish, A. L., Darwiche, R., Owczarek, C. M., *et al.* (1999). SOCS1 is a critical inhibitor of interferon gamma signaling and prevents the potentially fatal neonatal actions of this cytokine. *Cell* 98, 597-608.

Ali, S., Nouhi, Z., Chughtai, N., and Ali, S. (2003). SHP-2 regulates SOCS-1-mediated Janus kinase-2 ubiquitination/degradation downstream of the prolactin receptor. *J Biol Chem* 278, 52021-52031.

Aman, M. J., Migone, T. S., Sasaki, A., Ascherman, D. P., Zhu, M., Soldaini, E., Imada, K., Miyajima, A., Yoshimura, A., and Leonard, W. J. (1999). CIS associates with the interleukin-2 receptor beta chain and inhibits interleukin-2-dependent signaling. *J Biol Chem* 274, 30266-30272.

Anastasiadis, P. Z., Moon, S. Y., Thoreson, M. A., Mariner, D. J., Crawford, H. C., Zheng, Y., and Reynolds, A. B. (2000). Inhibition of RhoA by p120 catenin. *Nat Cell Biol* 2, 637-644.

Andre, F., Cabioglu, N., Assi, H., Sabourin, J. C., Delalogue, S., Sahin, A., Broglio, K., Spano, J. P., Combadiere, C., Bucana, C., *et al.* (2006). Expression of chemokine receptors predicts the site of metastatic relapse in patients with axillary node positive primary breast cancer. *Ann Oncol* 17, 945-951.

Andreu, P., Colnot, S., Godard, C., Gad, S., Chafey, P., Niwa-Kawakita, M., Laurent-Puig, P., Kahn, A., Robine, S., Perret, C., and Romagnolo, B. (2005). Crypt-restricted proliferation and commitment to the Paneth cell lineage following Apc loss in the mouse intestine. *Development* 132, 1443-1451.

- Aoki, N., and Matsuda, T. (2002). A nuclear protein tyrosine phosphatase TC-PTP is a potential negative regulator of the PRL-mediated signaling pathway: dephosphorylation and deactivation of signal transducer and activator of transcription 5a and 5b by TC-PTP in nucleus. *Mol Endocrinol* *16*, 58-69.
- Arora, T., Liu, B., He, H., Kim, J., Murphy, T. L., Murphy, K. M., Modlin, R. L., and Shuai, K. (2003). PIASx is a transcriptional co-repressor of signal transducer and activator of transcription 4. *J Biol Chem* *278*, 21327-21330.
- Attisano, L., and Wrana, J. L. (2002). Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science* *296*, 1646-1647.
- Avizienyte, E., Wyke, A. W., Jones, R. J., McLean, G. W., Westhoff, M. A., Brunton, V. G., and Frame, M. C. (2002). Src-induced de-regulation of E-cadherin in colon cancer cells requires integrin signalling. *Nat Cell Biol* *4*, 632-638.
- Bach, E. A., Vincent, S., Zeidler, M. P., and Perrimon, N. (2003). A sensitized genetic screen to identify novel regulators and components of the Drosophila janus kinase/signal transducer and activator of transcription pathway. *Genetics* *165*, 1149-1166.
- Baetz, A., Koelsche, C., Strebovsky, J., Heeg, K., and Dalpke, A. H. (2008). Identification of a nuclear localization signal in suppressor of cytokine signaling 1. *Faseb J* *22*, 4296-4305.
- Banks, A. S., Li, J., McKeag, L., Hribal, M. L., Kashiwada, M., Accili, D., and Rothman, P. B. (2005). Deletion of SOCS7 leads to enhanced insulin action and enlarged islets of Langerhans. *J Clin Invest* *115*, 2462-2471.
- Banninger, G., and Reich, N. C. (2004). STAT2 nuclear trafficking. *J Biol Chem* *279*, 39199-39206.
- Barre, B., Avril, S., and Coqueret, O. (2003). Opposite regulation of myc and p21waf1 transcription by STAT3 proteins. *J Biol Chem* *278*, 2990-2996.
- Bates, R. C., and Mercurio, A. M. (2005). The epithelial-mesenchymal transition (EMT) and colorectal cancer progression. *Cancer Biol Ther* *4*, 365-370.
- Battle, E., Henderson, J. T., Beghtel, H., van den Born, M. M., Sancho, E., Huls, G., Meeldijk, J., Robertson, J., van de Wetering, M., Pawson, T., and Clevers, H. (2002). Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell* *111*, 251-263.
- Battle, E., Sancho, E., Franci, C., Dominguez, D., Monfar, M., Baulida, J., and Garcia De Herreros, A. (2000). The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* *2*, 84-89.
- Baylin, S. B., Esteller, M., Rountree, M. R., Bachman, K. E., Schuebel, K., and Herman, J. G. (2001). Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Hum Mol Genet* *10*, 687-692.
- Behrens, J., Lowrick, O., Klein-Hitpass, L., and Birchmeier, W. (1991). The E-cadherin promoter: functional analysis of a G.C-rich region and an epithelial cell-specific palindromic regulatory element. *Proc Natl Acad Sci U S A* *88*, 11495-11499.
- Bellido, T., O'Brien, C. A., Roberson, P. K., and Manolagas, S. C. (1998). Transcriptional activation of the p21(WAF1,CIP1,SDI1) gene by interleukin-6 type cytokines. A prerequisite for their pro-differentiating and anti-apoptotic effects on human osteoblastic cells. *J Biol Chem* *273*, 21137-21144.
- Bernet, A., and Fitamant, J. (2008). Netrin-1 and its receptors in tumour growth promotion. *Expert Opin Ther Targets* *12*, 995-1007.
- Berx, G., Becker, K. F., Hofler, H., and van Roy, F. (1998a). Mutations of the human E-cadherin (CDH1) gene. *Hum Mutat* *12*, 226-237.
- Berx, G., Cleton-Jansen, A. M., Strumane, K., de Leeuw, W. J., Nollet, F., van Roy, F., and Cornelisse, C. (1996). E-cadherin is inactivated in a majority of invasive human lobular breast

cancers by truncation mutations throughout its extracellular domain. *Oncogene* *13*, 1919-1925.

Berx, G., Nollet, F., and van Roy, F. (1998b). Dysregulation of the E-cadherin/catenin complex by irreversible mutations in human carcinomas. *Cell Adhes Commun* *6*, 171-184.

Birchmeier, W., and Behrens, J. (1994). Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta* *1198*, 11-26.

Borsig, L., Wong, R., Hynes, R. O., Varki, N. M., and Varki, A. (2002). Synergistic effects of L- and P-selectin in facilitating tumor metastasis can involve non-mucin ligands and implicate leukocytes as enhancers of metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 2193-2198.

Boulanger, M. J., and Garcia, K. C. (2004). Shared cytokine signaling receptors: structural insights from the gp130 system. *Adv Protein Chem* *68*, 107-146.

Bowman, T., Garcia, R., Turkson, J., and Jove, R. (2000). STATs in oncogenesis. *Oncogene* *19*, 2474-2488.

Boyle, K., Egan, P., Rakar, S., Willson, T. A., Wicks, I. P., Metcalf, D., Hilton, D. J., Nicola, N. A., Alexander, W. S., Roberts, A. W., and Robb, L. (2007). The SOCS box of suppressor of cytokine signaling-3 contributes to the control of G-CSF responsiveness in vivo. *Blood* *110*, 1466-1474.

Brabletz, T., Hlubek, F., Spaderna, S., Schmalhofer, O., Hiendlmeyer, E., Jung, A., and Kirchner, T. (2005). Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and beta-catenin. *Cells Tissues Organs* *179*, 56-65.

Brakensiek, K., Langer, F., Schlegelberger, B., Kreipe, H., and Lehmann, U. (2005). Hypermethylation of the suppressor of cytokine signalling-1 (SOCS-1) in myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* *130*, 209-217.

Bromberg, J. (2002). Stat proteins and oncogenesis. *J Clin Invest* *109*, 1139-1142.

Bromberg, J., and Darnell, J. E., Jr. (2000). The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* *19*, 2468-2473.

Bromberg, J. F., and Darnell, J. E., Jr. (1999). Potential roles of Stat1 and Stat3 in cellular transformation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* *64*, 425-428.

Bryant, D. M., Kerr, M. C., Hammond, L. A., Joseph, S. R., Mostov, K. E., Teasdale, R. D., and Stow, J. L. (2007). EGF induces macropinocytosis and SNX1-modulated recycling of E-cadherin. *J Cell Sci* *120*, 1818-1828.

Bryant, D. M., and Stow, J. L. (2004). The ins and outs of E-cadherin trafficking. *Trends Cell Biol* *14*, 427-434.

Brysha, M., Zhang, J. G., Bertolino, P., Corbin, J. E., Alexander, W. S., Nicola, N. A., Hilton, D. J., and Starr, R. (2001). Suppressor of cytokine signaling-1 attenuates the duration of interferon gamma signal transduction in vitro and in vivo. *J Biol Chem* *276*, 22086-22089.

Buday, L., Wunderlich, L., and Tamas, P. (2002). The Nck family of adapter proteins: regulators of actin cytoskeleton. *Cell Signal* *14*, 723-731.

Bullen, D. V., Darwiche, R., Metcalf, D., Handman, E., and Alexander, W. S. (2001). Neutralization of interferon-gamma in neonatal SOCS1^{-/-} mice prevents fatty degeneration of the liver but not subsequent fatal inflammatory disease. *Immunology* *104*, 92-98.

Bullock, A. N., Debreczeni, J. E., Edwards, A. M., Sundstrom, M., and Knapp, S. (2006). Crystal structure of the SOCS2-elongin C-elongin B complex defines a prototypical SOCS box ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 7637-7642.

Bullock, A. N., Rodriguez, M. C., Debreczeni, J. E., Songyang, Z., and Knapp, S. (2007). Structure of the SOCS4-ElonginB/C complex reveals a distinct SOCS box interface and the molecular basis for SOCS-dependent EGFR degradation. *Structure* *15*, 1493-1504.

Bussard, K. M., Gay, C. V., and Mastro, A. M. (2008). The bone microenvironment in metastasis; what is special about bone? *Cancer Metastasis Rev* 27, 41-55.

Butler, A. A., Yakar, S., Gewolb, I. H., Karas, M., Okubo, Y., and LeRoith, D. (1998). Insulin-like growth factor-I receptor signal transduction: at the interface between physiology and cell biology. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 121, 19-26.

Cacalano, N. A., Sanden, D., and Johnston, J. A. (2001). Tyrosine-phosphorylated SOCS-3 inhibits STAT activation but binds to p120 RasGAP and activates Ras. *Nat Cell Biol* 3, 460-465.

Cajot, J. F., Sordat, I., Silvestre, T., and Sordat, B. (1997). Differential display cloning identifies motility-related protein (MRP1/CD9) as highly expressed in primary compared to metastatic human colon carcinoma cells. *Cancer Res* 57, 2593-2597.

Callus, B. A., and Mathey-Prevot, B. (2002). SOCS36E, a novel Drosophila SOCS protein, suppresses JAK/STAT and EGF-R signalling in the imaginal wing disc. *Oncogene* 21, 4812-4821.

Calo, V., Migliavacca, M., Bazan, V., Macaluso, M., Buscemi, M., Gebbia, N., and Russo, A. (2003). STAT proteins: from normal control of cellular events to tumorigenesis. *J Cell Physiol* 197, 157-168.

Calvert, P. M., and Frucht, H. (2002). The genetics of colorectal cancer. *Ann Intern Med* 137, 603-612.

Cano, A., Perez-Moreno, M. A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M. J., del Barrio, M. G., Portillo, F., and Nieto, M. A. (2000). The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2, 76-83.

Cappell, M. S. (2007). From colonic polyps to colon cancer: pathophysiology, clinical presentation, screening and colonoscopic therapy. *Minerva Gastroenterol Dietol* 53, 351-373.

Carlesso, N., Frank, D. A., and Griffin, J. D. (1996). Tyrosyl phosphorylation and DNA binding activity of signal transducers and activators of transcription (STAT) proteins in hematopoietic cell lines transformed by Bcr/Abl. *J Exp Med* 183, 811-820.

Cary, L. A., Chang, J. F., and Guan, J. L. (1996). Stimulation of cell migration by overexpression of focal adhesion kinase and its association with Src and Fyn. *J Cell Sci* 109 (Pt 7), 1787-1794.

Casanova, J. E., Wang, X., Kumar, R., Bhartur, S. G., Navarre, J., Woodrum, J. E., Altschuler, Y., Ray, G. S., and Goldenring, J. R. (1999). Association of Rab25 and Rab11a with the apical recycling system of polarized Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell* 10, 47-61.

Castano, J., Solanas, G., Casagolda, D., Raurell, I., Villagrana, P., Bustelo, X. R., Garcia de Herreros, A., and Dunach, M. (2007). Specific phosphorylation of p120-catenin regulatory domain differently modulates its binding to RhoA. *Mol Cell Biol* 27, 1745-1757.

Cen, B., Selvaraj, A., and Prywes, R. (2004). Myocardin/MKL family of SRF coactivators: key regulators of immediate early and muscle specific gene expression. *J Cell Biochem* 93, 74-82.

Chan, G., Kalaitzidis, D., and Neel, B. G. (2008). The tyrosine phosphatase Shp2 (PTPN11) in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 27, 179-192.

Chen, W., Daines, M. O., and Hershey, G. K. (2004). Methylation of STAT6 modulates STAT6 phosphorylation, nuclear translocation, and DNA-binding activity. *J Immunol* 172, 6744-6750.

Chen, X., Bhandari, R., Vinkemeier, U., Van Den Akker, F., Darnell, J. E., Jr., and Kuriyan, J. (2003a). A reinterpretation of the dimerization interface of the N-terminal domains of STATs. *Protein Sci* 12, 361-365.

