

Université de Montréal

Mécanismes moléculaires de régulation de l'interaction
SOCS1-p53 et leurs impacts sur la suppression tumorale

par

Emmanuelle Saint-Germain

Département de biochimie et médecine moléculaire

Université de Montréal

Thèse présentée à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de docteur
en biochimie et médecine moléculaire

Mars 2018

© Emmanuelle Saint-Germain, 2018

Résumé

Les mécanismes de suppression tumorale sont à la base des processus qui protègent l'organisme contre l'apparition de tumeurs malignes. Ces mécanismes sont nombreux et chacun d'entre eux est contrôlé par une pléthore de voies de signalisation. Ces différentes voies de signalisation se recoupent en général par l'activation de certaines protéines centrales, comme p53 par exemple, qui est considéré le gardien du génome. Ces protéines, comme p53, peuvent généralement contrôler plusieurs mécanismes de suppression tumorale, mais la spécificité par laquelle elles activent une voie plutôt qu'une autre est encore mal connue. Or, ces protéines étant fréquemment impliquées dans le processus de transformation maligne, la compréhension de leurs fonctions et de leur régulation pourrait permettre de moduler leurs activités dans des contextes précis.

Notre laboratoire a découvert que SOCS1 (*Suppressor of Cytokine Signaling 1*), une protéine majoritairement considérée comme un suppresseur de tumeur et un inhibiteur de voies de signalisation pro-inflammatoires, interagit avec p53 dans le cadre de la sénescence cellulaire, facilitant sa phosphorylation par ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) et ainsi son activation. Comment SOCS1 contrôle cette voie de signalisation demeure toutefois méconnu. Cette thèse avait pour but de mieux comprendre comment SOCS1 influence la voie de signalisation de p53.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à identifier les cibles transcriptionnelles de p53 qui sont spécifiquement modulées par SOCS1. En effet, p53 est connu pour contrôler des centaines de cibles et il existe de grandes lacunes quant à savoir lesquelles sont importantes pour la suppression tumorale en générale. Une des approches utilisées pour approfondir ces connaissances consiste à définir les cibles de manière contexte-dépendant. Connaître les voies de signalisation qui sont contrôlées par SOCS1 via l'intermédiaire de p53 nous a permis de découvrir que SOCS1 est impliqué dans l'induction d'un nouveau mécanisme de suppression tumorale, la mort cellulaire programmée appelée ferroptose.

Dans un second temps, nous avons voulu comprendre les mécanismes moléculaires par lesquels SOCS1 interagit avec p53. Nous avons déterminé que ce sont les acides aminés tryptophane 53 et phénylalanine 54 du TAD2 de p53 qui permettent l'interaction avec les résidus

tyrosine (Y) 80 et tryptophane (W) 81 de SOCS1. La mutation de la tyrosine et du tryptophane de SOCS1 résulte en une perte d'interaction avec p53 et une incapacité à arrêter la prolifération des cellules cancéreuses. Nous avons aussi découvert un tout nouveau mode de régulation de SOCS1 : la protéine est phosphorylée sur la Y80 par les membres de la famille SRC. Cette phosphorylation semble inhiber les fonctions de suppression tumorale de SOCS1 et est dérégulée dans des tissus de patients atteints de lymphomes par rapport aux tissus de ganglions normaux. Enfin, nous avons aussi découvert que SOCS1 peut former des dimères, à la fois *in vitro* et au sein des cellules, et que cela semble être la forme phosphorylée de SOCS1 qui dimérise. Cela ouvre la porte à toute une nouvelle biologie pour la protéine SOCS1.

Mots-clés : SOCS1, p53, Sénescence, Ferroptose, Kinases, SRC, SFK, Phosphorylation, Cancer, YES1

Abstract

Tumor suppressor mechanisms are among the main processes that protect the organism against the development of malignant tumors. These mechanisms are numerous and each of them is regulated by a plethora of signaling pathways. These different signaling pathways, however, tend to converge towards the activation of a few central proteins, like p53, the so-called guardian of the genome for example, that are considered the main tumor suppressors of the cell. These proteins can themselves control many different mechanisms of tumor suppression. The specificity by which p53 controls one signaling pathway over another is still badly understood. Since this protein is involved in the malignant transformation of cells, the comprehension of how these functions are regulated is crucial in order to be eventually able to modulate their activities in specific contexts like cancer.

Our laboratory has discovered that SOCS1 (*Suppressor of Cytokine Signaling 1*), a protein mainly considered as a tumor suppressor and a negative regulator of inflammatory signaling pathways, interacts with p53 in the context of cellular senescence and facilitates its phosphorylation by ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) and thus its activation. How SOCS1 controls the p53 signaling pathway, however, remained unknown. The goal of this thesis was to understand how SOCS1 regulates the p53 signaling pathway.

First of all, we identified the transcriptional targets of p53 that are specifically modulated by SOCS1. P53 is known to regulate hundreds of targets and those important for tumors suppression still constitute a debate. One approach used to better understand how p53 functions is to identify which targets are important in which context. Knowing which p53 pathways are regulated by SOCS1 allowed us to discover that SOCS1 can regulate ferroptosis, a type of programmed cell death that seems very important for the tumor suppressor functions of p53.

We then aimed our efforts at identifying the molecular components regulating the interaction between p53 and SOCS1. We determined that the amino acids tryptophan 53 and phenylalanine 54 of p53 TAD2 are crucial for the interaction with residues tyrosine 80 and tryptophan 81 within the SH2 domain of SOCS1. Mutating Y80 and W81 of SOCS1 results in a loss of interaction with p53 and the incapacity for SOCS1 to arrest the growth of cancer cells. We also discovered a new mode of regulation of SOCS1: the protein is phosphorylated on Y80

by the SRC family kinases. This phosphorylation seems to inhibit SOCS1's tumor suppressor functions and is deregulated in the tissue samples of patients with lymphoma compared to normal lymph node samples. Finally, we discovered that SOCS1 can form dimers, both *in vitro* and in cells and it is the phosphorylated form of SOCS1 that dimerizes. This opens the door to a new biology for SOCS1.

Keywords : SOCS1, p53, Senescence, Ferroptosis, Kinases, SFKs, SRC, Phosphorylation, Cancer, YES1

Table des matières

RÉSUMÉ	I
ABSTRACT	III
TABLE DES MATIÈRES	V
LISTE DES TABLEAUX	VIII
LISTE DES FIGURES	IX
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	XII
REMERCIEMENTS	XIX
1. INTRODUCTION	1
1.1 Avant-propos	1
1.2 La transformation tumorale	2
1.3 La sénescence	4
1.4 La protéine p53	8
1.4.1 Historique de la découverte de p53	8
1.4.2 Les domaines protéiques de p53	9
1.4.3 Mécanismes d'activation et régulation post-traductionnelle de p53.....	13
1.4.4 La Régulation Transcriptionnelle de p53	17
1.4.5 Cibler la voie de p53 d'un point de vue thérapeutique.....	22
1.5 La ferroptose	25
1.5.1 Définition de la ferroptose.....	25
1.5.2 Contrôle biochimique de la ferroptose.....	26
1.5.3 Caractéristiques de la ferroptose.....	30
1.5.4 Ferroptose et pathologies	31
1.6 La protéine SOCS1 et la voie JAK/STAT	33
1.6.1 La voie de signalisation JAK/STAT.....	33
1.6.2 La famille des SOCS – structure et fonction.....	35
1.6.3 SOCS1 et sa biologie	38
1.6.4 Régulation de SOCS1	40
1.6.5 SOCS1 en tant que suppresseur tumoral	42
1.6.6 Fonctions oncogéniques de SOCS1	44

1.7 La famille des kinases SRC	45
1.7.1 Généralités.....	45
1.7.2 Structure et fonction.....	46
1.7.3 Substrats des SRC.....	49
1.7.4 Fonctions des SRC.....	50
1.7.5 SRC, cancer et potentiel thérapeutique.....	52
1.8 Objectifs de la thèse	54
2. SOCS1 REGULATES SENESCENCE AND FERROPTOSIS BY MODULATING THE EXPRESSION OF P53 TARGET GENES	57
2.1 Présentation de l'article 1	58
2.2 Article 1	59
2.2.1 Abstract.....	60
2.2.2 Introduction.....	61
2.2.3 Results.....	63
2.2.4 Discussion.....	68
2.2.5 Concluding remarks	70
2.2.6 Materials and methods	71
2.2.7 References.....	77
2.2.8 Legends	83
2.2.9 Tables.....	87
2.2.10 Figures	90
2.2.11 Supplementary legends.....	97
2.2.12 Supplementary Figures.....	99
3. SRC-FAMILY KINASES CONTROL THE SOCS1-P53 AXIS BY PHOSPHORYLATING SOCS1 ON TYROSINE 80.	104
3.1 Présentation de l'article 2	105
3.2 Article 2	107
3.2.1 Abstract.....	108
3.2.2 Introduction.....	109
3.2.3 Results.....	110
3.2.4 Discussion.....	115
3.2.5 Materials and methods	118

3.2.6 References.....	126
3.2.7 Legends	132
3.2.8 Figures	136
3.2.9 Supplementary legends.....	143
3.2.10 Supplementary figures.....	145
4. DISCUSSION	150
4.1 Discussion du chapitre 2	150
4.1.1 SOCS1 active un programme transcriptionnel spécifique.....	150
4.1.2 SOCS1, p53 et la régulation de l'immunité.....	153
4.1.3 SOCS1, un nouveau régulateur de ferroptose.....	154
4.1.4 SOCS1 et la régulation par KAP1.....	157
4.2 Discussion du chapitre 3	158
4.2.1 SOCS1, un régulateur transcriptionnel?.....	159
4.2.2 Modifications post-traductionnelles de SOCS1	160
4.2.3 Un mécanisme généralisé?.....	161
4.2.4 Régulation de SOCS1 par phosphorylation et dimérisation	162
4.2.5 Régulation des SOCS par les SFK.....	165
4.2.6 SOCS1, p53 et les SFK dans les cancers hématopoïétiques.....	166
4.3 Conclusion.....	168
ANNEXE.....	171
BIBLIOGRAPHIE.....	I

Liste des tableaux

Chapitre 1 Introduction

Tableau 1.1 Résumé des phénotypes associés aux différents mutants de p53.....	11
Table 2.1 List of SOCS1-dependent p53 target genes identified by microarray analysis	87
Table 2.2 List of potential SOCS1 dependent p53 target genes identified by DiRE analysis	88
Table 2.3 Cancer vs. Normal expression of SOCS1-dependent p53 target genes identified by DiRE ..	89

Liste des figures

Chapitre 1. Introduction

Figure 1.1 Caractéristiques des cellules tumorales	3
Figure 1.2 Causes et conséquences de la sénescence cellulaire	5
Figure 1.3 Effets pro-tumoraux et anti-tumoraux du SASP	7
Figure 1.4 Schématisation des domaines fonctionnels de p53.....	9
Figure 1.5 Modifications post-traductionnelles de p53.....	14
Figure 1.6 Voies de signalisation contrôlant la ferroptose	29
Figure 1.7 La voie de signalisation JAK/STAT	34
Figure 1.8 Domaines fonctionnels des protéines de la famille SOCS	36
Figure 1.9 Modèle des formes inactive et active des SFK	46
Figure 1.10 Spécificité de phosphorylation des SFK.....	49

Chapitre 2. Article 1

Figure 2.1 Microarray analysis identifies SOCS1-dependent p53 target genes	90
Figure 2.2 Correlation between SOCS1 and p53-target gene expression in hepatocellular carcinoma samples	91
Figure 2.3 The regulation of p53 target genes by SOCS1 is not dependent on a disabled RB pathway	92
Figure 2.4 SOCS1 overexpression is sufficient to regulate the expression of SOCS1-dependent p53 target genes	93

Figure 2.5 SOCS1 sensitizes cells to ferroptosis.....	94
Figure 2.6 Ferroptosis sensitivity in senescent cells depends on the trigger	95
Figure 2.7 SOCS1 favors p53 accumulation in response to Doxorubicin.	96
Supplementary figure 2.1 David Analysis identifies Secreted proteins as differentially regulated in cells with SOCS1 knockdown.....	99
Supplementary figure 2.2 Validation of SOCS1-dependent p53 target genes with two shRNAs against SOCS1.....	100
Supplementary figure 2.3 Correlation between SOCS1 and p53-target gene expression in hepatocellular carcinoma samples separated according to p53 status.	101
Supplementary figure 2.4 GSEA analysis identifies genes sets associated with p53, angiogenesis and lipid oxidation as differentially regulated by SOCS1 knockdown.	102
Supplementary figure 2.5 DFO rescues TBH-induced ferroptosis in IMR90 cells.	103
 Chapitre 3. Article 2	
Figure 3.1 Identification of a novel interaction mechanism between SOCS1 and p53.....	136
Figure 3.2 SOCS1 phosphomimetic and unphosphorylatable mutants impact cellular senescence in normal human fibroblasts	137
Figure 3.3 SOCS1 is phosphorylated on Y80 by SRC family kinase members SRC and YES1	138
Figure 3.4 Inhibiting SRC-family activity enhances SOCS1 tumor suppressor activity	139
Figure 3.5 Phosphorylated SOCS1 at Y80 is deregulated in human Diffuse-Large-B-Cell lymphomas (DLBCLs).....	140
Figure 3.6 Phosphorylated SRC Family staining is increased in lymphomas vs normal lymph nodes and correlates with pSOCS1 staining	141
Figure 3.7 Model showing the role of mutations and phosphorylation on the tumor suppressor role of SOCS1 in the p53 pathway.....	142

Supplementary figure 3.1 The hydrophobic motif contained in p53 is conserved among many transcription factors.	145
Supplementary figure 3.2 List of SOCS1 mutations found in hematopoietic cancers.	146
Supplementary figure 3.3 SOCS1 and SOCS1 mutants' phenotypes are dependent on p53.	147
Supplementary figure 3.4 SOCS1, p53, and YES1 expression levels in DLBCL	148
Supplementary figure 3.5 Examples of pSOCS1 phenotypes of staining in lymphomas and normal lymph nodes.....	149

Annexe

Figure A1. Niveaux d'ARN messenger de SL7A11 et SAT1 en réponse à l'activation de p53 ou de SOCS1, respectivement.....	171
Figure A2. Tous les membres de la famille SOCS interagissent avec p53.....	172

Liste des abbreviations

N.B. Afin de clarifier l'écriture tout au long de la thèse, les protéines humaines sont écrites en majuscules alors que les gènes humains sont en majuscules et en italique. Les protéines murines sont écrites en minuscules.

9aaTAD	<i>9 amino acid Transactivation Domain</i>
ABC	<i>Activated B Cells</i>
ABL	<i>Abelson Murine Leukemia viral oncogene homolog 1</i>
ACSL4	<i>Acyl-CoA Synthetase Long Chain Family Member 4</i>
ADN	<i>Acide désoxyribonucléique</i>
AFAP110	<i>Actin Filament Associated Protein 110</i>
AKT	<i>AKT Serine Threonine Kinase 1</i>
ALL	<i>Acute Lymphoblastic Leukemia</i>
ALOX15	<i>Arachidonate 15-Lipoxygenase</i>
AML	<i>Acute Myeloid Leukemia</i>
ARN	<i>Acide Ribonucléique</i>
ATF3	<i>Activating Transcription Factor 3</i>
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
ATR	<i>Ataxia Telangiectasia And Rad3-Related Protein</i>
BAK	<i>BCL2 Antagonist/Killer1</i>
BAX	<i>BCL2 Associated X</i>
BCL2	<i>B Cell CLL/Lymphoma 2</i>
BCR	<i>Breakpoint Cluster Region</i>
BHA	<i>Butylated Hydroxyanisole</i>
BHT	<i>Butylated Hydroxytoluene</i>
BLK	<i>B Lymphoid tyrosine Kinase</i>
BRCA1	<i>Breast Cancer 1</i>
BRK	<i>Breast tumor Kinase</i>
CARS	<i>Cysteinyl-tRNA synthetase</i>
CBP	<i>CREB Binding Protein</i>
CCL	<i>C-C motif Chemokine Ligand</i>
CCL2	<i>C-C motif Chemokine Ligand 2</i>
CD44v	<i>CD44 antigen</i>
CDC2	<i>Cell Division Cycle 2</i>
CDK2	<i>Cyclin Dependent Kinase 2</i>
CDKN1a	<i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A</i>
CDKN2A	<i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CEBP	<i>CCAAT/Enhancer Binding Protein</i>

CHAC1	<i>ChaC, cation transport regulator homolog 1</i>
ChIP	<i>Chromatin ImmunoPrecipitation</i>
CHK1	<i>Checkpoint Kinase 1</i>
CHK2	<i>Checkpoint Kinase 2</i>
CIS	<i>Cytokine Inducible SH2-containing protein</i>
CML	<i>Chronic Myelogenous Leukemia</i>
COLMA2	<i>Collagen Type 4 Alpha 2 chain</i>
CoQ10	<i>Coenzyme Q10</i>
CSF1	<i>Colony Stimulating Factor 1</i>
CTD	<i>C-Terminal Domain</i>
CXCL	<i>C-X-C motif Chemokine Ligand</i>
DAMP	<i>Damage-Associated Molecular Patterns</i>
DAVID	<i>Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery</i>
DBD	<i>DNA Binding Domain</i>
DC	<i>Dendritic Cell</i>
DDB2	<i>Damage specific DNA Binding protein 2</i>
DDIT3	<i>DNA Damage Inducible Transcript 3</i>
DFO	<i>Deferoxamine</i>
DiRE	<i>Distant Regulatory Elements</i>
DKK1	<i>Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1</i>
DLBCL	<i>Diffuse Large B Cell Lymphoma</i>
DNA SCARS	<i>DNA Segments with Chromatin Alterations Reinforcing Senescence</i>
DREAM	<i>Dimerization partner, RB-like, E2F, And Multi-vulval class B</i>
DUSP1	<i>Dual Specificity Phosphatase 1</i>
E2F	<i>E2 Factor</i>
E2F7	<i>E2 Factor 7</i>
E7	<i>Human papillomavirus type 16 E7 protein</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGR1	<i>Early Growth Response 1</i>
EPO	<i>Erythropoietin</i>
ERK	<i>Extracellular signal Regulated Kinase</i>
ESM1	<i>Endothelial cell Specific Molecule 1</i>
ESS	<i>Extended SH2 Sequence</i>
FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FGFR3	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor 3</i>
FGR	<i>Feline Gardner-Rasheed sarcoma viral homolog protein</i>
FLT3L	<i>Fms Related tyrosine kinase 3 Ligand</i>
FRK	<i>Fyn Related src family tyrosine Kinase</i>
FYN	<i>Fyn proto oncogene</i>
GADD45 α	<i>Growth Arrest and DNA Damage inducible alpha</i>

GAP	<i>GTPase Activating Protein</i>
GAS	<i>Gamma-Activated Sequence</i>
GCB	<i>Germinal Center B cell</i>
GCL	<i>Glutamate Cysteine Lyase</i>
GDF15	<i>Growth Differentiation Factor 15</i>
GEF	<i>Guanine Exchange Factor</i>
GEO	<i>Gene Expression Omnibus</i>
GF1-1b	<i>Growth Factor Independence 1b</i>
GLI	<i>Glioma associated oncogene family zinc finger 1</i>
GLS1	<i>Glutaminase 1</i>
GLS2	<i>Glutaminase 2</i>
GLUT1	<i>Glucose Transporter 1</i>
GLUT4	<i>Glucose Transporter 4</i>
GM CSF	<i>Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor</i>
GPX4	<i>Glutathione Peroxidase 4</i>
GRO-seq	<i>Global Run On Sequencing</i>
GSEA	<i>Gene Set Enrichment Analysis</i>
GSH	<i>Glutathione</i>
GSS	<i>Glutathione Synthetase</i>
GST	<i>Glutathione-S-Transferase</i>
GTF	<i>General Transcription Factor</i>
GTP	<i>Guanosine Triphosphate</i>
HAT	<i>Histone Acetyl Transferase</i>
HAUSP	<i>Herpes virus Associated Ubiquitin-Specific Protease</i>
HCK	<i>Hematopoietic Cell Kinase</i>
HER-2	<i>Human Epidermal Growth factor Receptor 2</i>
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
Hh	<i>Hedgehog</i>
HSP90	<i>Heat Shock Protein 90</i>
HTLV1	<i>Human T cell Leukemia Virus type 1</i>
IDT	<i>Internal Deletion Loops</i>
IFN	<i>Interferon</i>
IGFBP2	<i>Insulin-like Growth Factor Binding Protein 2</i>
IGFBP3	<i>Insulin-like Growth Factor Binding Protein 3</i>
IGFBP4	<i>Insulin-like Growth Factor Binding Protein 4</i>
IGFBP5	<i>Insulin-like Growth Factor Binding Protein 5</i>
IGFBP6	<i>Insulin-like Growth Factor Binding Protein 6</i>
IGFBP7	<i>Insulin-like Growth Factor Binding Protein 7</i>
IGFR-1	<i>Insulin Growth Factor Receptor 1</i>
IL1	<i>Interleukin 1</i>
IL10	<i>Interleukin 10</i>

IL12	<i>Interleukin 12</i>
IL17	<i>Interleukin 17</i>
IL6	<i>Interleukin 6</i>
IL8	<i>Interleukin 8</i>
IPSC	<i>Induced Pluripotent Stem Cell</i>
IPTG	<i>Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i>
IREB2	<i>Iron Responsive Element Binding protein 2</i>
IRF1	<i>Interferon Regulatory Factor 1</i>
IRF9	<i>Interferon Regulatory Factor 9</i>
IRS1	<i>Insulin Receptor Substrate 1</i>
IRS2	<i>Insulin Receptor Substrate 2</i>
IUP	<i>Intrinsically Unfolded Protein</i>
JAK1	<i>Janus Kinase 1</i>
JAK2	<i>Janus Kinase 2</i>
JAK3	<i>Janus Kinase 3</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal Kinase</i>
KAP1	<i>KRAB Associated Protein 1</i>
KIR	<i>Kinase Inhibitory Region</i>
KIT	<i>v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog</i>
KLF4	<i>Kruppel Like Factor 4</i>
LCK	<i>Lymphocyte specific protein tyrosine Kinase</i>
LIF	<i>Leukemia Inhibitory Factor</i>
LINE	<i>Long Interspersed Nuclear Element</i>
LOX	<i>Lysyl Oxidase</i>
LPCAT3	<i>Lysophosphatidylcholine Acyltransferase 3</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i>
LYN	<i>v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog</i>
MAPK	<i>Mitogen Associated Protein Kinase</i>
MCM6	<i>Minichromosome maintenance Complex Component 6</i>
MCP	<i>Monocyte Chemoattractant Proteins</i>
MDM2	<i>Murine Double Minute 2</i>
MDM4	<i>Murine Double Minute 4</i>
MET	<i>Mesenchymal Epithelial Transition</i>
MIP	<i>Macrophage Inhibitory Proteins</i>
miRNA	<i>micro RNA</i>
MSH2	<i>MutS Homolog 2</i>
MYST	<i>MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2 and Tip60</i>
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NEDD8	<i>Neural precursor cell Expressed Developmentally Deregulated protein 8</i>
NF κ B	<i>Nuclear Factor kappa B</i>

NKT	<i>Natural Killer T cell</i>
NOLC1	<i>Nuclear and Coiled body phosphoprotein 1</i>
NOV	<i>Nephroblastoma Overexpressed</i>
NTN4	<i>Netrin 4</i>
OIS	<i>Oncogene Induced Senescence</i>
OMS	<i>Organisation Mondiale de la Santé</i>
p300	<i>E1A binding protein p300</i>
P53AIP1	<i>Tumor Protein p53 regulated Apoptosis Inducing Protein 1</i>
PCAF	<i>p300/CBP Associated Factor</i>
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PE	<i>Phosphatidylethanolamine</i>
PHD	<i>Plant Homeodomain</i>
PI3K	<i>PhosphoInositide 3-Kinase</i>
PIAS	<i>Protein Inhibitor of Activated STATs</i>
PIC	<i>Preinitiation Complex</i>
PLCgamma	<i>Phospholipase gamma</i>
PML	<i>Promyelocytic leukemia</i>
POLII	<i>Polymerase II</i>
PPP1R3C	<i>Protein Phosphatase 1 Regulatory Subunit 3</i>
PRD	<i>Proline Rich Domain</i>
PRMT5	<i>Protein Arginine Methyltransferase 5</i>
PROCR	<i>Protein C Receptor</i>
PTGS2	<i>Prostaglandin endoperoxide Synthase 2</i>
PUFA	<i>Polyunsaturated Fatty Acids</i>
PUMA	<i>p53 Upregulated modulator of Apoptosis</i>
RAS	<i>Rat Sarcoma</i>
RB1	<i>Retinoblastoma 1</i>
RBX2	<i>Ring Finger domain only protein</i>
R-CHOP	<i>Rituximab, Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, Prednisolone</i>
REG	<i>Regulatory</i>
RGCC	<i>Regulator of Cell Cycle</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RSL3	<i>Ras Synthetic Lethal 3</i>
RSL5	<i>Ras Synthetic Lethal 5</i>
RSV	<i>Rous Sarcoma Virus</i>
SAHF	<i>Senescence Associated Heterochromatin Foci</i>
SASP	<i>Senescence Associated Secretory Phenotype</i>
SAT1	<i>Spermidine/Spermine N1-acetyltransferase 1</i>
SCF	<i>Stem Cell Factor</i>
SCO2	<i>Cytochrome c Oxydase assembly protein 2</i>

SFK	<i>Src Family Kinase</i>
SH1	<i>Src Homology 1</i>
SH2	<i>Src Homology 2</i>
SH3	<i>Src Homology 3</i>
SH4	<i>Src Homology 4</i>
shARN	<i>small hairpin RNA</i>
SLC7A11	<i>Solute Carrier family 7 member 11</i>
SOCS1	<i>Suppressor of Cytokine Signaling 1</i>
SOCS2	<i>Suppressor of Cytokine Signaling 2</i>
SOCS3	<i>Suppressor of Cytokine Signaling 3</i>
SOCS4	<i>Suppressor of Cytokine Signaling 4</i>
SOCS5	<i>Suppressor of Cytokine Signaling 5</i>
SOCS6	<i>Suppressor of Cytokine Signaling 6</i>
SOCS7	<i>Suppressor of Cytokine Signaling 7</i>
SRC	<i>v-src avian sarcoma viral oncogene homolog</i>
SRM	<i>Spermidine Synthase</i>
SRPX2	<i>Sushi Repeat containing Protein X-linked 2</i>
STAGA	<i>SPT3-TAF-GCN5 acetylase</i>
STAT1	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 1</i>
STAT2	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 2</i>
STAT3	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>
STAT4	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 4</i>
STAT5a	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 5a</i>
STAT5b	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 5b</i>
STAT6	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 6</i>
SUMO	<i>Small Ubiquitine Modifier protein</i>
SV40	<i>Simian Vvacuolating virus 40</i>
	<i>sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain containing 1</i>
SVEP1	
TAD	<i>Transactivation Domain</i>
TAF6	<i>TATA-box binding protein Associated Factor 6</i>
TAF9	<i>TATA-box binding protein Associated Factor 9</i>
TBH	<i>tert-butyl-hydroperoxide</i>
TBP	<i>TATA-box Binding Protein</i>
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TEL	<i>TEL oncogene</i>
TFIID	<i>Transcription Factor II D</i>
TFIIH	<i>Transcription Factor II H</i>
TIP60	<i>HIV-1 Tat interactive protein, 60kDa</i>
TLR	<i>Toll-Like Receptor</i>
TMA	<i>Tissue Microarray</i>

TNF α	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>
TP53	<i>Tumor Protein 53</i>
TP63	<i>Tumor Protein 63</i>
TP73	<i>Tumor Protein 73</i>
TRIM28	<i>Tripartite containing Motif 28</i>
TYK2	<i>Tyrosine Kinase 2</i>
USP10	<i>Ubiquitin Specific Peptidase 10</i>
UTR	<i>Untranslated Region</i>
VAV	<i>vav guanine nucleotide exchange factor 1</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VHL	<i>Von Hippel-Lindau tumor suppressor</i>
WT	<i>Wild Type</i>
XPC	<i>Xeroderma Pigmentosum, Complementation group C</i>
YES	<i>Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog 1</i>

Remerciements

Un doctorat est un très long processus au cours duquel l'on se forge autant un caractère que l'acquisition de connaissances et l'habitude de travailler de longues heures. Malgré cela, le labo devient comme une deuxième famille et j'aimerais prendre le temps de remercier tous ceux qui ont contribué à rendre ces huit années merveilleuses! Vous allez me manquer.