Chen, X., Kojima, S., Borisy, G. G., and Green, K. J. (2003b). p120 catenin associates with kinesin and facilitates the transport of cadherin-catenin complexes to intercellular junctions. *J Cell Biol* *163*, 547-557.

Chen, X., Vinkemeier, U., Zhao, Y., Jeruzalmi, D., Darnell, J. E., Jr., and Kuriyan, J. (1998). Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA. *Cell* *93*, 827-839.

Chen, X. P., Losman, J. A., Cowan, S., Donahue, E., Fay, S., Vuong, B. Q., Nawijn, M. C., Capece, D., Cohan, V. L., and Rothman, P. (2002). Pim serine/threonine kinases regulate the stability of Socs-1 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 2175-2180.

Chen, Y. Q., Hsieh, J. T., Yao, F., Fang, B., Pong, R. C., Cipriano, S. C., and Krepulat, F. (1999). Induction of apoptosis and G2/M cell cycle arrest by DCC. *Oncogene* *18*, 2747-2754.

Cheng, C. W., Wu, P. E., Yu, J. C., Huang, C. S., Yue, C. T., Wu, C. W., and Shen, C. Y. (2001). Mechanisms of inactivation of E-cadherin in breast carcinoma: modification of the two-hit hypothesis of tumor suppressor gene. *Oncogene* *20*, 3814-3823.

Chong, M. M., Cornish, A. L., Darwiche, R., Stanley, E. G., Purton, J. F., Godfrey, D. I., Hilton, D. J., Starr, R., Alexander, W. S., and Kay, T. W. (2003). Suppressor of cytokine signaling-1 is a critical regulator of interleukin-7-dependent CD8+ T cell differentiation. *Immunity* *18*, 475-487.

Chong, Z. Z., and Maiese, K. (2007). The Src homology 2 domain tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2: diversified control of cell growth, inflammation, and injury. *Histol Histopathol* *22*, 1251-1267.

Chtanova, T., Kemp, R. A., Sutherland, A. P., Ronchese, F., and Mackay, C. R. (2001). Gene microarrays reveal extensive differential gene expression in both CD4(+) and CD8(+) type 1 and type 2 T cells. *J Immunol* *167*, 3057-3063.

Chung, C. D., Liao, J., Liu, B., Rao, X., Jay, P., Berta, P., and Shuai, K. (1997a). Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science* *278*, 1803-1805.

Chung, J., Uchida, E., Grammer, T. C., and Blenis, J. (1997b). STAT3 serine phosphorylation by ERK-dependent and -independent pathways negatively modulates its tyrosine phosphorylation. *Mol Cell Biol* *17*, 6508-6516.

Ciechanover, A. (2009). Tracing the history of the ubiquitin proteolytic system: The pioneering article. *Biochem Biophys Res Commun*.

Clarke, A. R. (2006). Wnt signalling in the mouse intestine. *Oncogene* *25*, 7512-7521.

Clevenger, C. V. (2004). Roles and regulation of stat family transcription factors in human breast cancer. *Am J Pathol* *165*, 1449-1460.

Comijn, J., Berx, G., Vermassen, P., Verschueren, K., van Grunsven, L., Bruyneel, E., Mareel, M., Huylebroeck, D., and van Roy, F. (2001). The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol Cell* *7*, 1267-1278.

Cornish, A. L., Chong, M. M., Davey, G. M., Darwiche, R., Nicola, N. A., Hilton, D. J., Kay, T. W., Starr, R., and Alexander, W. S. (2003). Suppressor of cytokine signaling-1 regulates signaling in response to interleukin-2 and other gamma c-dependent cytokines in peripheral T cells. *J Biol Chem* *278*, 22755-22761.

Costantino, L., and Barlocco, D. (2008). STAT 3 as a target for cancer drug discovery. *Curr Med Chem* *15*, 834-843.

Crocker, B. A., Kiu, H., and Nicholson, S. E. (2008). SOCS regulation of the JAK/STAT signalling pathway. *Semin Cell Dev Biol* *19*, 414-422.

Cuypers, H. T., Selten, G., Quint, W., Zijlstra, M., Maandag, E. R., Boelens, W., van Wezenbeek, P., Melief, C., and Berns, A. (1984). Murine leukemia virus-induced T-cell lymphomagenesis: integration of proviruses in a distinct chromosomal region. *Cell* *37*, 141-150.

d'Azzo, A., Bongiovanni, A., and Nastasi, T. (2005). E3 ubiquitin ligases as regulators of membrane protein trafficking and degradation. *Traffic* 6, 429-441.

Dalpke, A., Heeg, K., Bartz, H., and Baetz, A. (2008). Regulation of innate immunity by suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins. *Immunobiology* 213, 225-235.

Dance, M., Montagner, A., Salles, J. P., Yart, A., and Raynal, P. (2008). The molecular functions of Shp2 in the Ras/Mitogen-activated protein kinase (ERK1/2) pathway. *Cell Signal* 20, 453-459.

Danial, N. N., Losman, J. A., Lu, T., Yip, N., Krishnan, K., Krolewski, J., Goff, S. P., Wang, J. Y., and Rothman, P. B. (1998). Direct interaction of Jak1 and v-Abl is required for v-Abl-induced activation of STATs and proliferation. *Mol Cell Biol* 18, 6795-6804.

Danial, N. N., and Rothman, P. (2000). JAK-STAT signaling activated by Abl oncogenes. *Oncogene* 19, 2523-2531.

Darnell, J. E., Jr. (1997). STATs and gene regulation. *Science* 277, 1630-1635.

Darnell, J. E., Jr., Kerr, I. M., and Stark, G. R. (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264, 1415-1421.

David, M., Chen, H. E., Goelz, S., Larner, A. C., and Neel, B. G. (1995a). Differential regulation of the alpha/beta interferon-stimulated Jak/Stat pathway by the SH2 domain-containing tyrosine phosphatase SHPTP1. *Mol Cell Biol* 15, 7050-7058.

David, M., Petricoin, E., 3rd, Benjamin, C., Pine, R., Weber, M. J., and Larner, A. C. (1995b). Requirement for MAP kinase (ERK2) activity in interferon alpha- and interferon beta-stimulated gene expression through STAT proteins. *Science* 269, 1721-1723.

David, M., Wong, L., Flavell, R., Thompson, S. A., Wells, A., Larner, A. C., and Johnson, G. R. (1996). STAT activation by epidermal growth factor (EGF) and amphiregulin. Requirement for the EGF receptor kinase but not for tyrosine phosphorylation sites or JAK1. *J Biol Chem* 271, 9185-9188.

Davis, M. A., Ireton, R. C., and Reynolds, A. B. (2003). A core function for p120-catenin in cadherin turnover. *J Cell Biol* 163, 525-534.

de Caestecker, M. P., Piek, E., and Roberts, A. B. (2000). Role of transforming growth factor-beta signaling in cancer. *J Natl Cancer Inst* 92, 1388-1402.

de Groot, R. P., Raaijmakers, J. A., Lammers, J. W., and Koenderman, L. (2000). STAT5-Dependent CyclinD1 and Bcl-xL expression in Bcr-Abl-transformed cells. *Mol Cell Biol Res Commun* 3, 299-305.

De Sepulveda, P., Ilangumaran, S., and Rottapel, R. (2000). Suppressor of cytokine signaling-1 inhibits VAV function through protein degradation. *J Biol Chem* 275, 14005-14008.

De Sepulveda, P., Okkenhaug, K., Rose, J. L., Hawley, R. G., Dubreuil, P., and Rottapel, R. (1999). Socs1 binds to multiple signalling proteins and suppresses steel factor-dependent proliferation. *Embo J* 18, 904-915.

De Zoysa, M., and Lee, J. (2009). Suppressor of cytokine signaling 2 (SOCS-2) homologue in disk abalone: cloning, sequence characterization and expression analysis. *Fish Shellfish Immunol* 26, 500-508.

Dhanasekaran, S. M., Barrette, T. R., Ghosh, D., Shah, R., Varambally, S., Kurachi, K., Pienta, K. J., Rubin, M. A., and Chinnaiyan, A. M. (2001). Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature* 412, 822-826.

Dhand, R., Hiles, I., Panayotou, G., Roche, S., Fry, M. J., Gout, I., Totty, N. F., Truong, O., Vicendo, P., Yonezawa, K., and et al. (1994). PI 3-kinase is a dual specificity enzyme: autoregulation by an intrinsic protein-serine kinase activity. *Embo J* 13, 522-533.

Dunbier, A., and Guilford, P. (2001). Hereditary diffuse gastric cancer. *Adv Cancer Res* 83, 55-65.

Earley, S., and Plopper, G. E. (2008). Phosphorylation of focal adhesion kinase promotes extravasation of breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 366, 476-482.

East, J. E., Saunders, B. P., and Jass, J. R. (2008). Sporadic and syndromic hyperplastic polyps and serrated adenomas of the colon: classification, molecular genetics, natural history, and clinical management. *Gastroenterol Clin North Am* 37, 25-46, v.

Egeblad, M., and Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2, 161-174.

Ekmekci, C. G., Gutierrez, M. I., Siraj, A. K., Ozbek, U., and Bhatia, K. (2004). Aberrant methylation of multiple tumor suppressor genes in acute myeloid leukemia. *Am J Hematol* 77, 233-240.

El Kasmi, K. C., Holst, J., Coffre, M., Mielke, L., de Pauw, A., Lhocine, N., Smith, A. M., Rutschman, R., Kaushal, D., Shen, Y., *et al.* (2006). General nature of the STAT3-activated anti-inflammatory response. *J Immunol* 177, 7880-7888.

Elliott, R. L., and Blobel, G. C. (2005). Role of transforming growth factor Beta in human cancer. *J Clin Oncol* 23, 2078-2093.

Endo, T. A., Masuhara, M., Yokouchi, M., Suzuki, R., Sakamoto, H., Mitsui, K., Matsumoto, A., Tanimura, S., Ohtsubo, M., Misawa, H., *et al.* (1997). A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature* 387, 921-924.

Espert, L., Dusanter-Fourt, I., and Chelbi-Alix, M. K. (2005). [Negative regulation of the JAK/STAT: pathway implication in tumorigenesis]. *Bull Cancer* 92, 845-857.

Esteller, M. (2002). CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* 21, 5427-5440.

Faraldo, M. L., Rodrigo, I., Behrens, J., Birchmeier, W., and Cano, A. (1997). Analysis of the E-cadherin and P-cadherin promoters in murine keratinocyte cell lines from different stages of mouse skin carcinogenesis. *Mol Carcinog* 20, 33-47.

Fearon, E. R., and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759-767.

Feener, E. P., Rosario, F., Dunn, S. L., Stancheva, Z., and Myers, M. G., Jr. (2004). Tyrosine phosphorylation of Jak2 in the JH2 domain inhibits cytokine signaling. *Mol Cell Biol* 24, 4968-4978.

Ferre, P. (2007). [Insulin signaling and insulin resistance]. *Therapie* 62, 277-284.

Fidler, I. J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 3, 453-458.

Fischer, P., Lehmann, U., Sobota, R. M., Schmitz, J., Niemand, C., Linnemann, S., Haan, S., Behrmann, I., Yoshimura, A., Johnston, J. A., *et al.* (2004). The role of the inhibitors of interleukin-6 signal transduction SHP2 and SOCS3 for desensitization of interleukin-6 signalling. *Biochem J* 378, 449-460.

Flowers, L. O., Johnson, H. M., Mujtaba, M. G., Ellis, M. R., Haider, S. M., and Subramaniam, P. S. (2004). Characterization of a peptide inhibitor of Janus kinase 2 that mimics suppressor of cytokine signaling 1 function. *J Immunol* 172, 7510-7518.

Frame, M. C. (2004). Newest findings on the oldest oncogene; how activated src does it. *J Cell Sci* 117, 989-998.

Frank, S. J., Gilliland, G., Kraft, A. S., and Arnold, C. S. (1994). Interaction of the growth hormone receptor cytoplasmic domain with the JAK2 tyrosine kinase. *Endocrinology* 135, 2228-2239.

Frantsve, J., Schwaller, J., Sternberg, D. W., Kutok, J., and Gilliland, D. G. (2001). Socs-1 inhibits TEL-JAK2-mediated transformation of hematopoietic cells through inhibition of JAK2 kinase activity and induction of proteasome-mediated degradation. *Mol Cell Biol* 21, 3547-3557.

Franz, C. M., and Ridley, A. J. (2004). p120 catenin associates with microtubules: inverse relationship between microtubule binding and Rho GTPase regulation. *J Biol Chem* 279, 6588-6594.

Frazier, M. L., Xi, L., Zong, J., Viscofsky, N., Rashid, A., Wu, E. F., Lynch, P. M., Amos, C. I., and Issa, J. P. (2003). Association of the CpG island methylator phenotype with family history of cancer in patients with colorectal cancer. *Cancer Res* 63, 4805-4808.

Friedl, P., and Gilmour, D. (2009). Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 445-457.

Friedl, P., and Wolf, K. (2003). Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* 3, 362-374.

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

Fujimoto, M., and Naka, T. (2003). Regulation of cytokine signaling by SOCS family molecules. *Trends Immunol* 24, 659-666.

Fujimoto, M., Naka, T., Nakagawa, R., Kawazoe, Y., Morita, Y., Tateishi, A., Okumura, K., Narazaki, M., and Kishimoto, T. (2000). Defective thymocyte development and perturbed homeostasis of T cells in STAT-induced STAT inhibitor-1/suppressors of cytokine signaling-1 transgenic mice. *J Immunol* 165, 1799-1806.

Fujita, Y., Krause, G., Scheffner, M., Zechner, D., Leddy, H. E., Behrens, J., Sommer, T., and Birchmeier, W. (2002). Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. *Nat Cell Biol* 4, 222-231.

Fujitake, S., Hibi, K., Okochi, O., Kodera, Y., Ito, K., Akiyama, S., and Nakao, A. (2004). Aberrant methylation of SOCS-1 was observed in younger colorectal cancer patients. *J Gastroenterol* 39, 120-124.

Fukushima, N., Sato, N., Sahin, F., Su, G. H., Hruban, R. H., and Goggins, M. (2003). Aberrant methylation of suppressor of cytokine signalling-1 (SOCS-1) gene in pancreatic ductal neoplasms. *Br J Cancer* 89, 338-343.

Galm, O., Yoshikawa, H., Esteller, M., Osieka, R., and Herman, J. G. (2003). SOCS-1, a negative regulator of cytokine signaling, is frequently silenced by methylation in multiple myeloma. *Blood* 101, 2784-2788.

Garcia, R., Yu, C. L., Hudnall, A., Catlett, R., Nelson, K. L., Smithgall, T., Fujita, D. J., Ethier, S. P., and Jove, R. (1997). Constitutive activation of Stat3 in fibroblasts transformed by diverse oncoproteins and in breast carcinoma cells. *Cell Growth Differ* 8, 1267-1276.

Germain, R. N. (1994). MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 76, 287-299.

Gingras, S., Simard, J., Groner, B., and Pfitzner, E. (1999). p300/CBP is required for transcriptional induction by interleukin-4 and interacts with Stat6. *Nucleic Acids Res* 27, 2722-2729.

Giordanetto, F., and Kroemer, R. T. (2002). Prediction of the structure of human Janus kinase 2 (JAK2) comprising JAK homology domains 1 through 7. *Protein Eng* 15, 727-737.

Giordanetto, F., and Kroemer, R. T. (2003). A three-dimensional model of Suppressor Of Cytokine Signalling 1 (SOCS-1). *Protein Eng* 16, 115-124.

Gonalons, E., Barrachina, M., Garcia-Sanz, J. A., and Celada, A. (1998). Translational control of MHC class II I-A molecules by IFN-gamma. *J Immunol* 161, 1837-1843.

Gottardi, C. J., Wong, E., and Gumbiner, B. M. (2001). E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting beta-catenin signaling in an adhesion-independent manner. *J Cell Biol* 153, 1049-1060.

Gough, D. J., Corlett, A., Schlessinger, K., Wegrzyn, J., Larner, A. C., and Levy, D. E. (2009). Mitochondrial STAT3 supports Ras-dependent oncogenic transformation. *Science* 324, 1713-1716.

Gout, S., Tremblay, P. L., and Huot, J. (2008). Selectins and selectin ligands in extravasation of cancer cells and organ selectivity of metastasis. *Clin Exp Metastasis* 25, 335-344.

Grady, W. M., Willis, J., Guilford, P. J., Dunbier, A. K., Toro, T. T., Lynch, H., Wiesner, G., Ferguson, K., Eng, C., Park, J. G., *et al.* (2000). Methylation of the CDH1 promoter as the second genetic hit in hereditary diffuse gastric cancer. *Nat Genet* 26, 16-17.

Gray, J. W. (2003). Evidence emerges for early metastasis and parallel evolution of primary and metastatic tumors. *Cancer Cell* 4, 4-6.

Greenhalgh, C. J., Bertolino, P., Asa, S. L., Metcalf, D., Corbin, J. E., Adams, T. E., Davey, H. W., Nicola, N. A., Hilton, D. J., and Alexander, W. S. (2002a). Growth enhancement in suppressor of cytokine signaling 2 (SOCS-2)-deficient mice is dependent on signal transducer and activator of transcription 5b (STAT5b). *Mol Endocrinol* 16, 1394-1406.

Greenhalgh, C. J., Metcalf, D., Thaus, A. L., Corbin, J. E., Uren, R., Morgan, P. O., Fabri, L. J., Zhang, J. G., Martin, H. M., Willson, T. A., *et al.* (2002b). Biological evidence that SOCS-2 can act either as an enhancer or suppressor of growth hormone signaling. *J Biol Chem* 277, 40181-40184.

Gregorieff, A., Pyronnet, S., Sonenberg, N., and Veillette, A. (2000). Regulation of SOCS-1 expression by translational repression. *J Biol Chem* 275, 21596-21604.

Gregory, P. A., Bracken, C. P., Bert, A. G., and Goodall, G. J. (2008). MicroRNAs as regulators of epithelial-mesenchymal transition. *Cell Cycle* 7, 3112-3118.

Griesinger, F., Hennig, H., Hillmer, F., Podleschny, M., Steffens, R., Pies, A., Wormann, B., Haase, D., and Bohlander, S. K. (2005). A BCR-JAK2 fusion gene as the result of a t(9;22)(p24;q11.2) translocation in a patient with a clinically typical chronic myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 44, 329-333.

Grosheva, I., Shtutman, M., Elbaum, M., and Bershadsky, A. D. (2001). p120 catenin affects cell motility via modulation of activity of Rho-family GTPases: a link between cell-cell contact formation and regulation of cell locomotion. *J Cell Sci* 114, 695-707.

Grunewald, M., Avraham, I., Dor, Y., Bachar-Lustig, E., Itin, A., Jung, S., Chimenti, S., Landsman, L., Abramovitch, R., and Keshet, E. (2006). VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell* 124, 175-189.

Guarino, M. (2007). Epithelial-mesenchymal transition and tumour invasion. *Int J Biochem Cell Biol* 39, 2153-2160.

Guilford, P. (1999). E-cadherin downregulation in cancer: fuel on the fire? *Mol Med Today* 5, 172-177.

Gurniak, C. B., and Berg, L. J. (1996). Murine JAK3 is preferentially expressed in hematopoietic tissues and lymphocyte precursor cells. *Blood* 87, 3151-3160.

Haffner, M. C., Jurgeit, A., Berlatto, C., Geley, S., Parajuli, N., Yoshimura, A., and Doppler, W. (2008). Interaction and functional interference of glucocorticoid receptor and SOCS1. *J Biol Chem* 283, 22089-22096.

Haigis, K. M., Kendall, K. R., Wang, Y., Cheung, A., Haigis, M. C., Glickman, J. N., Niwa-Kawakita, M., Sweet-Cordero, A., Sebolt-Leopold, J., Shannon, K. M., *et al.* (2008). Differential effects of oncogenic K-Ras and N-Ras on proliferation, differentiation and tumor progression in the colon. *Nat Genet* 40, 600-608.

Hanada, T., Kinjyo, I., Inagaki-Ohara, K., and Yoshimura, A. (2003). Negative regulation of cytokine signaling by CIS/SOCS family proteins and their roles in inflammatory diseases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 149, 72-86.

Hanada, T., Kobayashi, T., Chinen, T., Saeki, K., Takaki, H., Koga, K., Minoda, Y., Sanada, T., Yoshioka, T., Mimata, H., *et al.* (2006). IFN γ -dependent, spontaneous development of colorectal carcinomas in SOCS1-deficient mice. *J Exp Med* 203, 1391-1397.

Hanada, T., Yoshida, T., Kinjyo, I., Minoguchi, S., Yasukawa, H., Kato, S., Mimata, H., Nomura, Y., Seki, Y., Kubo, M., and Yoshimura, A. (2001). A mutant form of JAB/SOCS1

augments the cytokine-induced JAK/STAT pathway by accelerating degradation of wild-type JAB/CIS family proteins through the SOCS-box. *J Biol Chem* 276, 40746-40754.

Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.

Hansen, J. A., Lindberg, K., Hilton, D. J., Nielsen, J. H., and Billestrup, N. (1999). Mechanism of inhibition of growth hormone receptor signaling by suppressor of cytokine signaling proteins. *Mol Endocrinol* 13, 1832-1843.

Haque, S. J., and Williams, B. R. (1994). Identification and characterization of an interferon (IFN)-stimulated response element-IFN-stimulated gene factor 3-independent signaling pathway for IFN-alpha. *J Biol Chem* 269, 19523-19529.

Harada, N., Tamai, Y., Ishikawa, T., Sauer, B., Takaku, K., Oshima, M., and Taketo, M. M. (1999). Intestinal polyposis in mice with a dominant stable mutation of the beta-catenin gene. *Embo J* 18, 5931-5942.

He, B., You, L., Uematsu, K., Matsangou, M., Xu, Z., He, M., McCormick, F., and Jablons, D. M. (2003). Cloning and characterization of a functional promoter of the human SOCS-3 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 301, 386-391.

Hebenstreit, D., Luft, P., Schmiedlechner, A., Regl, G., Frischauf, A. M., Aberger, F., Duschl, A., and Horejs-Hoeck, J. (2003). IL-4 and IL-13 induce SOCS-1 gene expression in A549 cells by three functional STAT6-binding motifs located upstream of the transcription initiation site. *J Immunol* 171, 5901-5907.

Hebenstreit, D., Wirnsberger, G., Horejs-Hoeck, J., and Duschl, A. (2006). Signaling mechanisms, interaction partners, and target genes of STAT6. *Cytokine Growth Factor Rev* 17, 173-188.

Heeg, K., and Dalpke, A. (2003). TLR-induced negative regulatory circuits: role of suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins in innate immunity. *Vaccine* 21 Suppl 2, S61-67.

Heim, M. H., Kerr, I. M., Stark, G. R., and Darnell, J. E., Jr. (1995). Contribution of STAT SH2 groups to specific interferon signaling by the Jak-STAT pathway. *Science* 267, 1347-1349.

Heinrich, M. C., Blanke, C. D., Druker, B. J., and Corless, C. L. (2002). Inhibition of KIT tyrosine kinase activity: a novel molecular approach to the treatment of KIT-positive malignancies. *J Clin Oncol* 20, 1692-1703.

Herman, J. G., and Baylin, S. B. (2003). Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 349, 2042-2054.

Hewitt, R. E., McMarlin, A., Kleiner, D., Wersto, R., Martin, P., Tsokos, M., Stamp, G. W., and Stetler-Stevenson, W. G. (2000). Validation of a model of colon cancer progression. *J Pathol* 192, 446-454.

Hibi, K., Kodera, Y., Ito, K., Akiyama, S., and Nakao, A. (2005). Aberrant methylation of HLTF, SOCS-1, and CDH13 genes is shown in colorectal cancers without lymph node metastasis. *Dis Colon Rectum* 48, 1282-1286.

Hilkens, C. M., Is'harc, H., Lillemeier, B. F., Strobl, B., Bates, P. A., Behrmann, I., and Kerr, I. M. (2001). A region encompassing the FERM domain of Jak1 is necessary for binding to the cytokine receptor gp130. *FEBS Lett* 505, 87-91.

Hilton, D. J., Richardson, R. T., Alexander, W. S., Viney, E. M., Willson, T. A., Sprigg, N. S., Starr, R., Nicholson, S. E., Metcalf, D., and Nicola, N. A. (1998). Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 114-119.

Hirano, T., Nakajima, K., and Hibi, M. (1997). Signaling mechanisms through gp130: a model of the cytokine system. *Cytokine Growth Factor Rev* 8, 241-252.

Hobart, M., Ramassar, V., Goes, N., Urmson, J., and Halloran, P. F. (1997). IFN regulatory factor-1 plays a central role in the regulation of the expression of class I and II MHC genes in vivo. *J Immunol* *158*, 4260-4269.

Hou, X. S., Melnick, M. B., and Perrimon, N. (1996). Marelle acts downstream of the *Drosophila* HOP/JAK kinase and encodes a protein similar to the mammalian STATs. *Cell* *84*, 411-419.

Huang, F. J., Steeg, P. S., Price, J. E., Chiu, W. T., Chou, P. C., Xie, K., Sawaya, R., and Huang, S. (2008). Molecular basis for the critical role of suppressor of cytokine signaling-1 in melanoma brain metastasis. *Cancer Res* *68*, 9634-9642.

Hynes, R. O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* *110*, 673-687.

Iavnilovitch, E., Cardiff, R. D., Groner, B., and Barash, I. (2004). Deregulation of Stat5 expression and activation causes mammary tumors in transgenic mice. *Int J Cancer* *112*, 607-619.

Ihle, J. N. (1995). Cytokine receptor signalling. *Nature* *377*, 591-594.

Ihle, J. N., and Kerr, I. M. (1995). Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet* *11*, 69-74.

Ihle, J. N., Nosaka, T., Thierfelder, W., Quelle, F. W., and Shimoda, K. (1997). Jaks and Stats in cytokine signaling. *Stem Cells* *15 Suppl 1*, 105-111; discussion 112.

Ilangumaran, S., Finan, D., La Rose, J., Raine, J., Silverstein, A., De Sepulveda, P., and Rottapel, R. (2002). A positive regulatory role for suppressor of cytokine signaling 1 in IFN-gamma-induced MHC class II expression in fibroblasts. *J Immunol* *169*, 5010-5020.

Irby, R. B., Mao, W., Coppola, D., Kang, J., Loubeau, J. M., Trudeau, W., Karl, R., Fujita, D. J., Jove, R., and Yeatman, T. J. (1999). Activating SRC mutation in a subset of advanced human colon cancers. *Nat Genet* *21*, 187-190.

Ireton, R. C., Davis, M. A., van Hengel, J., Mariner, D. J., Barnes, K., Thoreson, M. A., Anastasiadis, P. Z., Matrisian, L., Bundy, L. M., Sealy, L., *et al.* (2002). A novel role for p120 catenin in E-cadherin function. *J Cell Biol* *159*, 465-476.

Issa, J. P. (2000). The epigenetics of colorectal cancer. *Ann N Y Acad Sci* *910*, 140-153; discussion 153-145.