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, Gerardo Ferbeyre. Merci de m'avoir accueillie et d'avoir partagé votre passion pour la science. J'admire beaucoup votre travail et votre capacité à réunir des personnes qui forment une véritable équipe dans le laboratoire. Cette bonne ambiance et entente entre les gens contribue à rendre le PhD une étape exigeante mais agréable. Je ne viens jamais au labo à reculons et c'est dû à cela en grande partie. Enfin, merci d'avoir cru en mon projet (même si vous y croirez réellement lorsque quelqu'un d'autre le publiera aussi 😊) et de nous laisser la liberté d'explorer nos idées. Aussi, je dois vous dire que je vous considère comme une librairie ambulante et que votre capacité à vous rappeler les noms des auteurs, des années et des journaux ainsi que le contenu des articles m'a toujours impressionnée!

Véro, merci pour tes conseils, pour ton amitié! Merci aussi pour ton aide sur le projet et tes corrections de cette thèse! J'ai apprécié qu'on ait eu la chance d'aller en meeting et d'explorer Londres ensemble. Tu es une personne que j'admire beaucoup, pour tes capacités critiques au niveau de la science, mais aussi pour ta volonté d'aider tout le monde dans le labo. Merci aussi pour les belles soirées passées avec Gerardo à jouer à la belote et dans lesquelles je finissais par jouer comme un zombie, vers minuit-1h du matin, à fermer les yeux entre deux mains, alors que vous aviez encore toute votre énergie!! Ces soirées ont été moins fréquentes dernièrement, mais j'espère qu'on continuera à en organiser après mon départ!

Lian, que dire! Tu es devenue bien plus qu'une collègue, tu es devenue une amie très chère en plus de littéralement faire partie de la famille! J'en suis très heureuse et ça me manquera énormément de travailler à tes côtés. Je veux aussi te remercier pour toute l'aide que tu as apportée sur mes projets, entre autres les heures interminables à compter des cellules pour les analyses d'IHC! En gros, juste merci d'avoir été là, dans les moments plus difficiles comme les moments joyeux et j'espère qu'on continuera de se voir souvent souvent!!

Fred, merci pour tes conseils, pour ton enthousiasme pour tout ce qui concerne la science entre autres. Tu es toujours intéressé à voir les résultats de tous et à trouver LA chose positive du résultat, même lorsque ça ne marche pas vraiment. Merci aussi pour toutes les niaiseries et les discussions d'ordre philosophique qui rendent les journées agréables! Merci pour ton aide sur le projet. Je te souhaite honnêtement le meilleur pour la suite, j'espère que tu obtiendras ce que tu veux, tu le mérites et tu ferais un excellent PI (si c'est ce qui te tente bien sûr ☺).

Marie et Stéphane, ça m'a fait vraiment plaisir de vous rencontrer, et bien que ça ait été de moins longue date qu'avec les autres, vous êtes deux personnes que j'apprécie beaucoup! Vous êtes toujours de bonne humeur et vous avez été mes partenaires de fin de soirée au labo dans les derniers temps! Nos discussions de métro qui devenaient toujours intenses au moment de votre station vont me manquer aha. Vous êtes deux excellents scientifiques et vous travaillez dur, je vous souhaite le meilleur et je suis sûre que vous allez rocker votre doc! J'espère qu'on restera en contact!! Merci pour votre aide avec les IFs et les fractionnements.

Ana, je suis vraiment contente que tu sois venue faire un doc dans notre labo! Tu es toujours souriante et tes remarques « cinglantes » me font toujours beaucoup rire!! Tu as entre les mains un projet difficile mais avec plein de potentiel. Tu es une super scientifique aussi et je suis sûre que tu vas très bien t'en sortir. Les bières du vendredi soir vont me manquer et j'espère qu'on restera en contact !

Maxime, on s'est côtoyés moins longtemps mais j'apprécie beaucoup ta touche d'humour toujours présente et les belles discussions, entre autres sur le Kung Fu! Je pense que je te souhaite tout simplement de trouver ton équilibre et d'être heureux! Il n'y a aucun doute que tu es excellent dans ce que tu fais, et merci pour tes conseils et ton aide. Je suis sûre qu'on va, au minimum, continuer de se croiser au kung fu (si ta saga de blessures se termine!).

Neylen, je suis contente de t'avoir rencontrée! Je t'admire comme étant une personne forte, persévérante et souriante. Tu as su te débrouiller avec un projet très différent de ce que nous faisons tous et tu t'en sors très bien. Merci pour ta générosité et tes bonnes capacités au Karaoké (pas comme certains qu'on ne nommera pas aha!).

Je voudrais aussi remercier Dr. Léa Brakier-Gingras, pour vos connaissances, votre sagesse et vos idées lors des labmeeting entre autres. Vous êtes une personne que j'admire, pour

votre carrière et votre volonté, pour vous être rendue où vous êtes aujourd'hui. Et merci de continuer à partager votre passion pour la science avec les nouvelles générations.

Séb, merci pour ton esprit critique. Je te souhaite du bonheur dans ta vie et avec ta belle petite puce. Merci pour tes idées lors des lab-meetings et pour ta contribution de desserts. Et bon courage avec ta thèse puisque tu es le prochain en liste après moi!

Merci aussi aux anciens du laboratoire. Xavier, pour de nombreuses conversations de bench opposées, Viviane, pour m'avoir formée et supervisée, et initiée au merveilleux (pointe d'ironie) monde de SOCS1. Geneviève, merci pour ton aide sur le projet mais aussi pour les nombreuses conversations et ta franchise. Mathieu, on a vécu beaucoup de choses ensemble, qui se sont soldées par une situation compliquée, mais je tiens tout de même à te remercier. Merci à Marie-France, Olga, Benjamin, Vincent. Merci à mon premier superviseur de stage, Martin, qui m'a donné envie de faire de la recherche en me communiquant sa belle passion.

Merci aussi à toutes les autres personnes du département que j'ai côtoyées et qui ont rendu ces années agréables. Je pense entre autres à Eric, Aurélien, Charline, Maxime, Fadi, Bastien et Julie, Camille et Hadrien, Mathieu Coincon, Thomas et Virginie, Paul et Marissa, Sam, Rémy, Sami, Pierre et Flore, Etienne, Benjamin, Simon, Antoine, Nicolas. Mathieu Price, je tiens à te remercier pour m'avoir initiée à la purification de protéines et à la structure! J'ai appris pas mal de choses et je suis reconnaissante pour le temps que tu as pris à m'enseigner tout ça.

Mariana, merci pour ton aide mais surtout pour ton amitié. Tu es une personne que j'admire beaucoup pour la force de caractère dont tu as dû faire preuve dans les dernières années. Malgré cela, tu restes une personne positive et toujours souriante et enthousiaste. Je te souhaite honnêtement que tout ça soit derrière toi et qu'il ne t'arrive que des bonnes choses prochainement. Ton petit Lucca est merveilleux et je vous aime tous les deux!!

Finalement, je voudrais remercier ma famille, qui m'a toujours supportée. Maman, papa, David, vous êtes très importants pour moi et je suis contente de vous avoir à mes côtés et qu'on forme une famille soudée. Sébastien, merci d'être arrivé dans ma vie. Merci de me « challenger ». Merci d'avoir été là dans les moments difficiles et d'avoir cru en moi. Merci

aussi pour tous les beaux moments qu'on a partagés jusqu'à maintenant. J'espère que ce n'est que le début d'une longue aventure ☺.

1. Introduction

1.1 Avant-propos

La recherche scientifique est l'une des bases de notre société moderne. La recherche fondamentale, souvent encore incomprise et mise à l'écart par les politiques de vision à court terme, en est le pilier fondateur. Sans les nouvelles connaissances générées par celle-ci, la recherche appliquée ne serait éventuellement plus possible. Tous les domaines peuvent bénéficier de la recherche fondamentale et le domaine de la santé n'en est pas exempt. Le cancer, par exemple, est la seconde principale cause de décès mondialement, selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), ce qui en fait un sujet de recherche primordial.

De nombreuses avancées ont été faites dans le domaine de la recherche sur le cancer et les taux de survie de nombreux cancers ont augmenté. Il reste cependant beaucoup de travail à accomplir, le nombre de nouveaux cas étant toujours en hausse et les taux de survie de plusieurs cancers étant encore très faibles. Comprendre les mécanismes sous-jacents à la transformation tumorale et à la suppression tumorale est l'une des clés pour mieux comprendre le fonctionnement du cancer et développer de nouvelles stratégies afin de le prévenir et l'éradiquer. La sénescence cellulaire est l'une des plus importantes défenses, avec la mort cellulaire programmée, que possède une cellule face à un signal oncogénique pouvant causer une transformation maligne. Ce mécanisme de suppression tumorale repose sur deux voies de signalisation centrales, la voie de la protéine p53 (TP53) et la voie de Rb (RB1). L'objectif de cette thèse est de mieux comprendre les mécanismes moléculaires d'activation de p53 par la protéine SOCS1 dans le contexte de la sénescence cellulaire.

Ce chapitre d'introduction vise à faciliter la compréhension des résultats présentés dans cette thèse. Il y sera question du concept de suppression tumorale, de la protéine p53, de la ferroptose, de la protéine SOCS1 et de la famille de kinases SRC.

1.2 La transformation tumorale

Le cancer est un sujet mondial de préoccupation. Toutefois, concrètement, qu'est-ce qu'un cancer? L'origine du cancer remonte à une seule cellule qui a accumulé une série de mutations lui conférant des avantages prolifératifs et de survie, tout en abolissant les mécanismes normaux de contrôle cellulaire. La prolifération incontrôlée de cette cellule va éventuellement former un amas de cellules nommé tumeur. Il existe des tumeurs bénignes et des tumeurs malignes. Les tumeurs bénignes restent confinées à leur emplacement original, alors que les tumeurs malignes acquièrent la capacité d'envahir d'autres tissus et de se propager. Ce sont ces dernières que l'on nomme cancer.

Le taux de mutations normal d'une cellule dans le corps est très faible, surtout comparé au nombre de mutations présentes dans le génome d'une cellule cancéreuse. Celle-ci contient plus de mutations que l'ensemble des cellules du corps d'une personne tout au long de sa vie. Cela implique que les cellules précancéreuses doivent posséder un génome instable favorisant l'apparition de nombreuses mutations.¹

Les premières études qui ont révolutionné le monde du cancer furent celles sur le virus du sarcome de Rous. Il fut alors découvert qu'un virus, en infectant une cellule saine, peut provoquer sa transformation maligne. Cela impliquait donc qu'un nombre limité de changements génétiques pouvait transformer les cellules. Cela a mené à la découverte de protéines qui stimulent la prolifération cellulaire : les oncogènes. Ces derniers étaient alors suffisants, lorsque surexprimés dans des cellules en culture, pour les transformer. Toutefois, ces cellules étaient immortalisées, c'est-à-dire qu'elles avaient déjà acquis des anomalies leur permettant de se diviser indéfiniment. En fait, la surexpression des mêmes oncogènes dans des cellules primaires ne parvenait pas à les transformer : il faut la combinaison de plus d'un élément pour transformer une cellule.¹

L'étude de plusieurs lignées cancéreuses et de tumeurs a révélé qu'il existe une énorme complexité génétique dans les divers cancers, au lieu d'un dénominateur commun tant recherché. Il faut aussi souligner qu'outre les mutations et l'activation d'oncogènes, d'autres altérations résultant en la perte d'expression des gènes suppresseurs de tumeurs sont critiques pour initier une transformation maligne. Bien que certaines études aient conclu qu'il faut au

minimum 4 à 6 évènements d'importance pour qu'une tumeur se développe, il n'y a pas de chiffre magique et beaucoup dépend du contexte cellulaire.¹

Par contre, les cellules cancéreuses ont toutes quelque chose en commun : elles possèdent de nouvelles capacités acquises, des changements physiologiques importants, qu'on retrouve dans toutes les tumeurs. Celles-ci sont la capacité à : produire des signaux mitogènes intracellulaires, résister aux signaux extérieurs intimant l'arrêt de prolifération, proliférer sans limites (perte d'inhibition de contact et réactivation de la télomérase), échapper aux mécanismes de suppression tumorale (sénescence, apoptose), se vasculariser et éventuellement avoir le potentiel de migrer et d'envahir d'autres tissus ou organes.¹ Plus récemment, les capacités à reprogrammer le métabolisme énergétique et à éviter la destruction par le système immunitaire se sont ajoutées aux caractéristiques des cellules cancéreuses². Ainsi, c'est lorsqu'a lieu une combinaison de mutations activatrices d'oncogènes et inhibitrices des mécanismes de suppression tumorale que les cellules sont véritablement en danger de transformation maligne et qu'apparaît un risque de développer un cancer³.