Ito, S., Nakanishi, H., Ikehara, Y., Kato, T., Kasai, Y., Ito, K., Akiyama, S., Nakao, A., and Tatematsu, M. (2001). Real-time observation of micrometastasis formation in the living mouse liver using a green fluorescent protein gene-tagged rat tongue carcinoma cell line. *Int J Cancer* *93*, 212-217.

Jackson, P. K. (2001). A new RING for SUMO: wrestling transcriptional responses into nuclear bodies with PIAS family E3 SUMO ligases. *Genes Dev* *15*, 3053-3058.

Jackson, P. K., Eldridge, A. G., Freed, E., Furstenthal, L., Hsu, J. Y., Kaiser, B. K., and Reimann, J. D. (2000). The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends Cell Biol* *10*, 429-439.

Jain, N., Zhang, T., Fong, S. L., Lim, C. P., and Cao, X. (1998). Repression of Stat3 activity by activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK). *Oncogene* *17*, 3157-3167.

Jankowski, J., Henderson, K., Viaene, A., Baert, J., and Long, L. Q. (1995). Morphological analysis of gastro-esophageal diseases by molecular cell techniques. *Microsc Res Tech* *31*, 184-192.

Janssen, K. P., Alberici, P., Fsihi, H., Gaspar, C., Breukel, C., Franken, P., Rosty, C., Abal, M., El Marjou, F., Smits, R., *et al.* (2006). APC and oncogenic KRAS are synergistic in enhancing Wnt signaling in intestinal tumor formation and progression. *Gastroenterology* *131*, 1096-1109.

Jensen, L. J., Kuhn, M., Stark, M., Chaffron, S., Creevey, C., Muller, J., Doerks, T., Julien, P., Roth, A., Simonovic, M., *et al.* (2009). STRING 8--a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucleic Acids Res* 37, D412-416.

Johnston, J. A. (2004). Are SOCS suppressors, regulators, and degraders? *J Leukoc Biol* 75, 743-748.

Jones, R. J., Avizienyte, E., Wyke, A. W., Owens, D. W., Brunton, V. G., and Frame, M. C. (2002). Elevated c-Src is linked to altered cell-matrix adhesion rather than proliferation in KM12C human colorectal cancer cells. *Br J Cancer* 87, 1128-1135.

Joshi, A., Garg, H., Nagashima, K., Bonifacino, J. S., and Freed, E. O. (2008). GGA and Arf proteins modulate retrovirus assembly and release. *Mol Cell* 30, 227-238.

Kaibuchi, K., Kuroda, S., and Amano, M. (1999). Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells. *Annu Rev Biochem* 68, 459-486.

Kamimura, D., Ishihara, K., and Hirano, T. (2003). IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 149, 1-38.

Kamizono, S., Hanada, T., Yasukawa, H., Minoguchi, S., Kato, R., Minoguchi, M., Hattori, K., Hatakeyama, S., Yada, M., Morita, S., *et al.* (2001). The SOCS box of SOCS-1 accelerates ubiquitin-dependent proteolysis of TEL-JAK2. *J Biol Chem* 276, 12530-12538.

Kamura, T., Maenaka, K., Kotoshiba, S., Matsumoto, M., Kohda, D., Conaway, R. C., Conaway, J. W., and Nakayama, K. I. (2004). VHL-box and SOCS-box domains determine binding specificity for Cul2-Rbx1 and Cul5-Rbx2 modules of ubiquitin ligases. *Genes Dev* 18, 3055-3065.

Kamura, T., Sato, S., Haque, D., Liu, L., Kaelin, W. G., Jr., Conaway, R. C., and Conaway, J. W. (1998). The Elongin BC complex interacts with the conserved SOCS-box motif present in members of the SOCS, ras, WD-40 repeat, and ankyrin repeat families. *Genes Dev* 12, 3872-3881.

Kang, Y., Siegel, P. M., Shu, W., Drobnjak, M., Kakonen, S. M., Cordon-Cardo, C., Guise, T. A., and Massague, J. (2003). A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell* 3, 537-549.

Kaplan, K. B., Burds, A. A., Swedlow, J. R., Bekir, S. S., Sorger, P. K., and Nathke, I. S. (2001). A role for the Adenomatous Polyposis Coli protein in chromosome segregation. *Nat Cell Biol* 3, 429-432.

Kaplan, R. N., Rafii, S., and Lyden, D. (2006). Preparing the "soil": the premetastatic niche. *Cancer Res* 66, 11089-11093.

Kario, E., Marmor, M. D., Adamsky, K., Citri, A., Amit, I., Amariglio, N., Rechavi, G., and Yarden, Y. (2005). Suppressors of cytokine signaling 4 and 5 regulate epidermal growth factor receptor signaling. *J Biol Chem* 280, 7038-7048.

Kawazoe, Y., Naka, T., Fujimoto, M., Kohzaki, H., Morita, Y., Narazaki, M., Okumura, K., Saitoh, H., Nakagawa, R., Uchiyama, Y., *et al.* (2001). Signal transducer and activator of transcription (STAT)-induced STAT inhibitor 1 (SSI-1)/suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) inhibits insulin signal transduction pathway through modulating insulin receptor substrate 1 (IRS-1) phosphorylation. *J Exp Med* 193, 263-269.

Keirsebilck, A., Bonne, S., Staes, K., van Hengel, J., Nollet, F., Reynolds, A., and van Roy, F. (1998). Molecular cloning of the human p120ctn catenin gene (CTNND1): expression of multiple alternatively spliced isoforms. *Genomics* 50, 129-146.

Khodarev, N. N., Roach, P., Pitroda, S. P., Golden, D. W., Bhayani, M., Shao, M. Y., Darga, T. E., Beveridge, M. G., Sood, R. F., Sutton, H. G., *et al.* (2009). STAT1 pathway mediates amplification of metastatic potential and resistance to therapy. *PLoS One* 4, e5821.

Kile, B. T., and Alexander, W. S. (2001). The suppressors of cytokine signalling (SOCS). *Cell Mol Life Sci* 58, 1627-1635.

Kile, B. T., Schulman, B. A., Alexander, W. S., Nicola, N. A., Martin, H. M., and Hilton, D. J. (2002). The SOCS box: a tale of destruction and degradation. *Trends Biochem Sci* 27, 235-241.

Kim, R., Emi, M., and Tanabe, K. (2006). Role of mitochondria as the gardens of cell death. *Cancer Chemother Pharmacol* 57, 545-553.

Kingsley, C., and Winoto, A. (1992). Cloning of GT box-binding proteins: a novel Sp1 multigene family regulating T-cell receptor gene expression. *Mol Cell Biol* 12, 4251-4261.

Kirchhausen, T., Macia, E., and Pelish, H. E. (2008). Use of dynasore, the small molecule inhibitor of dynamin, in the regulation of endocytosis. *Methods Enzymol* 438, 77-93.

Kirwan, J. P., and del Aguila, L. F. (2003). Insulin signalling, exercise and cellular integrity. *Biochem Soc Trans* 31, 1281-1285.

Kiuchi, N., Nakajima, K., Ichiba, M., Fukada, T., Narimatsu, M., Mizuno, K., Hibi, M., and Hirano, T. (1999). STAT3 is required for the gp130-mediated full activation of the c-myc gene. *J Exp Med* 189, 63-73.

Klingmuller, U. (1997). The role of tyrosine phosphorylation in proliferation and maturation of erythroid progenitor cells--signals emanating from the erythropoietin receptor. *Eur J Biochem* 249, 637-647.

Klymkowsky, M. W., and Savagner, P. (2009). Epithelial-mesenchymal transition: a cancer researcher's conceptual friend and foe. *Am J Pathol* 174, 1588-1593.

Knoops, L., and Renauld, J. C. (2004). IL-9 and its receptor: from signal transduction to tumorigenesis. *Growth Factors* 22, 207-215.

Kobayashi, T., Takaesu, G., and Yoshimura, A. (2006). Mal-function of TLRs by SOCS. *Nat Immunol* 7, 123-124.

Kohutek, Z. A., diPierro, C. G., Redpath, G. T., and Hussaini, I. M. (2009). ADAM-10-mediated N-cadherin cleavage is protein kinase C-alpha dependent and promotes glioblastoma cell migration. *J Neurosci* 29, 4605-4615.

Koizume, S., Tachibana, K., Sekiya, T., Hirohashi, S., and Shiraishi, M. (2002). Heterogeneity in the modification and involvement of chromatin components of the CpG island of the silenced human CDH1 gene in cancer cells. *Nucleic Acids Res* 30, 4770-4780.

Komyod, W., Bauer, U. M., Heinrich, P. C., Haan, S., and Behrmann, I. (2005). Are STATs arginine-methylated? *J Biol Chem* 280, 21700-21705.

Korinek, V., Barker, N., Morin, P. J., van Wichen, D., de Weger, R., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., and Clevers, H. (1997). Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. *Science* 275, 1784-1787.

Kozak, M. (1996). Interpreting cDNA sequences: some insights from studies on translation. *Mamm Genome* 7, 563-574.

Kralovics, R., Passamonti, F., Buser, A. S., Teo, S. S., Tiedt, R., Passweg, J. R., Tichelli, A., Cazzola, M., and Skoda, R. C. (2005). A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 352, 1779-1790.

Kramer, J. A., Adams, M. D., Singh, G. B., Doggett, N. A., and Krawetz, S. A. (1998). A matrix associated region localizes the human SOCS-1 gene to chromosome 16p13.13. *Somat Cell Mol Genet* 24, 131-133.

Krebs, D. L., and Hilton, D. J. (2001). SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem Cells* 19, 378-387.

Krebs, D. L., Uren, R. T., Metcalf, D., Rakar, S., Zhang, J. G., Starr, R., De Souza, D. P., Hanzinikolas, K., Eyles, J., Connolly, L. M., *et al.* (2002). SOCS-6 binds to insulin receptor substrate 4, and mice lacking the SOCS-6 gene exhibit mild growth retardation. *Mol Cell Biol* 22, 4567-4578.

Kremer, B. E., Adang, L. A., and Macara, I. G. (2007). Septins regulate actin organization and cell-cycle arrest through nuclear accumulation of NCK mediated by SOCS7. *Cell* 130, 837-850.

Kubens, B. S., and Zanker, K. S. (1998). Differences in the migration capacity of primary human colon carcinoma cells (SW480) and their lymph node metastatic derivatives (SW620). *Cancer Lett* 131, 55-64.

Kubo, M., Hanada, T., and Yoshimura, A. (2003). Suppressors of cytokine signaling and immunity. *Nat Immunol* 4, 1169-1176.

Kuefer, R., Hofer, M. D., Gschwend, J. E., Pienta, K. J., Sanda, M. G., Chinnaiyan, A. M., Rubin, M. A., and Day, M. L. (2003). The role of an 80 kDa fragment of E-cadherin in the metastatic progression of prostate cancer. *Clin Cancer Res* 9, 6447-6452.

Lacronique, V., Boureux, A., Valle, V. D., Poirel, H., Quang, C. T., Mauchauffe, M., Berthou, C., Lessard, M., Berger, R., Ghysdael, J., and Bernard, O. A. (1997). A TEL-JAK2 fusion protein with constitutive kinase activity in human leukemia. *Science* 278, 1309-1312.

Lark, A. L., Livasy, C. A., Calvo, B., Caskey, L., Moore, D. T., Yang, X., and Cance, W. G. (2003). Overexpression of focal adhesion kinase in primary colorectal carcinomas and colorectal liver metastases: immunohistochemistry and real-time PCR analyses. *Clin Cancer Res* 9, 215-222.

Le, T. L., Yap, A. S., and Stow, J. L. (1999). Recycling of E-cadherin: a potential mechanism for regulating cadherin dynamics. *J Cell Biol* 146, 219-232.

Lee, H., Quinn, J. C., Prasanth, K. V., Swiss, V. A., Economides, K. D., Camacho, M. M., Spector, D. L., and Abate-Shen, C. (2006a). PIAS1 confers DNA-binding specificity on the Msx1 homeoprotein. *Genes Dev* 20, 784-794.

Lee, J. M., Dedhar, S., Kalluri, R., and Thompson, E. W. (2006b). The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol* 172, 973-981.

Lee, K. H., Moon, K. J., Kim, H. S., Yoo, B. C., Park, S., Lee, H., Kwon, S., Lee, E. S., and Yoon, S. (2008). Increased cytoplasmic levels of CIS, SOCS1, SOCS2, or SOCS3 are required for nuclear translocation. *FEBS Lett* 582, 2319-2324.

Leibovitz, A., Stinson, J. C., McCombs, W. B., 3rd, McCoy, C. E., Mazur, K. C., and Mabry, N. D. (1976). Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res* 36, 4562-4569.

Leonard, W. J., and O'Shea, J. J. (1998). Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol* 16, 293-322.

Levine, R. L., Pardnani, A., Tefferi, A., and Gilliland, D. G. (2007). Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. *Nat Rev Cancer* 7, 673-683.

Levy, D. E., and Darnell, J. E., Jr. (2002). Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 651-662.

Lewis, R. S., and Ward, A. C. (2008). Stat5 as a diagnostic marker for leukemia. *Expert Rev Mol Diagn* 8, 73-82.

Li, Z., Metze, D., Nashan, D., Muller-Tidow, C., Serve, H. L., Poremba, C., Luger, T. A., and Bohm, M. (2004). Expression of SOCS-1, suppressor of cytokine signalling-1, in human melanoma. *J Invest Dermatol* 123, 737-745.

Liao, J., Fu, Y., and Shuai, K. (2000). Distinct roles of the NH₂- and COOH-terminal domains of the protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 (PIAS1) in cytokine-induced PIAS1-Stat1 interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5267-5272.

Limnander, A., Danial, N. N., and Rothman, P. B. (2004). v-Abl signaling disrupts SOCS-1 function in transformed pre-B cells. *Mol Cell* 15, 329-341.