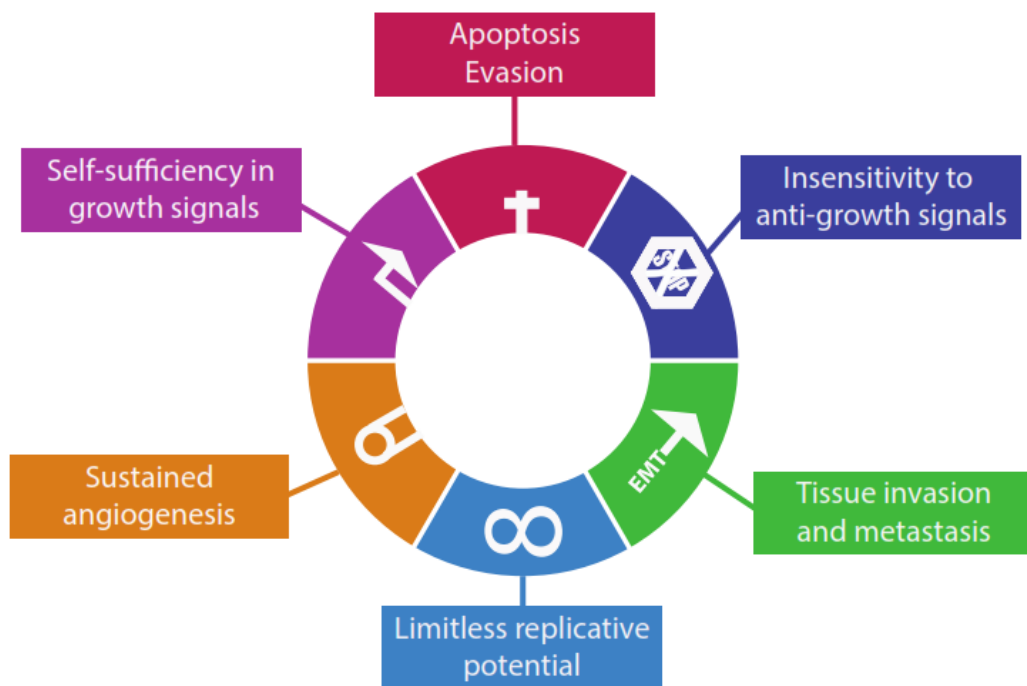


Figure 1.1 Caractéristiques des cellules tumorales

Figure adaptée de Weinberg et al, 2011 ²

1.3 La sénescence

La sénescence cellulaire fut découverte dans les années 1960 par le Dr. Hayflick, lors de l'observation que des cellules humaines normales en culture n'ont pas un potentiel de réplication infini^{4,5}. En effet, les extrémités des chromosomes, appelées télomères, raccourcissent à chaque division cellulaire. Lorsqu'elles atteignent une taille critique trop courte, un mécanisme d'arrêt de division est enclenché par la cellule afin d'empêcher la perte d'information génétique. Bien que ces cellules ne puissent plus proliférer, elles demeurent métaboliquement actives. Cet arrêt de prolifération fut nommé sénescence cellulaire et fut longtemps critiqué et accusé d'être un artéfact causé par la culture des cellules *in vitro*. Toutefois, on sait aujourd'hui que la sénescence cellulaire se produit réellement *in vivo* et constitue un mécanisme de suppression tumorale très important⁶.

La sénescence est un mécanisme distinct des autres types d'arrêt du cycle cellulaire : la quiescence et la différenciation terminale. Il diffère de la quiescence, qui est une sortie transitoire du cycle cellulaire par une cellule. Cette dernière y referra son entrée lorsque les conditions redeviendront favorables⁶. Au contraire, la différenciation terminale représente un arrêt permanent du cycle cellulaire, comme la sénescence, mais les cellules différenciées ne conservent pas l'identité des cellules initiales, elles subissent des changements spécialisés au niveau fonctionnel et physiologique⁶. Les cellules sénescents, elles, sont bloquées de façon permanente en phase G1 du cycle cellulaire, tout en conservant la même identité cellulaire que les cellules originales⁶.

La sénescence peut être induite par différents stress incluant l'activation d'oncogènes, le stress oxydatif, un raccourcissement des télomères, une dysfonction mitochondriale, un stress mitotique, une protéotoxicité, ou encore des réorganisations répressives de la chromatine⁶. La sénescence causée par le raccourcissement des télomères se nomme sénescence répllicative. Les autres types de sénescence ne dépendent pas forcément de la longueur des télomères et peuvent être regroupés sous le terme de sénescence prématurée. Aucun marqueur unique spécifique à la sénescence n'a encore été identifié, mais une combinaison de plusieurs marqueurs peut être mesurée pour déterminer si une cellule est sénescence.

Parmi les caractéristiques des cellules sénescents, on retrouve tout d’abord des changements morphologiques⁷. Les cellules deviennent aplaties, élargies⁷ et possèdent une activité lysosomale accrue, ce qui permet de les colorer en bleu à pH légèrement acide lorsqu’on leur ajoute un sucre synthétique, le X-Gal. Ce dernier est métabolisé par la β -galactosidase lysosomale en un composé bleu^{8,9}. Plusieurs autres caractéristiques de la sénescence découlent de l’activation des voies de signalisation de p53 et/ou de RB, les deux principaux suppresseurs de tumeurs de la cellule¹⁰. Ainsi, le niveau d’expression de P16^{INK4a}, aussi appelé CDKN2A (*Cyclin Dependent Kinase inhibitor 2a*), est un marqueur de sénescence. Il s’exprime faiblement dans la plupart des cellules et tissus mais son expression est fortement induite dans les cellules sénescents^{11,12} et il s’accumule avec l’âge dans les tissus de plusieurs vertébrés^{13,14}. Son rôle est d’empêcher la phosphorylation de RB et son inactivation, ce qui permet à RB d’inhiber les facteurs de transcription E2F. Les E2F contrôlent l’expression de gènes requis pour la progression du cycle cellulaire et ceux-ci servent également de marqueurs de progression du cycle cellulaire et de la sénescence^{15,16}. D’autre part, l’activation de la voie de p53 et ses gènes cibles sont également utilisés comme marqueurs de sénescence. Notamment, p53 active l’expression de gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, comme p21^{CDKN1a} (qui contrôle le complexe CDK2/CyclineE)¹⁷, GADD45A^{18,19} et 14-3-3^{20,21} (qui inhibent le complexe CDC2/CyclineB) ainsi que de PML²² et SerpineE1²³. Il est à noter que la plupart des cellules sénescents sont également résistantes à l’apoptose et qu’à l’occasion, ceci constitue un marqueur de sénescence.

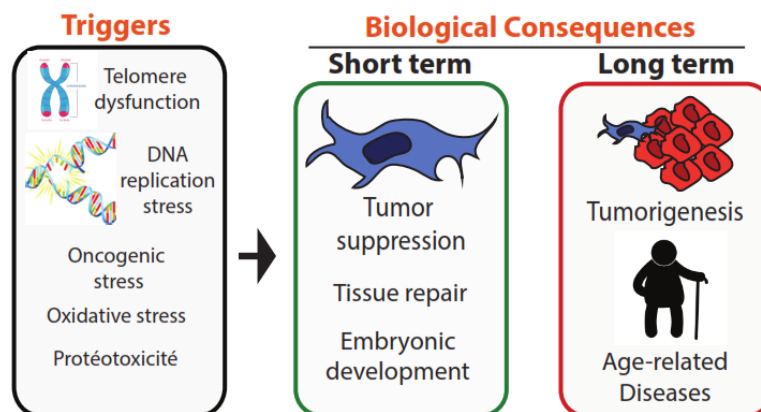


Figure 1.2 Causes et conséquences de la sénescence cellulaire

Adapté de Krizhanovsky et al, 2014²⁴

D'autre part, la voie de réponse aux dommages à l'ADN est aussi un marqueur de sénescence puisque des foci de dommages à l'ADN se forment dans les cellules sénescents. Ces foci persistants sont nommés DNA-SCARS (*DNA-Segments with Chromatin Alterations Reinforcing Senescence*)²⁵. Certaines cellules sénescents contiennent également des foci d'hétérochromatine associés à la sénescence (SAHF, *Senescence-Associated-Heterochromatin-Foci*), qui sont des régions où l'ADN est condensé en hétérochromatine, réprimant les gènes qui y sont situés^{26,27}. La théorie stipule que des gènes pro-prolifératifs seront inhibés de cette manière, notamment les gènes cibles des facteurs de transcription E2F²⁶. La diminution importante de la lamineB1 (qui est aussi une cible des E2F) constitue un autre marqueur de sénescence^{28,29}, ainsi qu'un programme de dégradation de protéines médié par l'activation de la voie ERK/MAPK³⁰.

Finalement, un marqueur notoire est l'augmentation très importante de la sécrétion, par les cellules sénescents, de diverses cytokines, chimiokines, facteurs de croissance et protéases, globalement appelée SASP (*Senescence Associated Secretory Phenotype*)^{31,32}. La composition du SASP varie d'une cellule à l'autre et d'un type de sénescence à l'autre, mais plusieurs de ses composantes sont communes à de nombreux types de sénescence. Il peut induire des effets très variés, parmi lesquels on retrouve la stimulation de la prolifération³³⁻³⁵, l'angiogenèse³⁶ et l'inflammation⁷ de manière autocrine ou paracrine. Il est important de mentionner que l'inflammation est directement liée aux pathologies du vieillissement, reliant une fois de plus sénescence et vieillissement. Les principaux facteurs pro-inflammatoires du SASP sont IL-6, IL-8, GM-CSF, les MCP (*Monocyte Chemoattractant Proteins*) et les MIP (*Macrophage Inhibitory Proteins*)⁷. Certaines fonctions biologiques des cellules sénescents sont dépendantes du SASP, comme le recrutement du système immunitaire au sein d'une tumeur³⁷⁻³⁹ ou la réparation de tissus endommagés⁴⁰⁻⁴². Le SASP semble donc servir de signal d'alarme aux cellules avoisinantes, afin de soit préparer le tissu à une réparation ou afin de recruter le système immunitaire pour favoriser l'élimination de ces cellules compromises. Globalement, le SASP est responsable de plusieurs des effets négatifs causés par la sénescence, mais aussi de certains de ses facteurs bénéfiques. D'autre part, il a été montré que quelques fonctions des cellules sénescents sont indépendantes du SASP, comme la contribution au bon déroulement de certains processus développementaux^{43,44}. En fait, la surexpression de p21 (CDKN1A) ou de p16 induit

une sénescence dépourvue de dommages à l'ADN et de SASP⁴⁵. Le SASP est une caractéristique des cellules rendues sénescents par des dommages génomiques, des perturbations épigénomiques, ou d'autres stress qui induiront ce genre de dommages⁴⁶. Plus récemment, il fut proposé que ces dommages à l'ADN provoquent la présence d'ADN dans le cytoplasme, ce qui active les voies de reconnaissance d'ADN cytoplasmique et la sécrétion de nombreux facteurs pro-inflammatoires^{47,48}. Il est donc possible que la voie cGAS-STING, impliquée dans la reconnaissance de l'ADN cytoplasmique, soit un important régulateur de l'induction du SASP^{47,48}.

Par contre, le SASP est un phénotype qui se développe lentement, il n'est pas induit immédiatement par des dommages à l'ADN transitoires⁴⁶. Il se développe seulement lorsqu'une signalisation permanente de dommages à l'ADN est établie^{25,31,46}. Deux facteurs de transcription importants permettent l'activation du SASP : NFκB⁴⁹⁻⁵¹ et C/EBP⁵². Au contraire, p53 semble contrôler négativement ce phénotype : son inhibition dans des cellules sénescents cause une augmentation importante de la sécrétion de nombreux facteurs du SASP³¹.

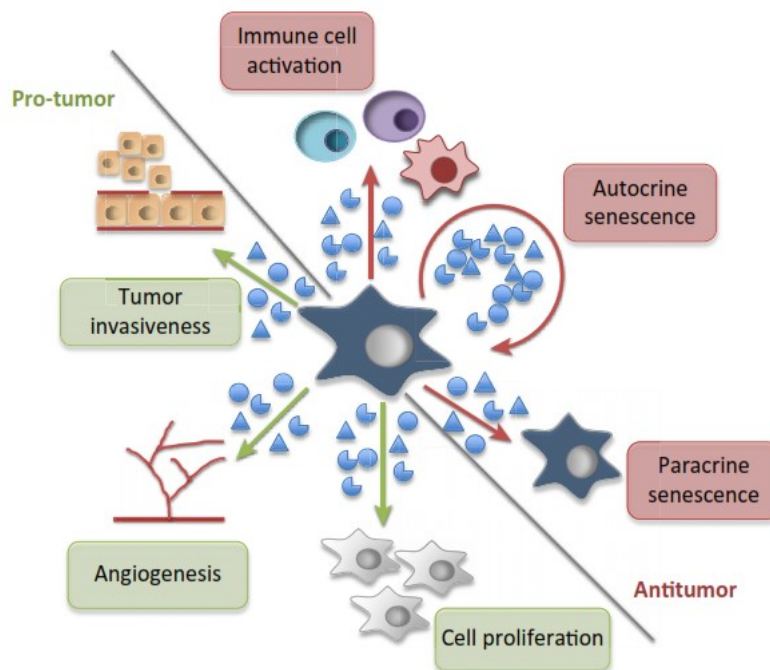


Figure 1.3 Effets pro-tumoraux et anti-tumoraux du SASP

Figure tirée de : Alimonti et al. 2016⁵³

Les cellules sénescences s'accumulent durant le vieillissement d'un organisme, ce qui signifie soit que le corps génère davantage de ces cellules ou qu'elles ne sont pas correctement éliminées par le système immunitaire. L'accumulation de ces cellules et leur sécrétion de nombreux facteurs pro-inflammatoires et pro-croissance semble constituer le prix à payer pour bénéficier des nombreux effets bénéfiques qu'elles apportent à un jeune organisme⁶.

Récemment, des modèles génétiques de souris ont été développés dans lesquels il est possible d'éliminer, à un moment choisi, l'ensemble des cellules sénescences (les cellules positives pour p16^{INK4a})^{42,54,55}. L'élimination des cellules sénescences dans ces souris provoque une augmentation de la longévité s'accompagnant d'une très grande amélioration de plusieurs phénotypes se détériorant lors du vieillissement, tels la glomérulosclérose et les fonctions rénales, la tolérance au stress cardiaque ainsi que les fonctions des cellules souches hématopoïétiques et musculaires, ou encore l'hypertrophie du cardiomyocyte liée à l'âge et l'athérosclérose⁶. Ces observations ont donc causé une véritable course à l'identification de molécules capables de tuer les cellules sénescences, nommées « sénolytiques »⁵⁶. Ce domaine en est à ses débuts et il sera très intéressant d'en suivre les avancées futures afin de voir si ces principes s'appliqueront chez l'humain.

1.4 La protéine p53

1.4.1 Historique de la découverte de p53

La protéine p53 est l'une des protéines les plus étudiées en science, avec plus de 89 000 entrées dans les moteurs de recherche à ce jour. Sa grande popularité provient de son importante fonction de « Gardien du Génome ». Considéré comme le plus important suppresseur de tumeur de la cellule, p53 a pourtant été identifié à priori comme un oncogène. En effet, plusieurs groupes ont découvert p53 quasi-simultanément en 1979 en travaillant sur les virus tumoraux à ADN (*DNA tumour viruses*), des virus causant la transformation tumorale des cellules qu'ils infectent. Les protéines tumorales du virus SV40 (*Simian Virus 40*), lorsqu'elles étaient immunoprécipitées, étaient liées à une protéine inconnue d'une taille d'environ 53 kDa^{57,58}. S'est ensuivie une course au clonage de la séquence de *p53*, ce qui fut encore une fois accompli par plusieurs groupes en même temps. La surexpression de ces séquences de *p53* apportait une

confirmation de l'hypothèse de l'oncogène : p53 coopérait avec plusieurs oncogènes, tels RAS, afin de transformer des cellules normales. Surexprimée seule, la protéine facilitait l'immortalisation de ces cellules⁵⁹⁻⁶¹. Cependant, la majorité des groupes ayant cloné *p53* avaient procédé à partir d'ARN de cellules transformées, qui exprimaient de plus hauts niveaux du gène, facilitant ainsi le processus. Les résultats furent donc obtenus, comme on le sait aujourd'hui, avec des séquences mutées de *p53*. L'erreur fut réalisée en comparant les séquences des ADN complémentaires (cDNA) clonés par différents laboratoires⁶²⁻⁶⁴. L'utilisation d'un cDNA obtenu à partir de cellules normales démontra des effets opposés aux précédents suggérant que *p53* est un suppresseur tumoral et non un oncogène^{65,66}. Il fut ensuite montré que les allèles du gène de *p53* étaient fréquemment perdus par mutation, délétion, ou une combinaison de ces deux événements dans les cancers colorectaux⁶⁷, ce qui va de pair avec un suppresseur de tumeur. Les humains porteurs de mutations de *p53* au sein de leurs cellules germinales sont atteints du Syndrome de Li-Fraumeni et sont beaucoup plus susceptibles de développer une variété de cancers^{68,69}. Finalement, les souris nulles pour *Trp53* développent des cancers, surtout des lymphomes, avec une très haute pénétrance⁷⁰.

1.4.2 Les domaines protéiques de p53

De nos jours, il est connu que *p53* est le gène le plus muté dans le cancer : des mutations de *p53* sont présentes dans près de la moitié des tumeurs, tel que démontré par des milliers d'études. Ce gardien du génome fonctionne principalement comme un facteur de transcription^{71,72}. Il contient 5 domaines principaux : un domaine de transactivation (TAD, *Transactivation Domain*), un domaine riche en prolines (PRD, *Proline Rich Domain*), un domaine de liaison à l'ADN (DBD, *DNA Binding Domain*), un domaine de tétramérisation et un domaine c-terminal fortement basique avec une fonction régulatrice (REG, *Regulatory domain*).



Figure 1.4 Schématisation des domaines fonctionnels de p53

Le domaine de transactivation de p53 est subdivisé en deux sous-domaines avec cette activité : le TAD1⁷³, originellement décrit comme allant des résidus 1 à 43 et le TAD2⁷⁴⁻⁷⁶, allant des acides aminés 43 à 63. L'analyse de la séquence protéique de p53 a mis en évidence un N-terminal composé de résidus acides, ce qui est typique des domaines de transactivation⁷⁷. Les acides aminés faisant partie de chaque domaine varient d'une étude à l'autre, ainsi une simplification fut faite pour la Figure 1.4. En fait, il a été montré qu'une séquence consensus très courte composée de 9 acides aminés de p53 ainsi que celle de 40 autres protéines, appelée le 9aaTAD (*9 amino acid Transactivation Domain*), était suffisante pour activer la transcription⁷⁸. Le TAD est un domaine majoritairement non structuré, dont le rôle est la liaison de partenaires protéiques variés dans le but d'activer la transcription⁷⁸. Ainsi, les protéines intrinsèquement non-structurées (IUP, *Intrinsically Unstructured Proteins*) ont la capacité de s'adapter à de nombreux partenaires protéiques grâce à leur flexibilité structurale⁷⁹.

Étant donné que les premiers 42 acides aminés de p53 furent montrés suffisants pour activer la transcription, c'est dans le TAD1 que furent faites les premières études de mutagenèse pour montrer l'importance de certains résidus hydrophobes, résidus également présents dans d'autres facteurs de transcription. La mutation individuelle de ces résidus : leucine (L) 22 et tryptophane (W) 23 résultait en une diminution de la transactivation, mais une mutation de ces deux résidus simultanément abolissait presque totalement cette fonction⁷⁷. Le double mutant démontrait de plus des pertes importantes des fonctions cellulaires de p53 telles la réponse aux dommages à l'ADN, l'apoptose induite par les oncogènes et l'inhibition de la croissance. Le TAD1 est donc essentiel aux réponses cellulaires médiées par p53⁸⁰⁻⁸².

Après la découverte du TAD2, il fut montré que les deux TADs agissent en synergie pour activer la transcription. Des résidus hydrophobes équivalents à ceux du TAD1 furent mis à jour au sein du TAD2 : le tryptophane (W) 53 et la phénylalanine (F) 54^{75,76}. Plusieurs essais fonctionnels avec des mutants des deux TADs *in vitro* puis *in vivo* ont permis de montrer l'importance et la spécificité de chaque domaine. Les premières expériences *in vitro* ont utilisé un p53^{ΔN1-42} (une délétion des 42 premiers acides aminés de p53 donc le TAD1), p53 où la leucine 22 était mutée en glutamine et le tryptophane 23 muté en sérine (p53^{L22Q, W23S}) et un p53^{ΔN1-63} (délétion des acides aminés 1 à 63, donc des deux TAD). Les deux mutants du TAD1 conservaient la capacité à induire l'apoptose, mais le mutant où les deux TAD sont absents en

était incapable, suggérant un rôle du TAD2 dans l'induction de l'apoptose^{74,83}. Étant donné le fait que le mutant p53^{ΔN1-42} conserve des fonctions cellulaires, un quadruple mutant p53^{L22Q, W23S, W53Q, F54S} permet de démontrer que c'est bien grâce au TAD2 que ces fonctions sont maintenues⁸⁴. En effet, le quadruple mutant ne démontre aucune activité de transactivation des rapporteurs, alors que le mutant p53^{W53Q, F54S} conservait une activité intermédiaire entre celle de la protéine sauvage et du mutant p53^{L22Q, W23S}⁸⁴. Le quadruple mutant perd aussi toute capacité à induire un arrêt de prolifération, l'apoptose, ou à activer ses gènes cibles, ce qui souligne une fois de plus l'importance des domaines de transactivation dans l'induction des rôles biologiques de p53.

Des études *in vivo* dans des souris ont par la suite mené à des conclusions similaires. Les souris p53^{L25Q, W26S} et les cellules issues de ces souris démontraient une transactivation sélective de gènes : la capacité à induire p21, NOXA et PUMA était compromise, mais celle à induire BAX et d'autres gènes cibles demeurait intacte^{85,86}. Ce mutant est également incapable de répondre aux dommages à l'ADN aigus mais peut induire de l'apoptose en réponse à des stress non génotoxiques⁸⁶. De façon intéressante, ce mutant est totalement apte à induire la sénescence en réponse à des stress oncogéniques et à supprimer divers types de cancers *in vivo*^{85,87}. Le mutant p53^{W53Q, F54S} ne démontrait pas de défauts de transactivation ni d'activité biologique, mais le quadruple mutant p53^{L22Q, W23S, W53Q, F54S} perdait toute capacité à réguler ses gènes cibles, à induire une réponse aux dommages à l'ADN et à supprimer divers types de cancers^{85,87}. Le résumé des différents phénotypes associés à chaque mutant est illustré dans le Tableau 1.1⁷⁷.

Tableau 1.1 Résumé des phénotypes associés aux différents mutants de p53

	Transactivation	Réponse aux dommages à l'ADN aigus	Suppression tumorale
p53 ^{WT}	+	+	+
p53 ^{L25Q, W26S}	+/-	-	+
p53 ^{F53Q, F54S}	+	+	+
p53 ^{L25Q, W26S, F53Q, F54S}	-	-	-

Une fonction importante des facteurs de transcription est le recrutement de la machinerie transcriptionnelle, ce qui inclut des protéines impliquées dans la modification d'histones, dans

le remodelage de la chromatine et dans les étapes d'initiation et d'élongation de la transcription⁷⁷. Dans le cas de p53, cela s'effectue via le domaine de transactivation, qui peut de surcroît interagir avec des régulateurs négatifs de p53 tels que MDM2, MDM4 et E1B via les acides aminés 22 et 23, qui vont causer son ubiquitination et sa dégradation via le protéasome^{88,89}. La transcription chez les eucaryotes est dépendante du recrutement des facteurs de transcription généraux (GTF, *General Transcription Factors*) et de l'ARN Polymérase II (Pol II) au promoteur d'un gène donné, pour former le Complexe de Pré-Initiation (PIC, *Pre-Initiation Complex*). Le premier GTF à être recruté est TFIID (*Transcription Factor II D*), qui comprend TBP (*TATA box Binding Protein*) et plusieurs facteurs associés à TBP. Le TAD de p53 lie TBP ainsi que deux autres sous-unités de TFIID : TAF6 et TAF9^{90,91}. Le TAD2, quant à lui, peut se lier aux sous-unités p62 et TFB1 de TFIID⁹², montrant une coopération entre les deux domaines de transactivation pour l'initiation de la transcription. P53 permet aussi l'ouverture de la chromatine en recrutant des protéines modificateuses de la chromatine, telles des histones acétyltransférases (HAT, *Histone acetyltransferases*) comme STAGA⁹³ ou CEBP et p300, qui ont une fonction double en stabilisant p53 via l'acétylation de sites spécifiques^{94,95}.

Le second domaine de p53 constitue son DBD, qui lui permet de lier des séquences spécifiques d'ADN dans les promoteurs de ses gènes cibles⁹⁶⁻⁹⁸. La majorité des mutations de p53 retrouvées dans les cancers sont localisées au sein de ce domaine, plus particulièrement dans les régions ultra-conservées⁹⁹. La plupart de ces mutations empêchent p53 de lier l'ADN. Ce domaine est résistant à l'activité des protéases et se replie indépendamment. Il contient aussi un atome de Zn²⁺ nécessaire à la liaison spécifique de l'ADN. Sa structure est composée de deux feuillets β antiparallèles qui forment un sandwich β , qui supportent deux hélices α , qui elles interagissent directement avec l'ADN¹⁰⁰. La forme tétramérique de p53 lie l'ADN sur quatre séquences consensus répétées en tandem et arrangées majoritairement en tête à queue ($\rightarrow \leftarrow \rightarrow \leftarrow$)¹⁰⁰. L'ensemble du consensus est RRRCW WGYYY RRRCW WGYYY (R=purine, Y=pyrimidine, W=A ou T)¹⁰¹.

Le troisième domaine de p53 est son domaine de tétramérisation. En effet, p53 est sous forme tétramérique en solution. Ce sont les résidus 324 à 355 qui lui permettent d'adopter cette conformation. Le domaine de tétramérisation de chaque monomère est constitué d'un feuillet β et d'une hélice α . Les feuillets β de deux monomères s'associeront ensuite de façon anti-parallèle

pour former le dimère, ce qui amènera les hélices à interagir ensemble¹⁰². Le tétramère est formé d'un dimère de dimères, qui est stabilisé grâce à une large surface hydrophobe entre les hélices α des dimères¹⁰³.

Le domaine riche en prolines de p53 est situé immédiatement après le TAD2 et contient 10 résidus de proline. Des expériences ont suggéré que ce domaine contribuait aux activités fonctionnelles de p53, notamment à l'induction de l'apoptose¹⁰⁴. Deux possibilités existent pour expliquer comment ce domaine peut favoriser cette activité. L'une découle du fait que les domaines riches en prolines sont connus pour lier les domaines SH3 de d'autres protéines^{105,106}. La deuxième option est que ce domaine pourrait aider au repliement du DBD, car les prolines confèrent une rigidité structurale qui pourrait agir comme une barrière structurale entre les deux domaines.