Limnander, A., and Rothman, P. B. (2004). Abl oncogene bypasses normal regulation of Jak/STAT activation. *Cell Cycle* 3, 1486-1488.

Lin, J. X., Migone, T. S., Tsang, M., Friedmann, M., Weatherbee, J. A., Zhou, L., Yamauchi, A., Bloom, E. T., Mietz, J., John, S., and et al. (1995). The role of shared receptor motifs and common Stat proteins in the generation of cytokine pleiotropy and redundancy by IL-2, IL-4, IL-7, IL-13, and IL-15. *Immunity* 2, 331-339.

Lin, Q., Lai, R., Chirieac, L. R., Li, C., Thomazy, V. A., Grammatikakis, I., Rassidakis, G. Z., Zhang, W., Fujio, Y., Kunisada, K., *et al.* (2005). Constitutive activation of JAK3/STAT3 in colon carcinoma tumors and cell lines: inhibition of JAK3/STAT3 signaling induces apoptosis and cell cycle arrest of colon carcinoma cells. *Am J Pathol* 167, 969-980.

Lin, S. Y., Yeh, K. T., Chen, W. T., Chen, H. C., Chen, S. T., Chiou, H. Y., and Chang, J. G. (2004). Promoter CpG methylation of tumor suppressor genes in colorectal cancer and its relationship to clinical features. *Oncol Rep* 11, 341-348.

Lin, T. S., Mahajan, S., and Frank, D. A. (2000). STAT signaling in the pathogenesis and treatment of leukemias. *Oncogene* 19, 2496-2504.

Lindeman, G. J., Wittlin, S., Lada, H., Naylor, M. J., Santamaria, M., Zhang, J. G., Starr, R., Hilton, D. J., Alexander, W. S., Ormandy, C. J., and Visvader, J. (2001). SOCS1 deficiency results in accelerated mammary gland development and rescues lactation in prolactin receptor-deficient mice. *Genes Dev* 15, 1631-1636.

Lippincott-Schwartz, J., Roberts, T. H., and Hirschberg, K. (2000). Secretory protein trafficking and organelle dynamics in living cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16, 557-589.

Lipton, L., Halford, S. E., Johnson, V., Novelli, M. R., Jones, A., Cummings, C., Barclay, E., Sieber, O., Sadat, A., Bisgaard, M. L., *et al.* (2003). Carcinogenesis in MYH-associated polyposis follows a distinct genetic pathway. *Cancer Res* 63, 7595-7599.

Litterst, C. M., and Pfitzner, E. (2002). An LXXLL motif in the transactivation domain of STAT6 mediates recruitment of NCoA-1/SRC-1. *J Biol Chem* 277, 36052-36060.

Liu, B., Liao, J., Rao, X., Kushner, S. A., Chung, C. D., Chang, D. D., and Shuai, K. (1998). Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 10626-10631.

Liu, E., Cote, J. F., and Vuori, K. (2003a). Negative regulation of FAK signaling by SOCS proteins. *Embo J* 22, 5036-5046.

Liu, K. D., Gaffen, S. L., Goldsmith, M. A., and Greene, W. C. (1997). Janus kinases in interleukin-2-mediated signaling: JAK1 and JAK3 are differentially regulated by tyrosine phosphorylation. *Curr Biol* 7, 817-826.

Liu, L., McBride, K. M., and Reich, N. C. (2005). STAT3 nuclear import is independent of tyrosine phosphorylation and mediated by importin-alpha3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 8150-8155.

Liu, T. C., Lin, S. F., Chang, J. G., Yang, M. Y., Hung, S. Y., and Chang, C. S. (2003b). Epigenetic alteration of the SOCS1 gene in chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 123, 654-661.

Liu, Y., Dong, Q. Z., Zhao, Y., Dong, X. J., Miao, Y., Dai, S. D., Yang, Z. Q., Zhang, D., Wang, Y., Li, Q. C., *et al.* (2009). P120-catenin isoforms 1A and 3A differently affect invasion and proliferation of lung cancer cells. *Exp Cell Res* 315, 890-898.

Liu, Y., Xu, H. T., Dai, S. D., Wei, Q., Yuan, X. M., and Wang, E. H. (2007). Reduction of p120(ctn) isoforms 1 and 3 is significantly associated with metastatic progression of human lung cancer. *Apmis* 115, 848-856.

Lo, F. S., Kuo, T. T., Wang, C. J., Kuo, M. T., and Kuo, M. C. (2008). Hodgkin's lymphoma in a patient with Noonan syndrome with germ-line PTPN11 mutations. *Int J Hematol* 88, 287-290.

Lock, J. G., and Stow, J. L. (2005). Rab11 in recycling endosomes regulates the sorting and basolateral transport of E-cadherin. *Mol Biol Cell* 16, 1744-1755.

Lu, H., Ouyang, W., and Huang, C. (2006). Inflammation, a key event in cancer development. *Mol Cancer Res* 4, 221-233.

Luczak, M. W., and Jagodzinski, P. P. (2006). The role of DNA methylation in cancer development. *Folia Histochem Cytobiol* 44, 143-154.

Luo, H., Rose, P., Barber, D., Hanratty, W. P., Lee, S., Roberts, T. M., D'Andrea, A. D., and Dearolf, C. R. (1997). Mutation in the Jak kinase JH2 domain hyperactivates Drosophila and mammalian Jak-Stat pathways. *Mol Cell Biol* 17, 1562-1571.

Macarthur, M., Hold, G. L., and El-Omar, E. M. (2004). Inflammation and Cancer II. Role of chronic inflammation and cytokine gene polymorphisms in the pathogenesis of gastrointestinal malignancy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286, G515-520.

Machida, K., and Mayer, B. J. (2005). The SH2 domain: versatile signaling module and pharmaceutical target. *Biochim Biophys Acta* 1747, 1-25.

Malumbres, M., and Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* 9, 153-166.

Mani, S. A., Guo, W., Liao, M. J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C. C., Shipitsin, M., *et al.* (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133, 704-715.

Maniatis, T., Fritsch, E., and Sambrook, J. (1982). *Molecular Cloning : A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor NY.

Mansell, A., Smith, R., Doyle, S. L., Gray, P., Fenner, J. E., Crack, P. J., Nicholson, S. E., Hilton, D. J., O'Neill, L. A., and Hertzog, P. J. (2006). Suppressor of cytokine signaling 1 negatively regulates Toll-like receptor signaling by mediating Mal degradation. *Nat Immunol* 7, 148-155.

Mao, X., Ren, Z., Parker, G. N., Sondermann, H., Pastorello, M. A., Wang, W., McMurray, J. S., Demeler, B., Darnell, J. E., Jr., and Chen, X. (2005). Structural bases of unphosphorylated STAT1 association and receptor binding. *Mol Cell* 17, 761-771.

Marambaud, P., Shioi, J., Serban, G., Georgakopoulos, A., Sarner, S., Nagy, V., Baki, L., Wen, P., Efthimiopoulos, S., Shao, Z., *et al.* (2002). A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions. *Embo J* 21, 1948-1956.

Marine, J. C., Topham, D. J., McKay, C., Wang, D., Parganas, E., Stravopodis, D., Yoshimura, A., and Ihle, J. N. (1999). SOCS1 deficiency causes a lymphocyte-dependent perinatal lethality. *Cell* 98, 609-616.

Martens, N., Uzan, G., Wery, M., Hooghe, R., Hooghe-Peters, E. L., and Gertler, A. (2005). Suppressor of cytokine signaling 7 inhibits prolactin, growth hormone, and leptin signaling by interacting with STAT5 or STAT3 and attenuating their nuclear translocation. *J Biol Chem* 280, 13817-13823.

Martens, N., Wery, M., Wang, P., Braet, F., Gertler, A., Hooghe, R., Vandenhoute, J., and Hooghe-Peters, E. L. (2004). The suppressor of cytokine signaling (SOCS)-7 interacts with the actin cytoskeleton through vinexin. *Exp Cell Res* 298, 239-248.

Masuhara, M., Sakamoto, H., Matsumoto, A., Suzuki, R., Yasukawa, H., Mitsui, K., Wakioka, T., Tanimura, S., Sasaki, A., Misawa, H., *et al.* (1997). Cloning and characterization of novel CIS family genes. *Biochem Biophys Res Commun* 239, 439-446.

Matsumoto, A., Masuhara, M., Mitsui, K., Yokouchi, M., Ohtsubo, M., Misawa, H., Miyajima, A., and Yoshimura, A. (1997). CIS, a cytokine inducible SH2 protein, is a target of the JAK-STAT5 pathway and modulates STAT5 activation. *Blood* 89, 3148-3154.

Matsumoto, A., Seki, Y., Kubo, M., Ohtsuka, S., Suzuki, A., Hayashi, I., Tsuji, K., Nakahata, T., Okabe, M., Yamada, S., and Yoshimura, A. (1999). Suppression of STAT5 functions in

liver, mammary glands, and T cells in cytokine-inducible SH2-containing protein 1 transgenic mice. *Mol Cell Biol* 19, 6396-6407.

Matthys, P., Mitera, T., Heremans, H., Van Damme, J., and Billiau, A. (1995). Anti-gamma interferon and anti-interleukin-6 antibodies affect staphylococcal enterotoxin B-induced weight loss, hypoglycemia, and cytokine release in D-galactosamine-sensitized and unsensitized mice. *Infect Immun* 63, 1158-1164.

Matuoka, K., Miki, H., Takahashi, K., and Takenawa, T. (1997). A novel ligand for an SH3 domain of the adaptor protein Nck bears an SH2 domain and nuclear signaling motifs. *Biochem Biophys Res Commun* 239, 488-492.

Mauro, M. J., and Druker, B. J. (2001). Chronic myelogenous leukemia. *Curr Opin Oncol* 13, 3-7.

McBride, K. M., Banninger, G., McDonald, C., and Reich, N. C. (2002). Regulated nuclear import of the STAT1 transcription factor by direct binding of importin-alpha. *Embo J* 21, 1754-1763.

Melen, K., Fagerlund, R., Franke, J., Kohler, M., Kinnunen, L., and Julkunen, I. (2003). Importin alpha nuclear localization signal binding sites for STAT1, STAT2, and influenza A virus nucleoprotein. *J Biol Chem* 278, 28193-28200.

Mellman, I., Fuchs, R., and Helenius, A. (1986). Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu Rev Biochem* 55, 663-700.

Merlos-Suarez, A., and Batlle, E. (2008). Eph-ephrin signalling in adult tissues and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 20, 194-200.

Metcalf, D., Greenhalgh, C. J., Viney, E., Willson, T. A., Starr, R., Nicola, N. A., Hilton, D. J., and Alexander, W. S. (2000). Gigantism in mice lacking suppressor of cytokine signalling-2. *Nature* 405, 1069-1073.

Metcalf, D., Mifsud, S., Di Rago, L., Nicola, N. A., Hilton, D. J., and Alexander, W. S. (2002). Polycystic kidneys and chronic inflammatory lesions are the delayed consequences of loss of the suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS-1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 943-948.

Miyakawa, Y., Rojnuckarin, P., Habib, T., and Kaushansky, K. (2001). Thrombopoietin induces phosphoinositol 3-kinase activation through SHP2, Gab, and insulin receptor substrate proteins in BAF3 cells and primary murine megakaryocytes. *J Biol Chem* 276, 2494-2502.

Miyoshi, H., Fujie, H., Moriya, K., Shintani, Y., Tsutsumi, T., Makuuchi, M., Kimura, S., and Koike, K. (2004). Methylation status of suppressor of cytokine signaling-1 gene in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 39, 563-569.

Miyoshi, K., Shillingford, J. M., Smith, G. H., Grimm, S. L., Wagner, K. U., Oka, T., Rosen, J. M., Robinson, G. W., and Hennighausen, L. (2001). Signal transducer and activator of transcription (Stat) 5 controls the proliferation and differentiation of mammary alveolar epithelium. *J Cell Biol* 155, 531-542.

Monni, R., Santos, S. C., Mauchauffe, M., Berger, R., Ghysdael, J., Gouilleux, F., Gisselbrecht, S., Bernard, O., and Penard-Lacronique, V. (2001). The TEL-Jak2 oncoprotein induces Socs1 expression and altered cytokine response in Ba/F3 cells. *Oncogene* 20, 849-858.

Mooney, R. A., Senn, J., Cameron, S., Inamdar, N., Boivin, L. M., Shang, Y., and Furlanetto, R. W. (2001). Suppressors of cytokine signaling-1 and -6 associate with and inhibit the insulin receptor. A potential mechanism for cytokine-mediated insulin resistance. *J Biol Chem* 276, 25889-25893.

Moorefield, K. S., Fry, S. J., and Horowitz, J. M. (2004). Sp2 DNA binding activity and trans-activation are negatively regulated in mammalian cells. *J Biol Chem* 279, 13911-13924.

Moorefield, K. S., Yin, H., Nichols, T. D., Cathcart, C., Simmons, S. O., and Horowitz, J. M. (2006). Sp2 localizes to subnuclear foci associated with the nuclear matrix. *Mol Biol Cell* *17*, 1711-1722.

Moreno-Bueno, G., Portillo, F., and Cano, A. (2008). Transcriptional regulation of cell polarity in EMT and cancer. *Oncogene* *27*, 6958-6969.

Morgan, K. J., and Gilliland, D. G. (2008). A role for JAK2 mutations in myeloproliferative diseases. *Annu Rev Med* *59*, 213-222.

Moriggl, R., Gouilleux-Gruart, V., Jahne, R., Berchtold, S., Gartmann, C., Liu, X., Hennighausen, L., Sotiropoulos, A., Groner, B., and Gouilleux, F. (1996). Deletion of the carboxyl-terminal transactivation domain of MGF-Stat5 results in sustained DNA binding and a dominant negative phenotype. *Mol Cell Biol* *16*, 5691-5700.