Finalement, le C-terminal de p53 est un domaine fortement basique et non structuré qui peut lier l'ADN et l'ARN et est sujet à de nombreuses modifications post-traductionnelles¹⁰⁷. De nombreuses études ont d'abord montré que p53 nécessite un changement conformationnel pour être activé et lier l'ADN de manière spécifique. Les premières hypothèses voulaient que ce changement de conformation soit contrôlé par le domaine C-terminal puisque la phosphorylation des sérines (S) S378 ou S392 et la délétion du domaine résultent en une liaison spécifique de p53 à l'ADN *in vitro*¹⁰⁸. La liaison de courtes séquences d'ADN simple brin au C-terminal favorise la liaison spécifique à l'ADN de p53, alors que la liaison de plus longues séquences double brin inhibe la liaison à l'ADN *in vitro*¹⁰⁹. Le C-terminal aide aussi à la réassociation de simples brins d'ARN ou d'ADN en double brins. Il se lie de façon préférentielle aux terminaisons libres d'ADN et aux IDTs (*Internal Deletion Loops*) générés lors d'erreurs de réplication¹¹⁰.

1.4.3 Mécanismes d'activation et régulation post-traductionnelle de p53

Après avoir compris la structure et les domaines fonctionnels de cette protéine, il est primordial de s'intéresser à son activation et à sa régulation. En effet, p53 est très peu exprimé au niveau basal dans une cellule non stressée. Il est stabilisé et activé en réponse à de nombreux stress, à travers son interaction avec des régulateurs négatifs, des activateurs et de nombreuses modifications post-traductionnelles (Figure 1.5). La demi-vie de p53 dans un contexte normal

en absence de stress se situe entre 6 et 20 minutes et deviendra de plusieurs heures dans un contexte d'activation de la voie¹⁰¹. P53 est capable de répondre à une pléthore de signaux de stress incluant divers types de dommages à l'ADN, le raccourcissement des télomères,

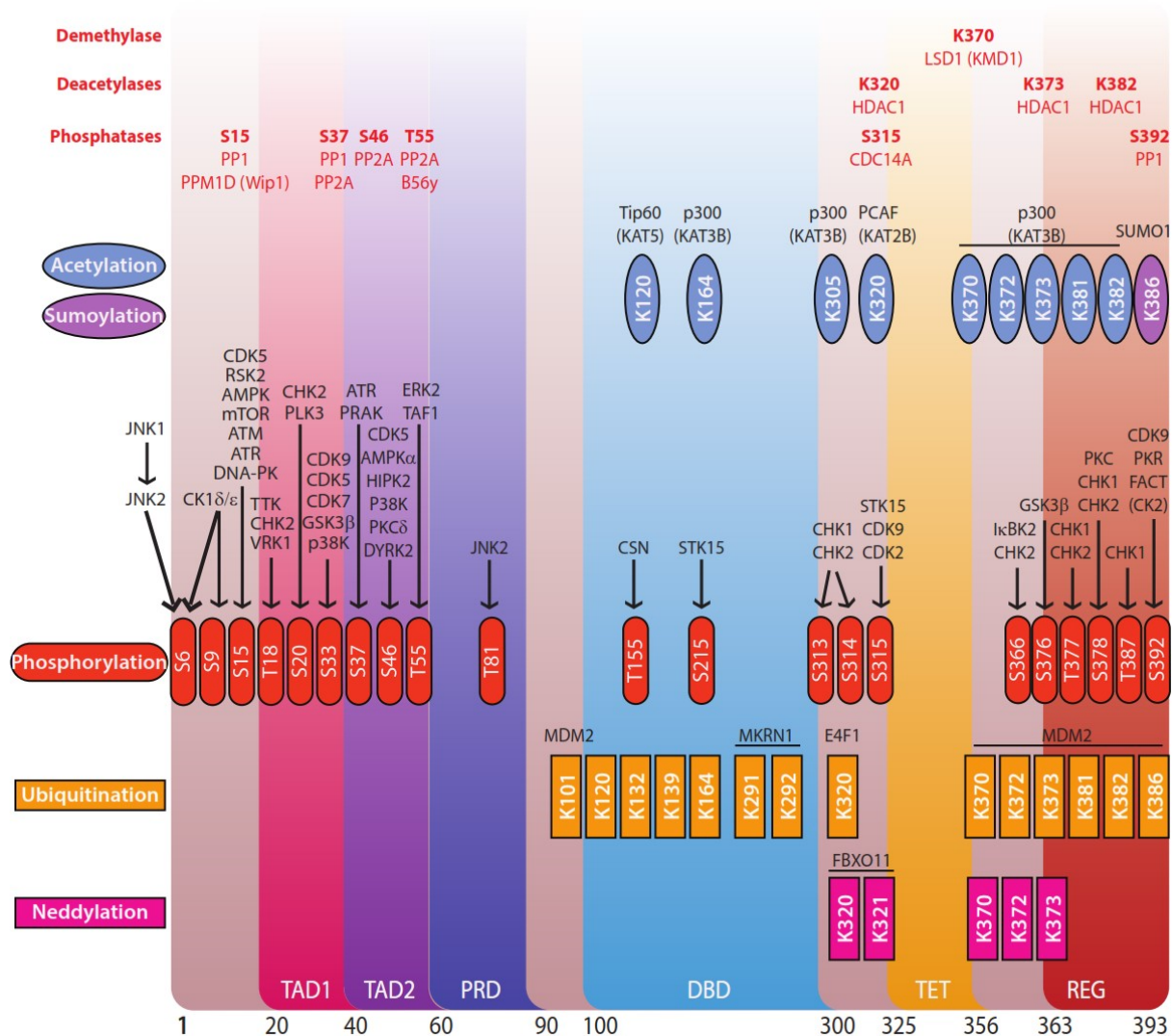


Figure 1.5 Modifications post-traductionnelles de p53

La séquence de p53 est illustrée par couleurs en fonction de ses domaines. Les différentes modifications post-traductionnelles sont indiquées par couleur et par l'acide aminé modifié. Les enzymes responsables de ces modifications sont indiquées en noir alors que les enzymes responsables d'enlever ces modifications sont indiquées en rouge. Figure adaptée de : Anderson et al. 2009¹¹¹

l'hypoxie, les dommages du fuseau mitotique, les chocs thermiques, les protéines mal repliées, des défauts de biogenèse des ribosomes, le manque de nutriments et même l'activation de certains oncogènes par mutation¹¹². En conditions normales et en absence de stress, la majorité des résidus du TAD sont sous forme non phosphorylée (résidus de sérine (S) et thréonine (T)).

La thréonine 55 et la sérine 376, toutefois, sont phosphorylées en conditions basales et déphosphorylées lors d'un stress. La détection de p53 phosphorylé après exposition à un stress est possible dès 30 minutes après action de ce stress, ce qui démontre une cinétique d'activation rapide.

Il est aujourd'hui bien connu qu'une des premières étapes d'activation de p53 en réponse aux dommages à l'ADN est la phosphorylation de certains résidus clés du TAD. Les kinases ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) et ATR (*Ataxia Telangiectasia and Rad3 related*), ainsi que CHK1 et CHK2 font partie des premiers répondants d'un dommage à l'ADN. La voie ATM/CHK2 est surtout activée en réponse aux radiations ionisantes et aux oncogènes¹¹³ alors que la voie ATR/CHK1 est principalement activée en réponse aux rayons UV. Il a été montré qu'ATM et ATR pouvaient phosphoryler la sérine 15 de p53 et que cet évènement était essentiel à l'activation de p53. Toutefois, ce n'est pas la phosphorylation de ce résidu qui cause la perte d'interaction avec MDM2¹¹⁴. La phosphorylation de la sérine 15 va plutôt favoriser l'interaction de p53 avec des cofacteurs nécessaires à la transactivation des gènes, tels CBP/p300¹¹⁴. C'est la phosphorylation de la sérine 20 par CHK1 ou CHK2 qui semble clé pour contrôler l'interaction avec MDM2¹¹⁵⁻¹¹⁸. Il a aussi été montré qu'ATM phosphoryle directement MDM2 et que cette étape est importante pour briser l'interaction entre p53 et MDM2¹¹⁹. La phosphorylation de la thréonine 18 a aussi un grand impact sur l'affinité de p53 pour MDM2. La phosphorylation de la sérine 46 est essentielle pour l'induction de certains gènes pro-apoptotiques tels P53AIP1 (*p53 regulated Apoptosis Inducing Protein 1*) mais n'est pas requise pour l'induction de gènes nécessaires à l'arrêt du cycle cellulaire¹²⁰.

L'affinité de p53 pour ses promoteurs semble aussi contrôlée par la phosphorylation et l'acétylation de certains résidus de son domaine C-terminal. En effet, la déphosphorylation de la sérine 376, qui est régulée par ATM, semble nécessaire pour la liaison de l'ADN^{121,122}. L'acétylation de p53 est aussi très importante pour son bon fonctionnement, or celle-ci est stimulée par la phosphorylation de résidus en N-terminal, comme la sérine 15 par ATM¹²³.

Plusieurs études ont d'abord décrit le domaine C-terminal (CTD, *C Terminal Domain*), ou domaine régulateur (REG) de p53 comme étant un régulateur négatif de la liaison spécifique à l'ADN de p53. Toutefois, il a par la suite été montré que ces résultats représentaient des artéfacts. En effet, les expériences avaient été produites *in vitro* en utilisant de petits fragments

d'ADN nus, ce qui représente mal le contexte génomique de la chromatine, et ne permet pas au tétramère pleine longueur de p53 de s'y lier. Il a ensuite été démontré que le C-terminal possède au contraire un effet stimulant sur la liaison de l'ADN par p53, et qu'il est plutôt un activateur de cette fonction¹²⁴⁻¹²⁶. En effet, le CTD est essentiel à l'activité de transactivation de p53 *in vitro*, dans le contexte où des nucléosomes sont utilisés pour réaliser des essais de transcription^{124,127}. L'utilisation de peptides de liaison du C-terminal ayant la capacité de traverser la membrane cellulaire a même montré que ceux-ci avaient l'effet inverse : ils bloquent les activités de liaison à l'ADN et de transactivation de p53¹²⁷. Le mécanisme d'action du domaine C-terminal semble relié à sa capacité à lier l'ADN de manière non spécifique et à permettre un balayage de l'ADN facilitant la liaison spécifique du DBD à ses séquences consensus¹²⁸.

L'acétylation de p53 a trois fonctions principales : celle de stabiliser p53 en empêchant l'ubiquitination des lysines, celle d'inhiber la formation de complexes répresseurs de MDM2/MDMX sur les promoteurs et celle de recruter des cofacteurs nécessaires à la transactivation. Neuf lysines sont acétylées par diverses HATs (*Histone Acetyl Transferases*) comme p300, CBP (*CREB Binding Protein*), PCAF (*P300/CBP Associated Factor*), TIP60 (*Tat-Interactive Protein of 60 kDa*) et la famille MYST (pour *MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2 and Tip60*)¹²⁹.

L'ubiquitination est une autre modification post-traductionnelle que subit p53. MDM2, une ubiquitine ligase de type E3, peut poly-ubiquitiner p53 sur les lysines K370, K372, K373, K381, K382 et K386, ce qui mène à sa dégradation par le protéasome¹²⁹. P53 peut aussi être mono-ubiquitiné, ce qui favorise sa translocation au cytoplasme où elle ne peut plus transactiver ses gènes cibles, mais peut exercer des fonctions indépendantes de la transactivation notamment en induisant l'apoptose¹²⁹. La mono-ubiquitination est aussi dépendante de MDM2, lorsque la protéine est exprimée à de faibles niveaux¹²⁹. Il est intéressant de mentionner que MDM2 est une cible transcriptionnelle de p53, ce qui forme une boucle de contrôle rétroactif¹²⁹. MDM4 a une fonction similaire à celle de MDM2 mais ne possède pas d'activité ubiquitine ligase. Sa liaison masque le domaine de transactivation et empêche simplement le recrutement des cofacteurs nécessaires à la transcription. Il existe deux désubiquitinases qui exercent leurs fonctions sur p53 : HAUSP (*Herpes virus Associated Ubiquitin-Specific Protease*) et USP10 (*Ubiquitin Specific Peptidase 10*).

D'autres modifications post-traductionnelles de p53 ont été rapportées, bien qu'elles représentent une faible proportion des niveaux totaux de la protéine. P53 peut subir des modifications de la famille des membres semblables à l'ubiquitine : la SUMOylation qui ajoute une protéine SUMO (*Small Ubiquitin-Like Modifier*) et la NEDDylation qui ajoute une protéine NEDD8 (*Neural precursor cell Expressed Developmentally Deregulated protein 8*). Ces modifications sont également conjuguées aux lysines. La NEDDylation et la SUMOylation (K386) semblent affecter l'activité transcriptionnelle de p53¹²⁹.

Finalement, p53 est modifiée par méthylation sur les résidus arginine du domaine de tétramérisation par PRMT5 (*Protein Arginine N-Methyl Transferase 5*), ce qui a comme conséquence un changement dans la spécificité des gènes cibles de p53. La méthylation des résidus lysine est toutefois mieux étudiée. La protéine peut être monométhylée ou diméthylée et les effets sur l'activation ou la répression varient selon le site modifié et le nombre de groupements méthyle. Globalement, la méthylation modifie la liaison de p53 à certains de ses cofacteurs¹²⁹.

Certains des résidus lysine de p53 sont la cible de différentes modifications post-traductionnelles, chacune étant exclusive et bloquant la modification de cette lysine ou d'autres résidus lysine à proximité, ce qui constitue un niveau de régulation supplémentaire¹²⁹.

1.4.4 La Régulation Transcriptionnelle de p53

La fonction principale de p53 est de réguler la transcription de gènes spécifiques dont les effets sont grandement variés. Dans les débuts de la recherche sur p53, la protéine était principalement connue pour réguler le cycle cellulaire et l'apoptose via l'activation de l'inhibiteur de CDK, *p21* et des membres de la famille de régulateurs de l'apoptose *BCL-2*, *PUMA* et *NOXA*. Ces mécanismes pouvaient expliquer les phénomènes de suppression tumorale engendrés par p53.