Mosesson, Y., Mills, G. B., and Yarden, Y. (2008). Derailed endocytosis: an emerging feature of cancer. *Nat Rev Cancer* *8*, 835-850.

Mostecky, J., Showalter, B. M., and Rothman, P. B. (2005). Early growth response-1 regulates lipopolysaccharide-induced suppressor of cytokine signaling-1 transcription. *J Biol Chem* *280*, 2596-2605.

Mowen, K. A., Tang, J., Zhu, W., Schurter, B. T., Shuai, K., Herschman, H. R., and David, M. (2001). Arginine methylation of STAT1 modulates IFN α /beta-induced transcription. *Cell* *104*, 731-741.

Murray, P. J. (2007). The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *J Immunol* *178*, 2623-2629.

Myers, M. P., Andersen, J. N., Cheng, A., Tremblay, M. L., Horvath, C. M., Parisien, J. P., Salmeen, A., Barford, D., and Tonks, N. K. (2001). TYK2 and JAK2 are substrates of protein-tyrosine phosphatase 1B. *J Biol Chem* *276*, 47771-47774.

Nagai, H., Naka, T., Terada, Y., Komazaki, T., Yabe, A., Jin, E., Kawanami, O., Kishimoto, T., Konishi, N., Nakamura, M., *et al.* (2003). Hypermethylation associated with inactivation of the SOCS-1 gene, a JAK/STAT inhibitor, in human hepatoblastomas. *J Hum Genet* *48*, 65-69.

Naghavi, M. H., and Goff, S. P. (2007). Retroviral proteins that interact with the host cell cytoskeleton. *Curr Opin Immunol* *19*, 402-407.

Naka, T., Fujimoto, M., Tsutsui, H., and Yoshimura, A. (2005). Negative regulation of cytokine and TLR signalings by SOCS and others. *Adv Immunol* *87*, 61-122.

Naka, T., Matsumoto, T., Narazaki, M., Fujimoto, M., Morita, Y., Ohsawa, Y., Saito, H., Nagasawa, T., Uchiyama, Y., and Kishimoto, T. (1998). Accelerated apoptosis of lymphocytes by augmented induction of Bax in SSI-1 (STAT-induced STAT inhibitor-1) deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 15577-15582.

Naka, T., Narazaki, M., Hirata, M., Matsumoto, T., Minamoto, S., Aono, A., Nishimoto, N., Kajita, T., Taga, T., Yoshizaki, K., *et al.* (1997). Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature* *387*, 924-929.

Nakagawa, R., Naka, T., Tsutsui, H., Fujimoto, M., Kimura, A., Abe, T., Seki, E., Sato, S., Takeuchi, O., Takeda, K., *et al.* (2002). SOCS-1 participates in negative regulation of LPS responses. *Immunity* *17*, 677-687.

Nandi, D., Tahiliani, P., Kumar, A., and Chandu, D. (2006). The ubiquitin-proteasome system. *J Biosci* *31*, 137-155.

Narazaki, M., Fujimoto, M., Matsumoto, T., Morita, Y., Saito, H., Kajita, T., Yoshizaki, K., Naka, T., and Kishimoto, T. (1998). Three distinct domains of SSI-1/SOCS-1/JAB protein are required for its suppression of interleukin 6 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 13130-13134.

Nawshad, A., Lagamba, D., Polad, A., and Hay, E. D. (2005). Transforming growth factor-beta signaling during epithelial-mesenchymal transformation: implications for embryogenesis and tumor metastasis. *Cells Tissues Organs* 179, 11-23.

Neel, B. G., Gu, H., and Pao, L. (2003). The 'Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. *Trends Biochem Sci* 28, 284-293.

Nelms, K., Keegan, A. D., Zamorano, J., Ryan, J. J., and Paul, W. E. (1999). The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu Rev Immunol* 17, 701-738.

Ni, Z., Abou El Hassan, M., Xu, Z., Yu, T., and Bremner, R. (2008). The chromatin-remodeling enzyme BRG1 coordinates CIITA induction through many interdependent distal enhancers. *Nat Immunol* 9, 785-793.

Nicholson, S. E., De Souza, D., Fabri, L. J., Corbin, J., Willson, T. A., Zhang, J. G., Silva, A., Asimakis, M., Farley, A., Nash, A. D., *et al.* (2000). Suppressor of cytokine signaling-3 preferentially binds to the SHP-2-binding site on the shared cytokine receptor subunit gp130. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6493-6498.

Nicholson, S. E., Metcalf, D., Sprigg, N. S., Columbus, R., Walker, F., Silva, A., Cary, D., Willson, T. A., Zhang, J. G., Hilton, D. J., *et al.* (2005). Suppressor of cytokine signaling (SOCS)-5 is a potential negative regulator of epidermal growth factor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 2328-2333.

Nicholson, S. E., Willson, T. A., Farley, A., Starr, R., Zhang, J. G., Baca, M., Alexander, W. S., Metcalf, D., Hilton, D. J., and Nicola, N. A. (1999). Mutational analyses of the SOCS proteins suggest a dual domain requirement but distinct mechanisms for inhibition of LIF and IL-6 signal transduction. *Embo J* 18, 375-385.

Nierodzik, M. L., and Karpatkin, S. (2006). Thrombin induces tumor growth, metastasis, and angiogenesis: Evidence for a thrombin-regulated dormant tumor phenotype. *Cancer Cell* 10, 355-362.

Nishi, M., Ryo, A., Tsurutani, N., Ohba, K., Sawasaki, T., Morishita, R., Perrem, K., Aoki, I., Morikawa, Y., and Yamamoto, N. (2009). Requirement for microtubule integrity in the SOCS1-mediated intracellular dynamics of HIV-1 Gag. *FEBS Lett* 583, 1243-1250.

Niwa, Y., Kanda, H., Shikauchi, Y., Saiura, A., Matsubara, K., Kitagawa, T., Yamamoto, J., Kubo, T., and Yoshikawa, H. (2005). Methylation silencing of SOCS-3 promotes cell growth and migration by enhancing JAK/STAT and FAK signalings in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 24, 6406-6417.

Noe, V., Fingleton, B., Jacobs, K., Crawford, H. C., Vermeulen, S., Steelant, W., Bruyneel, E., Matrisian, L. M., and Mareel, M. (2001). Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. *J Cell Sci* 114, 111-118.

Noonan, J. A. (2006). Noonan syndrome and related disorders: alterations in growth and puberty. *Rev Endocr Metab Disord* 7, 251-255.

O'Shea, J. J., Gadina, M., and Schreiber, R. D. (2002). Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell* 109 *Suppl*, S121-131.

Ogino, S., Kawasaki, T., Kirkner, G. J., Kraft, P., Loda, M., and Fuchs, C. S. (2007). Evaluation of markers for CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer by a large population-based sample. *J Mol Diagn* 9, 305-314.

Oh, J., Hur, M. W., and Lee, C. E. (2009). SOCS1 protects protein tyrosine phosphatases by thioredoxin upregulation and attenuates Jaks to suppress ROS-mediated apoptosis. *Oncogene*.

Ohya, K., Kajigaya, S., Yamashita, Y., Miyazato, A., Hatake, K., Miura, Y., Ikeda, U., Shimada, K., Ozawa, K., and Mano, H. (1997). SOCS-1/JAB/SSI-1 can bind to and suppress Tec protein-tyrosine kinase. *J Biol Chem* 272, 27178-27182.

Oikonomou, E., and Pintzas, A. (2006). Cancer genetics of sporadic colorectal cancer: BRAF and PI3KCA mutations, their impact on signaling and novel targeted therapies. *Anticancer Res* 26, 1077-1084.

Okochi, O., Hibi, K., Sakai, M., Inoue, S., Takeda, S., Kaneko, T., and Nakao, A. (2003). Methylation-mediated silencing of SOCS-1 gene in hepatocellular carcinoma derived from cirrhosis. *Clin Cancer Res* 9, 5295-5298.

Orr, S. J., Morgan, N. M., Buick, R. J., Boyd, C. R., Elliott, J., Burrows, J. F., Jefferies, C. A., Crocker, P. R., and Johnston, J. A. (2007a). SOCS3 targets Siglec 7 for proteasomal degradation and blocks Siglec 7-mediated responses. *J Biol Chem* 282, 3418-3422.

Orr, S. J., Morgan, N. M., Elliott, J., Burrows, J. F., Scott, C. J., McVicar, D. W., and Johnston, J. A. (2007b). CD33 responses are blocked by SOCS3 through accelerated proteasomal-mediated turnover. *Blood* 109, 1061-1068.

Oshimo, Y., Kuraoka, K., Nakayama, H., Kitadai, Y., Yoshida, K., Chayama, K., and Yasui, W. (2004). Epigenetic inactivation of SOCS-1 by CpG island hypermethylation in human gastric carcinoma. *Int J Cancer* 112, 1003-1009.

Ozaki, K., and Leonard, W. J. (2002). Cytokine and cytokine receptor pleiotropy and redundancy. *J Biol Chem* 277, 29355-29358.

Park, C. S., Kim, O. S., Yun, S. M., Jo, S. A., Jo, I., and Koh, Y. H. (2008a). Presenilin 1/gamma-secretase is associated with cadmium-induced E-cadherin cleavage and COX-2 gene expression in T47D breast cancer cells. *Toxicol Sci* 106, 413-422.

Park, S. M., Gaur, A. B., Lengyel, E., and Peter, M. E. (2008b). The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes Dev* 22, 894-907.

Peinado, H., Olmeda, D., and Cano, A. (2007). Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer* 7, 415-428.

Pellegrini, S., and Dusanter-Fourt, I. (1997). The structure, regulation and function of the Janus kinases (JAKs) and the signal transducers and activators of transcription (STATs). *Eur J Biochem* 248, 615-633.

Peraldi, P., Filloux, C., Emanuelli, B., Hilton, D. J., and Van Obberghen, E. (2001). Insulin induces suppressor of cytokine signaling-3 tyrosine phosphorylation through janus-activated kinase. *J Biol Chem* 276, 24614-24620.

Perron, M. P., and Provost, P. (2009). Protein components of the microRNA pathway and human diseases. *Methods Mol Biol* 487, 369-385.

Petroski, M. D., and Deshaies, R. J. (2005). Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 9-20.

Piessevaux, J., Lavens, D., Peelman, F., and Tavernier, J. (2008). The many faces of the SOCS box. *Cytokine Growth Factor Rev* 19, 371-381.

Pinto, D., Gregorieff, A., Begthel, H., and Clevers, H. (2003). Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes Dev* 17, 1709-1713.

Polyak, K., and Weinberg, R. A. (2009). Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* 9, 265-273.

Pommier, Y., and Kohn, K. W. (2003). [Cell cycle and checkpoints in oncology: new therapeutic targets]. *Med Sci (Paris)* 19, 173-186.

Porciello, R., Divona, L., Strano, S., Carbone, A., Calvieri, C., and Giustini, S. (2008). Leopard syndrome. *Dermatol Online J* 14, 7.

Precious, B., Young, D. F., Andrejeva, L., Goodbourn, S., and Randall, R. E. (2005). In vitro and in vivo specificity of ubiquitination and degradation of STAT1 and STAT2 by the V proteins of the paramyxoviruses simian virus 5 and human parainfluenza virus type 2. *J Gen Virol* 86, 151-158.

Qu, C. K. (2000). The SHP-2 tyrosine phosphatase: signaling mechanisms and biological functions. *Cell Res* 10, 279-288.

Rane, S. G., and Reddy, E. P. (2000). Janus kinases: components of multiple signaling pathways. *Oncogene* 19, 5662-5679.

Rashid, M. G., Sanda, M. G., Vallorosi, C. J., Rios-Doria, J., Rubin, M. A., and Day, M. L. (2001). Posttranslational truncation and inactivation of human E-cadherin distinguishes prostate cancer from matched normal prostate. *Cancer Res* 61, 489-492.

Rawlings, J. S., Rennebeck, G., Harrison, S. M., Xi, R., and Harrison, D. A. (2004a). Two *Drosophila* suppressors of cytokine signaling (SOCS) differentially regulate JAK and EGFR pathway activities. *BMC Cell Biol* 5, 38.

Rawlings, J. S., Rosler, K. M., and Harrison, D. A. (2004b). The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci* 117, 1281-1283.

Reddy, J., Shivapurkar, N., Takahashi, T., Parikh, G., Stastny, V., Echebiri, C., Crumrine, K., Zochbauer-Muller, S., Drach, J., Zheng, Y., *et al.* (2005). Differential methylation of genes that regulate cytokine signaling in lymphoid and hematopoietic tumors. *Oncogene* 24, 732-736.

Reich, N. C., and Liu, L. (2006). Tracking STAT nuclear traffic. *Nat Rev Immunol* 6, 602-612.

Reik, W., and Dean, W. (2001). DNA methylation and mammalian epigenetics. *Electrophoresis* 22, 2838-2843.

Reiter, A., Walz, C., Watmore, A., Schoch, C., Blau, I., Schlegelberger, B., Berger, U., Telford, N., Aruliah, S., Yin, J. A., *et al.* (2005). The t(8;9)(p22;p24) is a recurrent abnormality in chronic and acute leukemia that fuses PCM1 to JAK2. *Cancer Res* 65, 2662-2667.

Ren, M., Xu, G., Zeng, J., De Lemos-Chiarandini, C., Adesnik, M., and Sabatini, D. D. (1998). Hydrolysis of GTP on rab11 is required for the direct delivery of transferrin from the pericentriolar recycling compartment to the cell surface but not from sorting endosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6187-6192.

Reynolds, A. B., and Rocznik-Ferguson, A. (2004). Emerging roles for p120-catenin in cell adhesion and cancer. *Oncogene* 23, 7947-7956.

Reynolds, K., Zimmer, A. M., and Zimmer, A. (1996). Regulation of RAR beta 2 mRNA expression: evidence for an inhibitory peptide encoded in the 5'-untranslated region. *J Cell Biol* 134, 827-835.

Rios-Doria, J., Day, K. C., Kuefer, R., Rashid, M. G., Chinnaiyan, A. M., Rubin, M. A., and Day, M. L. (2003). The role of calpain in the proteolytic cleavage of E-cadherin in prostate and mammary epithelial cells. *J Biol Chem* 278, 1372-1379.

Rocznik-Ferguson, A., and Reynolds, A. B. (2003). Regulation of p120-catenin nucleocytoplasmic shuttling activity. *J Cell Sci* 116, 4201-4212.

Ronnstrand, L. (2004). Signal transduction via the stem cell factor receptor/c-Kit. *Cell Mol Life Sci* 61, 2535-2548.

Rottapel, R., Ilangumaran, S., Neale, C., La Rose, J., Ho, J. M., Nguyen, M. H., Barber, D., Dubreuil, P., and de Sepulveda, P. (2002). The tumor suppressor activity of SOCS-1. *Oncogene* 21, 4351-4362.

Rui, L., Yuan, M., Frantz, D., Shoelson, S., and White, M. F. (2002). SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. *J Biol Chem* 277, 42394-42398.

Ryo, A., Tsurutani, N., Ohba, K., Kimura, R., Komano, J., Nishi, M., Soeda, H., Hattori, S., Perrem, K., Yamamoto, M., *et al.* (2008). SOCS1 is an inducible host factor during HIV-1 infection and regulates the intracellular trafficking and stability of HIV-1 Gag. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 294-299.

Sachdev, S., Bruhn, L., Sieber, H., Pichler, A., Melchior, F., and Grosschedl, R. (2001). PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies. *Genes Dev* 15, 3088-3103.

Saharinen, P., Takaluoma, K., and Silvennoinen, O. (2000). Regulation of the Jak2 tyrosine kinase by its pseudokinase domain. *Mol Cell Biol* 20, 3387-3395.

Sahni, M., Raz, R., Coffin, J. D., Levy, D., and Basilico, C. (2001). STAT1 mediates the increased apoptosis and reduced chondrocyte proliferation in mice overexpressing FGF2. *Development* 128, 2119-2129.

Saito, H., Morita, Y., Fujimoto, M., Narazaki, M., Naka, T., and Kishimoto, T. (2000). IFN regulatory factor-1-mediated transcriptional activation of mouse STAT-induced STAT inhibitor-1 gene promoter by IFN-gamma. *J Immunol* 164, 5833-5843.

Sakai, I., Takeuchi, K., Yamauchi, H., Narumi, H., and Fujita, S. (2002). Constitutive expression of SOCS3 confers resistance to IFN-alpha in chronic myelogenous leukemia cells. *Blood* 100, 2926-2931.

Sakamoto, H., Yasukawa, H., Masuhara, M., Tanimura, S., Sasaki, A., Yuge, K., Ohtsubo, M., Ohtsuka, A., Fujita, T., Ohta, T., *et al.* (1998). A Janus kinase inhibitor, JAB, is an interferon-gamma-inducible gene and confers resistance to interferons. *Blood* 92, 1668-1676.

Sana, T. R., Janatpour, M. J., Sathe, M., McEvoy, L. M., and McClanahan, T. K. (2005). Microarray analysis of primary endothelial cells challenged with different inflammatory and immune cytokines. *Cytokine* 29, 256-269.

Sasaki, A., Yasukawa, H., Suzuki, A., Kamizono, S., Syoda, T., Kinjyo, I., Sasaki, M., Johnston, J. A., and Yoshimura, A. (1999). Cytokine-inducible SH2 protein-3 (CIS3/SOCS3) inhibits Janus tyrosine kinase by binding through the N-terminal kinase inhibitory region as well as SH2 domain. *Genes Cells* 4, 339-351.

Saxton, T. M., Henkemeyer, M., Gasca, S., Shen, R., Rossi, D. J., Shalaby, F., Feng, G. S., and Pawson, T. (1997). Abnormal mesoderm patterning in mouse embryos mutant for the SH2 tyrosine phosphatase Shp-2. *Embo J* 16, 2352-2364.

Schaller, M. D. (2001). Biochemical signals and biological responses elicited by the focal adhesion kinase. *Biochim Biophys Acta* 1540, 1-21.

Schluter, G., Boinska, D., and Nieman-Seyde, S. C. (2000). Evidence for translational repression of the SOCS-1 major open reading frame by an upstream open reading frame. *Biochem Biophys Res Commun* 268, 255-261.

Schmitz, J., Weissenbach, M., Haan, S., Heinrich, P. C., and Schaper, F. (2000). SOCS3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130. *J Biol Chem* 275, 12848-12856.

Schneider, Y. J., and Trouet, A. (1981). Effect of chloroquine and methylamine on endocytosis of fluorescein-labelled controlled IgG and of anti-(plasma membrane) IgG by cultured fibroblasts. *Eur J Biochem* 118, 33-38.

Schrader, K. A., Masciari, S., Boyd, N., Wiyrick, S., Kaurah, P., Senz, J., Burke, W., Lynch, H. T., Garber, J. E., and Huntsman, D. G. (2008). Hereditary diffuse gastric cancer: association with lobular breast cancer. *Fam Cancer* 7, 73-82.

Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T., and Hume, D. A. (2004). Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 75, 163-189.

Schwaller, J., Parganas, E., Wang, D., Cain, D., Aster, J. C., Williams, I. R., Lee, C. K., Gerthner, R., Kitamura, T., Frantsve, J., *et al.* (2000). Stat5 is essential for the myelo- and lymphoproliferative disease induced by TEL/JAK2. *Mol Cell* 6, 693-704.

Scoville, D. H., Sato, T., He, X. C., and Li, L. (2008). Current view: intestinal stem cells and signaling. *Gastroenterology* 134, 849-864.

Seki, Y., Hayashi, K., Matsumoto, A., Seki, N., Tsukada, J., Ransom, J., Naka, T., Kishimoto, T., Yoshimura, A., and Kubo, M. (2002). Expression of the suppressor of cytokine signaling-5 (SOCS5) negatively regulates IL-4-dependent STAT6 activation and Th2 differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 13003-13008.

Sengupta, T. K., Talbot, E. S., Scherle, P. A., and Ivashkiv, L. B. (1998). Rapid inhibition of interleukin-6 signaling and Stat3 activation mediated by mitogen-activated protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 11107-11112.

Shanmugathan, M., and Jothy, S. (2000). Apoptosis, anoikis and their relevance to the pathobiology of colon cancer. *Pathol Int* 50, 273-279.

Sharrocks, A. D. (2006). PIAS proteins and transcriptional regulation--more than just SUMO E3 ligases? *Genes Dev* 20, 754-758.

Shen, L., Evel-Kabler, K., Strube, R., and Chen, S. Y. (2004). Silencing of SOCS1 enhances antigen presentation by dendritic cells and antigen-specific anti-tumor immunity. *Nat Biotechnol* 22, 1546-1553.

Shen, L., and Issa, J. P. (2002). Epigenetics in colorectal cancer. *Curr Opin Gastroenterol* 18, 68-73.

Shen, L., Toyota, M., Kondo, Y., Lin, E., Zhang, L., Guo, Y., Hernandez, N. S., Chen, X., Ahmed, S., Konishi, K., *et al.* (2007). Integrated genetic and epigenetic analysis identifies three different subclasses of colon cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 18654-18659.

Simoncic, P. D., Lee-Loy, A., Barber, D. L., Tremblay, M. L., and McGlade, C. J. (2002). The T cell protein tyrosine phosphatase is a negative regulator of janus family kinases 1 and 3. *Curr Biol* 12, 446-453.

Smith, C. A., and Fan, G. (2008). The saga of JAK2 mutations and translocations in hematologic disorders: pathogenesis, diagnostic and therapeutic prospects, and revised World Health Organization diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms. *Hum Pathol* 39, 795-810.

Sonnichsen, B., De Renzis, S., Nielsen, E., Rietdorf, J., and Zerial, M. (2000). Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J Cell Biol* 149, 901-914.

Soreide, K., Janssen, E. A., Soiland, H., Korner, H., and Baak, J. P. (2006). Microsatellite instability in colorectal cancer. *Br J Surg* 93, 395-406.

Sparrow, L. E., Eldon, M. J., English, D. R., and Heenan, P. J. (1998). p16 and p21WAF1 protein expression in melanocytic tumors by immunohistochemistry. *Am J Dermatopathol* 20, 255-261.

Stark, G. R., Kerr, I. M., Williams, B. R., Silverman, R. H., and Schreiber, R. D. (1998). How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 67, 227-264.

Starr, R., Metcalf, D., Elefanty, A. G., Brysha, M., Willson, T. A., Nicola, N. A., Hilton, D. J., and Alexander, W. S. (1998a). Liver degeneration and lymphoid deficiencies in mice lacking suppressor of cytokine signaling-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14395-14399.

Starr, R., Metcalf, D., Elefanty, A. G., Brysha, M., Willson, T. A., Nicola, N. A., Hilton, D. J., and Alexander, W. S. (1998b). Liver degeneration and lymphoid deficiencies in mice lacking suppressor of cytokine signaling-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14395-14399.

Starr, R., Willson, T. A., Viney, E. M., Murray, L. J., Rayner, J. R., Jenkins, B. J., Gonda, T. J., Alexander, W. S., Metcalf, D., Nicola, N. A., and Hilton, D. J. (1997). A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 387, 917-921.

Strathdee, G. (2002). Epigenetic versus genetic alterations in the inactivation of E-cadherin. *Semin Cancer Biol* 12, 373-379.

Sun, X. J., Wang, L. M., Zhang, Y., Yenush, L., Myers, M. G., Jr., Glasheen, E., Lane, W. S., Pierce, J. H., and White, M. F. (1995). Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. *Nature* 377, 173-177.

Suske, G. (1999). The Sp-family of transcription factors. *Gene* 238, 291-300.

Sutherland, K. D., Lindeman, G. J., Choong, D. Y., Wittlin, S., Brentzell, L., Phillips, W., Campbell, I. G., and Visvader, J. E. (2004). Differential hypermethylation of SOCS genes in ovarian and breast carcinomas. *Oncogene* 23, 7726-7733.

Takahashi, Y., and Kikuchi, Y. (2005). Yeast PIAS-type Ull1/Siz1 is composed of SUMO ligase and regulatory domains. *J Biol Chem* 280, 35822-35828.

Tanaka, N., Kawakami, T., and Taniguchi, T. (1993). Recognition DNA sequences of interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2, regulators of cell growth and the interferon system. *Mol Cell Biol* 13, 4531-4538.

Tanaka, N., and Taniguchi, T. (2000). The interferon regulatory factors and oncogenesis. *Semin Cancer Biol* 10, 73-81.

Tefferi, A. (2007). JAK2 mutations and clinical practice in myeloproliferative neoplasms. *Cancer J* 13, 366-371.

Ten Dijke, P., Goumans, M. J., Itoh, F., and Itoh, S. (2002). Regulation of cell proliferation by Smad proteins. *J Cell Physiol* 191, 1-16.

ten Hoeve, J., de Jesus Ibarra-Sanchez, M., Fu, Y., Zhu, W., Tremblay, M., David, M., and Shuai, K. (2002). Identification of a nuclear Stat1 protein tyrosine phosphatase. *Mol Cell Biol* 22, 5662-5668.

Teofili, L., Martini, M., Cenci, T., Guidi, F., Torti, L., Giona, F., Foa, R., Leone, G., and Larocca, L. M. (2008). Epigenetic alteration of SOCS family members is a possible pathogenetic mechanism in JAK2 wild type myeloproliferative diseases. *Int J Cancer* 123, 1586-1592.

Thiery, J. P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2, 442-454.

Thiery, J. P., and Sleeman, J. P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 131-142.

To, K. F., Chan, M. W., Leung, W. K., Ng, E. K., Yu, J., Bai, A. H., Lo, A. W., Chu, S. H., Tong, J. H., Lo, K. W., *et al.* (2004). Constitutional activation of IL-6-mediated JAK/STAT pathway through hypermethylation of SOCS-1 in human gastric cancer cell line. *Br J Cancer* 91, 1335-1341.

Tollet-Egnell, P., Flores-Morales, A., Stavreus-Evers, A., Sahlin, L., and Norstedt, G. (1999). Growth hormone regulation of SOCS-2, SOCS-3, and CIS messenger ribonucleic acid expression in the rat. *Endocrinology* 140, 3693-3704.

Tonks, N. K., and Neel, B. G. (2001). Combinatorial control of the specificity of protein tyrosine phosphatases. *Curr Opin Cell Biol* 13, 182-195.

Toomre, D., Keller, P., White, J., Olivo, J. C., and Simons, K. (1999). Dual-color visualization of trans-Golgi network to plasma membrane traffic along microtubules in living cells. *J Cell Sci* 112 (Pt 1), 21-33.

Toyota, M., Ahuja, N., Ohe-Toyota, M., Herman, J. G., Baylin, S. B., and Issa, J. P. (1999a). CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8681-8686.

Toyota, M., Ho, C., Ahuja, N., Jair, K. W., Li, Q., Ohe-Toyota, M., Baylin, S. B., and Issa, J. P. (1999b). Identification of differentially methylated sequences in colorectal cancer by methylated CpG island amplification. *Cancer Res* 59, 2307-2312.

Travagli, J., Letourneur, M., Bertoglio, J., and Pierre, J. (2004). STAT6 and Ets-1 form a stable complex that modulates Socs-1 expression by interleukin-4 in keratinocytes. *J Biol Chem* 279, 35183-35192.