Toutefois, on sait aujourd'hui que la signalisation par p53 est beaucoup plus complexe : elle implique la régulation d'une pléiade de gènes et le choix de ces gènes semble varier selon le contexte (type cellulaire, état de différenciation, type de stress ainsi qu'une multitude de facteurs environnementaux)¹³⁰. Une étude des données de 16 articles ayant publié des jeux de données de génomes entiers est arrivée à la conclusion que seulement environ 60 gènes cibles

de p53 étaient communs à toutes les études, et ce sur près de 3700 gènes identifiés comme des cibles directes de p53¹³¹. À noter qu'il a été établi que p53 est un activateur transcriptionnel et que toute activité de répression de la transcription est indirecte¹³¹⁻¹³³ et contrôlée entre autres par p21, E2F7 et des micro-ARNs (miRNA, *micro-RNAs*)^{128,134-137}.

Tel qu'expliqué précédemment avec les mutants des TADs, il fut montré que la réponse aux dommages à l'ADN aigus, l'apoptose et la sénescence n'étaient pas requis pour la suppression tumorale. p53^{3KR}, un mutant de trois sites d'acétylation importants, cause l'incapacité de p53 à réguler ses cibles classiques des voies de l'apoptose, la sénescence et la réponse aux dommages à l'ADN¹³⁸. Mais ce mutant conserve ses fonctions de suppression tumorale chez la souris, qui ne développe pas de tumeurs spontanées¹³⁸. Cette étude est très importante car elle montre que la suppression tumorale médiée par p53, dans un contexte non provoqué, ne dépend pas de ces mécanismes canoniques et qu'il faudra se tourner vers des gènes moins classiques afin de trouver les cibles contrôlant la suppression tumorale. Il est toutefois important de noter que seule l'induction de la sénescence par choc de culture dans les MEFs et la sénescence induite par l'oncogène RAS ont été évaluées. Il serait intéressant de tester l'induction de sénescence avec le triple mutant dans d'autres types cellulaires. De plus, seule la suppression tumorale spontanée fut évaluée. Il serait important de voir si le triple mutant peut conserver des fonctions de suppression tumorale dans d'autres modèles de cancer et dans des souris traitées avec des agents carcinogènes. Dans le même ordre d'idées, une souris nulle pour les gènes de *p21*, *NOXA* et *PUMA* possède des défauts de régulation des dommages à l'ADN, mais ne développe pas non plus de tumeurs de façon spontanée.

La question devient donc : mais quels sont les gènes cibles de p53 qui dictent la suppression tumorale? Il est possible que les voies classiques restent tout de même importantes, mais que le système soit assez robuste pour permettre une compensation par d'autres voies qui vont assurer la suppression tumorale¹³⁹. Il est aussi possible que la suppression tumorale soit contexte-dépendante et que les voies de réponse aux dommages à l'ADN soient importantes dans certains contextes tumoraux uniquement. Finalement, il est possible que les voies de réponse aux dommages à l'ADN ne soient pas essentielles à la suppression tumorale et que d'autres voies de réponse de p53 contrôlent cette fonction. Par exemple, les stress cellulaires tels que l'hypoxie ou la réponse aux faibles doses de dommages à l'ADN chroniques, qui sont

typiques du microenvironnement des tumeurs, pourraient constituer des avenues prometteuses et plus physiologiques¹³⁹. P53 a aussi été impliqué dans la stabilité génomique, le métabolisme, l'induction de la ferroptose (un type de mort cellulaire programmée) et la répression de la pluripotente, qui sont des avenues extrêmement intéressantes. De plus, le fait que ce soit p53 qui est en général muté dans les cancers plutôt que ses gènes cibles suggère qu'il contrôle probablement une véritable variété de programmes cellulaires qui suppriment les tumeurs de manière coordonnée¹³⁹.

Des études récentes ont aidé à mieux comprendre comment p53 est activé. En effet, la théorie classique stipule que la protéine MDM2 se lie à p53 et cause son ubiquitination et sa dégradation subséquente, tout en bloquant son activité de transactivation simplement par la liaison du TAD. L'importance relative de ces deux mécanismes n'était jusqu'ici pas claire. Certaines études démontrent qu'il est essentiel que p53 soit fortement induit afin d'enclencher certaines réponses cellulaires telles l'apoptose^{124,140,141}. Les auteurs ont utilisé une technique de séquençage de pointe, le GRO-seq (*Global Run On sequencing*), qui permet l'étude des ARN naissants, au lieu des techniques courantes de micropuces d'ADN (microarrays) qui mesurent les niveaux d'ARN à l'état stationnaire. Cette méthode a permis de découvrir qu'après un court traitement à la nutline3a (30 minutes), un inhibiteur de la liaison MDM2-p53 causant la stabilisation de p53, de nouveaux transcrits étaient générés¹³². Pourtant, à un aussi court temps de traitement, aucune stabilisation des niveaux de p53 n'est observée, ce qui suggère que le masquage du TAD de p53 par MDM2 joue un rôle très important. De plus, dans ce contexte, environ 200 gènes ont été identifiés comme étant des cibles directes de p53¹³². On retrouve parmi ces gènes cibles toutes les voies de signalisation majeures connues pour être régulées par p53. Cela suggère que même sans être stabilisé, p53 peut contrôler un large programme cellulaire. Les résultats démontrent aussi que p53 possède une activité basale. Sans traitement à la nutline3a, un anticorps reconnaissant le TAD1, qui ne peut se lier qu'en l'absence de MDM2, réussit à lier p53, démontrant qu'il existe du p53 actif au niveau basal¹³². Cette étude identifiant les gènes cibles directs de p53 a toutefois été réalisée dans une seule lignée cellulaire tumorale, les HCT116. Connaissant la variabilité de la signalisation par p53, il serait intéressant d'effectuer le même type d'étude dans d'autres lignées cellulaires, dont des lignées normales, afin d'avoir un portrait plus global des gènes cibles régulés.

Brièvement, les fonctions non canoniques de p53 qui suscitent le plus d'intérêt sont ses rôles dans le métabolisme, la régulation de la pluripotence et de la différenciation cellulaire, sa capacité à induire la ferroptose et ses rôles dans la stabilité génomique et épigénétique. Effectivement, les cellules cancéreuses reprogramment leur métabolisme afin de pouvoir soutenir un rythme de prolifération accru¹⁴². Il a été montré que p53 peut contrer cette reprogrammation notamment en inhibant la glycolyse via la répression des transporteurs de glucose *GLUT1* (*Glucose Transporter type 1*) et *GLUT4* (*Glucose Transporter type 4*) ainsi qu'en promouvant la phosphorylation oxydative mitochondriale via l'activation de *SCO2* (*Cytochrome C Oxydase Assembly Protein*)¹⁴³. P53 peut également limiter les dommages oxydatifs en activant des gènes ayant des fonctions antioxydantes, tels que les *sestrines*. L'importance de ces fonctions métaboliques est soulignée par le fait que le mutant p53^{3KR} conserve la capacité d'activer plusieurs voies métaboliques, qui pourraient donc être impliquées dans sa capacité à agir comme suppresseur tumoral¹³⁸. Toutefois, certains des effets métaboliques observés par différents laboratoires et dans différents contextes sont contradictoires : dans les muscles, p53 stimule la glycolyse plutôt que de l'inhiber par exemple¹⁴³.

L'étude du mutant p53^{3KR} a aussi permis de lier l'induction de la ferroptose, une forme de mort cellulaire programmée dépendante du fer et de lipides oxydés, à la signalisation par p53¹⁴⁴. Le mutant p53^{3KR} réprime le gène *SLC7A11* tout comme la protéine sauvage, ce qui cause une accumulation toxique de lipides oxydés et occasionne la mort cellulaire par ferroptose. Le mutant de p53^{4KR}, quant à lui, perd la capacité de réprimer *SLC7A11*, d'induire la ferroptose et de supprimer la croissance tumorale de xénogreffes chez la souris¹⁴⁵. Il existe aussi un variant polymorphique africain de p53, p53^{P47S}, qui perd la capacité de réprimer *SLC7A11*, *GLS2* et *SCO2* et de supprimer la tumorigenèse¹⁴⁶, ce qui indique que la ferroptose pourrait être importante pour les fonctions de suppression tumorale de p53. Les souris porteuses de cette mutation développent spontanément divers types de cancers.

Il a été montré que p53 peut réguler les cellules souches et la différenciation en réprimant l'auto-renouvellement cellulaire de diverses cellules souches et progénitrices en plus de promouvoir la différenciation¹⁴⁷⁻¹⁵¹. De plus, les mutations de p53 dans les cancers du sein et du poumon corrélaient avec une signature de cellules souches¹⁵². P53 régule aussi la plasticité

cellulaire, c'est-à-dire la capacité d'une cellule à transiger d'un état cellulaire à un autre: elle peut inhiber la reprogrammation des cellules somatiques en cellules souches pluripotentes induites (IPSC, *Induced Pluripotent Stem Cells*)¹⁵³.

Finalement, le concept de p53 en tant que gardien du génome prend une nouvelle tournure avec de plus récentes découvertes. Classiquement, il est accepté que la détection de dommages à l'ADN mène à l'activation de p53, qui pourra éliminer ces cellules par le biais de l'apoptose ou limiter leur nombre avec la sénescence dans le but de prévenir la transmission des mutations aux cellules filles¹³⁰. Il a toutefois récemment été montré que p53 peut directement transactiver des gènes impliqués dans la réparation des dommages à l'ADN, tels *DDB2*, *XPC* et *MSH2*, et par le fait même contrôler des mécanismes de réparation tels que la réparation de mésappariements (*mismatch repair*), la réparation par excision de nucléotides (*Nucleotide Excision Repair*) et la réparation par excision de bases (*Base Excision Repair*)¹⁵⁴. P53 peut en fait contrôler presque tous les mécanismes de réparation de l'ADN si l'on inclut ses modes d'activation indépendants de la transactivation¹⁵⁴. De plus, d'autres résultats montrent que les mutations de *p53* dans le cancer corrélerent non seulement avec des gènes co-mutés, mais aussi avec la variabilité du nombre de copies (*Copy Number Variation*) et surtout, avec l'aneuploïdie¹⁵⁵. En effet, en absence de p53, les cellules tétraploïdes peuvent proliférer sans encombre¹³⁰. Non seulement l'absence de *p53* permet aux cellules de proliférer avec un génome anormal, mais elle favorise l'apparition d'anomalies. En effet, p53 contrôle des points de régulation du cycle cellulaire, tels que celui contrôlant la phase G2/M, pendant laquelle le fuseau mitotique est assemblé¹³⁰. Des erreurs à cette étape favorisent une mauvaise ségrégation des chromosomes. P53 maintient aussi la stabilité génomique en assurant la progression des fourches de réplication^{156,157}. En son absence, on remarque l'effondrement des fourches et une instabilité génomique, possiblement à cause de la perte de transactivation de *MDM2* ou de sa capacité à réguler le stress associé à la transcription^{156,157}. Finalement, plusieurs études ont montré que p53 pourrait aussi contrôler l'intégrité du génome en régulant le mouvement des éléments répétés et des rétrotransposons au sein du génome¹⁵⁸. P53 peut se lier à des séquences au sein des éléments LINE (*Long Interspersed Nuclear Element*) ainsi que dans d'autres transposons et ce phénomène est associé avec une diminution du nombre de ces éléments répétés¹⁵⁹. Cela suggère que p53 peut favoriser une répression épigénétique de ces éléments

plutôt qu'activer un mécanisme d'élimination de la cellule¹⁶⁰. Le double rôle de p53 devient alors évident : sa présence permet d'éliminer des cellules dangereuses pour l'organisme et d'assurer la stabilité génomique des cellules et son absence promeut l'instabilité génomique et la propagation de ces cellules problématiques. Le fait que p53 muté coopère très rapidement avec les oncogènes pour induire la transformation maligne indique que l'instabilité génomique n'en est probablement pas l'élément instigateur. Cependant, il y contribue certainement par l'apport de nouveaux facteurs avantageux pour la survie¹³⁰.

En conclusion, la complexité de la signalisation de p53 croît de façon exponentielle avec nos connaissances. Souvent, la régulation d'un même gène résulte en des effets opposés (augmentation versus diminution) selon le contexte cellulaire. Toutefois, il ne faut pas négliger plusieurs facteurs pouvant expliquer ces effets : différents types cellulaires possèdent un épigénome différent, où l'accessibilité des gènes n'est pas la même¹³⁰. Le choix des gènes activés par p53 en sera par conséquent directement affecté. Il faut aussi considérer que selon le contexte de stress et du type cellulaire, le protéome sera différent. Les voies de signalisation de p53 peuvent donc croiser le fer avec celles d'autres facteurs de transcription, par exemple, qui occuperont plus ou moins de promoteurs et affecteront la liaison de p53 à ses promoteurs¹³⁰. Les voies de signalisation en général peuvent bloquer ou favoriser certaines réponses, puisque l'activation d'un gène dans un contexte cellulaire donné peut générer une réponse différente que le même gène dans un contexte différent. Pour illustrer ceci, par exemple, il est connu que la signalisation par ATM bloque l'apoptose induite par p53 alors qu'ATM ne modifie pas les gènes cibles de p53. En fait, l'activité anti-apoptose d'ATM découle d'une inhibition de l'autophagie, ce qui a pour effet de maintenir une homéostasie mitochondriale et de supprimer la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS, *Reactive Oxygen Species*)¹⁶¹. Ainsi, la quête des gènes cibles les plus importants de p53 devra possiblement être réorientée afin de se concentrer sur la réponse qui est importante pour chaque contexte. Cela pourrait mener à des stratégies spécifiques à chaque cancer qui seraient plus efficaces.