Trowbridge, I. S., and Thomas, M. L. (1994). CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Annu Rev Immunol* 12, 85-116.

Turkson, J., Bowman, T., Garcia, R., Caldenhoven, E., De Groot, R. P., and Jove, R. (1998). Stat3 activation by Src induces specific gene regulation and is required for cell transformation. *Mol Cell Biol* 18, 2545-2552.

Ungureanu, D., Saharinen, P., Junttila, I., Hilton, D. J., and Silvennoinen, O. (2002). Regulation of Jak2 through the ubiquitin-proteasome pathway involves phosphorylation of Jak2 on Y1007 and interaction with SOCS-1. *Mol Cell Biol* 22, 3316-3326.

Ungureanu, D., Vanhatupa, S., Kotaja, N., Yang, J., Aittomaki, S., Janne, O. A., Palvimo, J. J., and Silvennoinen, O. (2003). PIAS proteins promote SUMO-1 conjugation to STAT1. *Blood* 102, 3311-3313.

Valentino, L., and Pierre, J. (2006). JAK/STAT signal transduction: regulators and implication in hematological malignancies. *Biochem Pharmacol* 71, 713-721.

van de Wetering, M., Sancho, E., Verweij, C., de Lau, W., Oving, I., Hurlstone, A., van der Horn, K., Batlle, E., Coudreuse, D., Haramis, A. P., *et al.* (2002). The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* 111, 241-250.

van der Sluijs, P., Hull, M., Webster, P., Male, P., Goud, B., and Mellman, I. (1992). The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway. *Cell* 70, 729-740.

van Roy, F., and Berx, G. (2008). The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell Mol Life Sci* 65, 3756-3788.

Vincent-Salomon, A., Bidard, F. C., and Pierga, J. Y. (2008). Bone marrow micrometastasis in breast cancer: review of detection methods, prognostic impact and biological issues. *J Clin Pathol* 61, 570-576.

Visvader, J. E., and Lindeman, G. J. (2008). Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* 8, 755-768.

Vuong, B. Q., Arenzana, T. L., Showalter, B. M., Losman, J., Chen, X. P., Mostecky, J., Banks, A. S., Limnander, A., Fernandez, N., and Rothman, P. B. (2004). SOCS-1 localizes to the microtubule organizing complex-associated 20S proteasome. *Mol Cell Biol* 24, 9092-9101.

Wagner, K. U., and Rui, H. (2008). Jak2/Stat5 signaling in mammaryogenesis, breast cancer initiation and progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 13, 93-103.

Waiboci, L. W., Ahmed, C. M., Mujtaba, M. G., Flowers, L. O., Martin, J. P., Haider, M. I., and Johnson, H. M. (2007). Both the suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) kinase inhibitory region and SOCS-1 mimetic bind to JAK2 autophosphorylation site: implications for the development of a SOCS-1 antagonist. *J Immunol* 178, 5058-5068.

Wang, S., Yu, W. M., Zhang, W., McCrae, K. R., Neel, B. G., and Qu, C. K. (2009a). Noonan syndrome/leukemia-associated gain-of-function mutations in SHP-2 phosphatase (PTPN11) enhance cell migration and angiogenesis. *J Biol Chem* 284, 913-920.

Wang, X., Lupardus, P., Laporte, S. L., and Garcia, K. C. (2009b). Structural biology of shared cytokine receptors. *Annu Rev Immunol* 27, 29-60.

Wang, Y., Malabarba, M. G., Nagy, Z. S., and Kirken, R. A. (2004). Interleukin 4 regulates phosphorylation of serine 756 in the transactivation domain of Stat6. Roles for multiple phosphorylation sites and Stat6 function. *J Biol Chem* 279, 25196-25203.

Watanabe, D., Ezo, S., Fujimoto, M., Kimura, A., Saito, Y., Nagai, H., Tachibana, I., Matsumura, I., Tanaka, T., Kanegane, H., *et al.* (2004). Suppressor of cytokine signalling-1 gene silencing in acute myeloid leukaemia and human haematopoietic cell lines. *Br J Haematol* 126, 726-735.

Weber, A., Hengge, U. R., Bardenheuer, W., Tischoff, I., Sommerer, F., Markwarth, A., Dietz, A., Wittekind, C., and Tannapfel, A. (2005). SOCS-3 is frequently methylated in head and neck squamous cell carcinoma and its precursor lesions and causes growth inhibition. *Oncogene* 24, 6699-6708.

Weigelt, B., Hu, Z., He, X., Livasy, C., Carey, L. A., Ewend, M. G., Glas, A. M., Perou, C. M., and Van't Veer, L. J. (2005). Molecular portraits and 70-gene prognosis signature are preserved throughout the metastatic process of breast cancer. *Cancer Res* 65, 9155-9158.

Weinberg, R. A. (2008). Leaving home early: reexamination of the canonical models of tumor progression. *Cancer Cell* 14, 283-284.

Weisenberger, D. J., Siegmund, K. D., Campan, M., Young, J., Long, T. I., Faasse, M. A., Kang, G. H., Widschwendter, M., Weener, D., Buchanan, D., *et al.* (2006). CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet* 38, 787-793.

Weissman, A. M. (2001). Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 169-178.

Welch, D. R. (2006). Do we need to redefine a cancer metastasis and staging definitions? *Breast Dis* 26, 3-12.

Wen, Z., and Darnell, J. E., Jr. (1997). Mapping of Stat3 serine phosphorylation to a single residue (727) and evidence that serine phosphorylation has no influence on DNA binding of Stat1 and Stat3. *Nucleic Acids Res* 25, 2062-2067.

Wildenberg, G. A., Dohn, M. R., Carnahan, R. H., Davis, M. A., Lobdell, N. A., Settleman, J., and Reynolds, A. B. (2006). p120-catenin and p190RhoGAP regulate cell-cell adhesion by coordinating antagonism between Rac and Rho. *Cell* 127, 1027-1039.

Winston, L. A., and Hunter, T. (1995). JAK2, Ras, and Raf are required for activation of extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase by growth hormone. *J Biol Chem* 270, 30837-30840.

Wojciak, J. M., Martinez-Yamout, M. A., Dyson, H. J., and Wright, P. E. (2009). Structural basis for recruitment of CBP/p300 coactivators by STAT1 and STAT2 transactivation domains. *Embo J* 28, 948-958.

Wolf, K., Wu, Y. I., Liu, Y., Geiger, J., Tam, E., Overall, C., Stack, M. S., and Friedl, P. (2007). Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion. *Nat Cell Biol* 9, 893-904.

Wormald, S., and Hilton, D. J. (2004). Inhibitors of cytokine signal transduction. *J Biol Chem* 279, 821-824.

Wu, C. J., O'Rourke, D. M., Feng, G. S., Johnson, G. R., Wang, Q., and Greene, M. I. (2001). The tyrosine phosphatase SHP-2 is required for mediating phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activation by growth factors. *Oncogene* 20, 6018-6025.

Wu, H., Rossi, G., and Brennwald, P. (2008). The ghost in the machine: small GTPases as spatial regulators of exocytosis. *Trends Cell Biol* 18, 397-404.

Wyckoff, J., Wang, W., Lin, E. Y., Wang, Y., Pixley, F., Stanley, E. R., Graf, T., Pollard, J. W., Segall, J., and Condeelis, J. (2004). A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors. *Cancer Res* 64, 7022-7029.

Wyckoff, J. B., Jones, J. G., Condeelis, J. S., and Segall, J. E. (2000). A critical step in metastasis: in vivo analysis of intravasation at the primary tumor. *Cancer Res* 60, 2504-2511.

Xiong, H., Zhang, Z. G., Tian, X. Q., Sun, D. F., Liang, Q. C., Zhang, Y. J., Lu, R., Chen, Y. X., and Fang, J. Y. (2008). Inhibition of JAK1, 2/STAT3 signaling induces apoptosis, cell cycle arrest, and reduces tumor cell invasion in colorectal cancer cells. *Neoplasia* 10, 287-297.

Xu, D., and Qu, C. K. (2008). Protein tyrosine phosphatases in the JAK/STAT pathway. *Front Biosci* 13, 4925-4932.

Xu, X., Sun, Y. L., and Hoey, T. (1996). Cooperative DNA binding and sequence-selective recognition conferred by the STAT amino-terminal domain. *Science* 273, 794-797.

Xu, Y., and Pasche, B. (2007). TGF-beta signaling alterations and susceptibility to colorectal cancer. *Hum Mol Genet* 16 *Spec No 1*, R14-20.

Yamada, T., Zhu, D., Saxon, A., and Zhang, K. (2002). CD45 controls interleukin-4-mediated IgE class switch recombination in human B cells through its function as a Janus kinase phosphatase. *J Biol Chem* 277, 28830-28835.

Yanagisawa, M., Huveltdt, D., Kreinest, P., Lohse, C. M., Cheville, J. C., Parker, A. S., Copland, J. A., and Anastasiadis, P. Z. (2008). A p120 catenin isoform switch affects Rho activity, induces tumor cell invasion, and predicts metastatic disease. *J Biol Chem* 283, 18344-18354.

Yasukawa, H., Misawa, H., Sakamoto, H., Masuhara, M., Sasaki, A., Wakioka, T., Ohtsuka, S., Imaizumi, T., Matsuda, T., Ihle, J. N., and Yoshimura, A. (1999a). The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *Embo J* 18, 1309-1320.

Yasukawa, H., Misawa, H., Sakamoto, H., Masuhara, M., Sasaki, A., Wakioka, T., Ohtsuka, S., Imaizumi, T., Matsuda, T., Ihle, J. N., and Yoshimura, A. (1999b). The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *Embo J* 18, 1309-1320.

Yasukawa, H., Ohishi, M., Mori, H., Murakami, M., Chinen, T., Aki, D., Hanada, T., Takeda, K., Akira, S., Hoshijima, M., *et al.* (2003). IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages. *Nat Immunol* 4, 551-556.

Yoo, J. H., Park, T. S., Maeng, H. Y., Sun, Y. K., Kim, Y. A., Kie, J. H., Cho, E. H., Song, J., Lee, K. A., Suh, B., and Choi, J. R. (2009). JAK2 V617F/C618R mutation in a patient with polycythemia vera: a case study and review of the literature. *Cancer Genet Cytogenet* 189, 43-47.

Yoshida, T., Ogata, H., Kamio, M., Joo, A., Shiraishi, H., Tokunaga, Y., Sata, M., Nagai, H., and Yoshimura, A. (2004). SOCS1 is a suppressor of liver fibrosis and hepatitis-induced carcinogenesis. *J Exp Med* 199, 1701-1707.

Yoshikawa, H., Matsubara, K., Qian, G. S., Jackson, P., Groopman, J. D., Manning, J. E., Harris, C. C., and Herman, J. G. (2001). SOCS-1, a negative regulator of the JAK/STAT pathway, is silenced by methylation in human hepatocellular carcinoma and shows growth-suppression activity. *Nat Genet* 28, 29-35.

Yoshimura, A., Ohkubo, T., Kiguchi, T., Jenkins, N. A., Gilbert, D. J., Copeland, N. G., Hara, T., and Miyajima, A. (1995). A novel cytokine-inducible gene CIS encodes an SH2-containing protein that binds to tyrosine-phosphorylated interleukin 3 and erythropoietin receptors. *Embo J* 14, 2816-2826.

Yu, C. L., Jin, Y. J., and Burakoff, S. J. (2000). Cytosolic tyrosine dephosphorylation of STAT5. Potential role of SHP-2 in STAT5 regulation. *J Biol Chem* 275, 599-604.

Zeng, R., Aoki, Y., Yoshida, M., Arai, K., and Watanabe, S. (2002). Stat5B shuttles between cytoplasm and nucleus in a cytokine-dependent and -independent manner. *J Immunol* 168, 4567-4575.

Zhang, J. G., Farley, A., Nicholson, S. E., Willson, T. A., Zugaro, L. M., Simpson, R. J., Moritz, R. L., Cary, D., Richardson, R., Hausmann, G., *et al.* (1999). The conserved SOCS box motif in suppressors of cytokine signaling binds to elongins B and C and may couple bound proteins to proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2071-2076.

Zhang, J. G., Metcalf, D., Rakar, S., Asimakis, M., Greenhalgh, C. J., Willson, T. A., Starr, R., Nicholson, S. E., Carter, W., Alexander, W. S., *et al.* (2001). The SOCS box of suppressor of cytokine signaling-1 is important for inhibition of cytokine action in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 13261-13265.

Zhang, Y. G., Du, J., Tian, X. X., Zhong, Y. F., and Fang, W. G. (2007). Expression of E-cadherin, beta-catenin, cathepsin D, gelatinases and their inhibitors in invasive ductal breast carcinomas. *Chin Med J (Engl)* 120, 1597-1605.

Zhou, Y. J., Hanson, E. P., Chen, Y. Q., Magnuson, K., Chen, M., Swann, P. G., Wange, R. L., Changelian, P. S., and O'Shea, J. J. (1997). Distinct tyrosine phosphorylation sites in JAK3 kinase domain positively and negatively regulate its enzymatic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13850-13855.

Zhu, W., Mustelin, T., and David, M. (2002). Arginine methylation of STAT1 regulates its dephosphorylation by T cell protein tyrosine phosphatase. *J Biol Chem* 277, 35787-35790.

Zhu, X., Wen, Z., Xu, L. Z., and Darnell, J. E., Jr. (1997). Stat1 serine phosphorylation occurs independently of tyrosine phosphorylation and requires an activated Jak2 kinase. *Mol Cell Biol* 17, 6618-6623.

Zhuang, D., Qiu, Y., Haque, S. J., and Dong, F. (2005). Tyrosine 729 of the G-CSF receptor controls the duration of receptor signaling: involvement of SOCS3 and SOCS1. *J Leukoc Biol* 78, 1008-1015.