1.4.5 Cibler la voie de p53 d'un point de vue thérapeutique

L'un des premiers concepts importants dans le domaine de la thérapie ciblant p53 est la notion erronée que p53, lorsque muté, est seulement non fonctionnel. En effet, plusieurs

mutations de p53 lui confèrent réellement des capacités supplémentaires acquises qui sont souvent oncogéniques et en opposition avec ses effets anti-tumoraux naturels¹³⁰. Cela représente donc un avantage supplémentaire pour les cellules cancéreuses, mais aussi une avenue prometteuse comme cible thérapeutique. Par exemple, certains mutants de p53 peuvent inhiber p63 (TP63, *Tumor Protein 63*) et p73 (TP73, *Tumor Protein 73*) les deux autres membres de la famille de p53^{162,163}. Plus généralement, ces gains de fonctions ont fréquemment une capacité à induire l'invasion tumorale et les métastases, mais les mutants peuvent aussi induire la résistance aux thérapies, l'angiogenèse ou encore la reprogrammation épigénétique¹⁶⁴.

P53 est muté dans près de la moitié des cancers et la plupart des mutations sont des mutations faux sens (environ 75%)¹⁶⁵. Ce sont ces mutations qui, en général, apportent un avantage aux cellules cancéreuses. La majorité des mutations qui affectent les fonctions de suppresseur tumoral de p53 augmentent son énergie libre et par conséquent mènent à des changements de conformation dus à un mauvais repliement de la protéine¹⁶⁵. Ces mutations sont classées selon deux types principaux : celles qui affectent la liaison à l'ADN et les mutants structuraux. Le quart de ces mutations faux-sens se produisent sur cinq résidus clés du domaine de liaison à l'ADN, soit R273, R248, R175, R213 et G245¹⁶⁵. Des mutations de l'arginine 273, qui lie directement l'ADN, résultent en une perte de liaison avec l'ADN alors que des mutations de l'arginine 175 par exemple, empêchent le repliement du DBD. Certaines mutations sont spécifiques à certains types de cancer et résultent de l'exposition à des substances particulières, telles la fumée de cigarette dans le cas du cancer du poumon¹⁶⁵ ou l'exposition aux UV dans le cas des mélanomes¹⁶⁶. Ces mutations ont toutes un effet sur la structure de p53 ou sa capacité à lier l'ADN, mais peuvent aussi mener à des activités acquises différentes, générant une panoplie de protéines aux fonctions diverses.

L'idée d'utiliser p53 comme cible thérapeutique est une bonne stratégie, mais celle-ci est plus difficile à réaliser que l'inhibition de l'activité enzymatique d'une protéine. En effet, cela implique d'activer les fonctions, perdues par mutation, d'une protéine. Des molécules ont aussi été développées dans le but de réactiver p53 sauvage par inhibition de MDM2, son principal inhibiteur. Le premier fut la nutline3¹⁶⁷, suivi par plusieurs autres molécules ou peptides. Des essais cliniques furent réalisés avec ces molécules, mais une grande toxicité empêche l'administration de doses thérapeutiques et ce genre d'études ne permet pas de

conclure sur l'efficacité anti-cancer du médicament. Les inhibiteurs de MDM2 sont aussi développés dans le but d'être utilisés pour la cyclothérapie. Ce principe vise à combiner ces inhibiteurs avec des agents chimiothérapeutiques afin d'induire un arrêt du cycle cellulaire temporaire dans les cellules normales, via la stabilisation de p53, qui permettrait d'utiliser des doses plus élevées de chimiothérapie en ayant moins d'effets secondaires¹⁶⁸. Des études employant cette stratégie chez la souris ont montré des résultats encourageants¹⁶⁹. Une autre étude a montré que certains mutants de p53 formaient des agrégats cellulaires insolubles¹⁷⁰ qui pouvaient être solubilisés grâce à un peptide liant la région de p53 qui cause l'aggrégation¹⁷¹. Cela conférerait un regain d'activités anti-tumorales à la protéine dans les cellules de cancer de l'ovaire¹⁷¹.

Plusieurs stratégies différentes ont été utilisées pour cibler les protéines mutantes de p53. Beaucoup des composés chimiques qui ont été identifiés comme pouvant réactiver p53 et favoriser son repliement correct font partie de la famille des composés liant les cystéines¹⁶⁵. P53 possède 10 cystéines dans son DBD, qui sont des cibles potentielles pour ce genre de composés. Par exemple, il a été montré que le CP-31398 favorise le repliement de p53 dans les cellules et lui redonne des propriétés anti-tumorales dans des modèles de xénogreffes de souris¹⁷²⁻¹⁷⁴. Cependant, comme pour plusieurs de ces composés, une partie des effets est bel et bien p53 dépendant mais il possède des activités p53-indépendantes également. Ces composés montrent tout de même beaucoup de promesses, APR-246 par exemple, est en phase II d'essais cliniques^{175,176}.

Un peptide a aussi été développé afin de faire compétition à la liaison de p53 mutant avec p73¹⁷⁷, qui empêche la transactivation des gènes cibles normaux de p73¹⁷⁸. Le peptide, RETRA, permet à p73 de redevenir actif et d'induire ses gènes cibles et la mort cellulaire, ainsi que la régression de tumeurs chez les souris¹⁷⁷. Finalement, puisque certains cancers peuvent devenir dépendants des fonctions oncogéniques acquises par les mutants de p53, désactiver ou supprimer ces protéines p53 mutantes semble une autre option de traitement. Ce domaine a été pour le moment peu étudié mais une étude a utilisé le concept que la stabilisation de p53 mutant requiert la chaperonne HSP90¹⁷⁹. Le traitement de souris Trp53^{R172H} atteintes de lymphomes des cellules T avec des inhibiteurs de HSP90 augmente leur survie¹⁷⁹. Le même traitement n'avait aucun effet sur des souris nulles pour *p53*.

Le fait que *p53* soit muté dans près de la moitié des cancers rend le développement d'une stratégie thérapeutique qui vise ce suppresseur tumoral très attrayante. Un agent antagoniste efficace face aux effets néfastes des mutations de *p53* pourra être utilisé dans de très nombreux cancers. Les avancées dans ce domaine risquent donc d'être très prometteuses.

1.5 La ferroptose

1.5.1 Définition de la ferroptose

Il existe divers types de mort cellulaire, qui sont classés en deux grandes catégories : la mort programmée et la mort non programmée. La mort non programmée résulte de dommages excessifs et non réparables, alors que la mort programmée est finement contrôlée par des processus génétiques et moléculaires. Parmi les programmes de mort-cellulaire programmée, on retrouve la nécroptose, l'apoptose, la pyroptose, l'efférocytose, l'autophagie et la ferroptose¹⁸⁰. La ferroptose est un type de mort cellulaire programmée régulée par les niveaux de fer et de lipides oxydés et d'un point de vue moléculaire cela se traduit par une dépendance envers la protéine GPX4 (*Glutathione Peroxidase 4*) et son cofacteur le glutathion. Les lipides sujets à la peroxydation sont principalement des phospholipides contenant des acides gras polyinsaturés (PUFA, *Poly-Unsaturated Fatty Acids*) et plus particulièrement les phosphatidylethanolamines contenant des PUFA¹⁸¹. La ferroptose est aussi un type de mort cellulaire caractérisé par son aspect pro-inflammatoire, au contraire, par exemple, de l'apoptose. En effet, ce type de mort programmée relâche des facteurs qui alertent le système immunitaire, créant une réponse inflammatoire. On appelle ces molécules des DAMP (*Damage Associated Molecular Patterns*)¹⁸⁰.

Le terme de ferroptose fut introduit en 2012, cependant plusieurs études antérieures avaient identifié des molécules capables d'induire cette mort cellulaire bien que le concept n'existât pas encore. L'éraستine, un inducteur de ferroptose, fut découvert en 2003 dans le cadre d'une étude visant à identifier des composés qui seraient létaux en combinaison avec l'expression de l'oncogène RAS muté¹⁸². RSL-3 et RSL-5 (*Ras Selective Lethal -3 ou -5*) furent identifiés dans le même genre d'expériences en 2008, où il fut déterminé que c'était une mort non apoptotique¹⁸³. En 2012, il fut découvert que les inhibiteurs des autres types de mort

cellulaire alors connus ne parvenaient pas à inhiber cette mort cellulaire, alors que des antioxydants et des chélateurs de fer y parvenaient¹⁸⁴. C'est à ce moment qu'est né le concept de ferroptose.

Les bases moléculaires de la ferroptose sont les suivantes : le traitement avec l'érastrine inhibe l'import extracellulaire de cystine, qui est convertie en cystéine dans la cellule. La cystéine est nécessaire à la synthèse de glutathion réduit, qui est lui-même un co-facteur de l'enzyme GPX4 (Figure 1.6). Cette dernière permet la conversion des lipides hydroperoxydés (L-OOH) en alcools lipidiques non toxiques (L-OH). Ainsi, GPX4 est essentielle à la détoxification des lipides oxydés dans la cellule. Inhiber la voie de synthèse du glutathion ou inhiber directement GPX4 résulte en l'induction d'une mort cellulaire par ferroptose. Cela démontre aussi qu'il est primordial pour une cellule d'éliminer les lipides peroxydés.

1.5.2 Contrôle biochimique de la ferroptose

Métabolisme des acides aminés/glutathion

Le glutathion réduit ou GSH (γ -L-glutamyl-L-cystéinyglycine) est un antioxydant intracellulaire essentiel. Il est synthétisé à partir du glutamate, de la cystéine et de la glycine en deux étapes. Les enzymes cytosoliques ATP-dépendantes impliquées dans sa synthèse sont la Glutamate-Cystéine Lyase (GCL) et la Glutathion-Synthétase (GSS)¹⁸¹. L'étape limitante de cette synthèse est la quantité de cystéine, qui est un acide aminé essentiel. Par exemple, la culture de fibroblastes dans un milieu de culture dépourvu de cystéine occasionne une mort cellulaire glutathion-dépendante et pouvant être bloquée par l'ajout d'antioxydants lipophiliques¹⁸⁵. Certaines cellules sont capables de contourner ce problème de cystéine limitante car elles sont aptes à accomplir la transsulfuration. Ce processus consiste à synthétiser la cystéine à partir de la méthionine¹⁸⁶. L'import de cystine via le système de transporteurs nommé Système X_c^- n'est donc plus aussi critique et les cellules qui peuvent synthétiser la cystéine sont résistantes à l'induction de la ferroptose par inhibition du Système X_c^- . L'inhibition de CARS (*Cysteinyl-tRNA-synthetase*) cause une augmentation de la transsulfuration et permet l'acquisition d'une résistance des cellules à l'induction de ferroptose par inhibition du Système X_c^- ¹⁸⁷.

Le Système X_c^- agit comme un antiport de glutamate/cystine. Il permet l'export de glutamate intracellulaire contre l'import de cystine extracellulaire dans un ratio 1:1. Les niveaux

de glutamate impactent le système puisqu'une concentration élevée de glutamate extracellulaire bloque le système de transport¹⁸⁸. De hauts niveaux de glutamate extracellulaire peuvent donc être suffisants pour induire la ferroptose¹⁸⁸. Il est connu physiologiquement que l'accumulation de glutamate dans le système nerveux est toxique et ce concept pourrait expliquer pourquoi¹⁸⁴.

La cellule peut produire du glutamate par glutaminolyse à partir de la glutamine, bien que celle-ci soit aussi un carburant du cycle de l'acide citrique qui permet entre autres la synthèse des lipides¹⁸⁹. La première étape de la glutaminolyse consiste à convertir la glutamine en glutamate grâce à l'une de deux enzymes, GLS1 (*Glutaminase 1*) et GLS2 (*Glutaminase 2*). Il a été montré que GLS2, une cible transcriptionnelle de p53, est requise pour la ferroptose, mais pas GLS1^{146,188}. L'augmentation des niveaux de GLS2 contribue à induire une ferroptose p53-dépendante¹⁴⁶. Il est à noter cependant qu'en absence de glutamine, la pénurie de cystine ne causait pas l'accumulation de ROS, la peroxydation de lipides ou la ferroptose, bien que le mécanisme exact ne soit pas connu¹⁸⁸.

Métabolisme des lipides

Les acides gras polyinsaturés ou PUFA contiennent des atomes d'hydrogène en position bis-allylique, qui possèdent une grande labilité, ce qui rend ces acides gras susceptibles à la peroxydation¹⁹⁰. Leur abondance et leur localisation aura donc un impact sur le degré de peroxydation des lipides et donc indirectement sur la ferroptose. Les PUFA libres doivent être estérifiés pour être incorporés en tant que phospholipides membranaires. Des résultats ont montré que l'oxydation des PUFA dans la ferroptose se produit une fois qu'ils sont estérifiés et déjà incorporés dans les phospholipides. Les PUFA libres ne sont pas l'espèce oxydée, et l'ajout de PUFA libres oxydés aux cellules n'induit pas la ferroptose¹⁹¹. Les principaux phospholipides devenant oxydés et causant la ferroptose sont les phosphatidyléthanolamines (PE), qui contiennent soit un acide arachidonique (C20:4) ou son produit d'élongation, l'acide adrénique (C22:4). Ils furent identifiés par des expériences de lipidomique^{191,192}.

Des enzymes comme les lipoxygénases (LOX) peuvent accomplir la peroxydation des lipides ferroptotiques. Ces enzymes sont connues pour préférer les PUFA libres comme substrat¹⁹³. Toutefois, les phospholipides PE-PUFA peuvent former des arrangements lipidiques non-bicouche qui pourraient faciliter leur oxydation par les LOX. En effet, la déplétion des LOX

protège contre l'induction de la ferroptose par l'éraستine¹⁹⁰. Il semble probable que d'autres enzymes soient impliquées dans ce processus mais d'autres études seront nécessaires.

Les lipides, une fois peroxydés, se décomposent en dérivés réactifs incluant des aldéhydes qui peuvent réagir avec les protéines et les acides nucléiques¹⁹⁴. Une autre explication de l'effet toxique de ces lipides est qu'ils constituent les membranes cellulaires. Leur oxydation va donc affecter la composition des membranes ainsi que leur structure, leur dynamique et leur assemblage¹⁹⁴.

Métabolisme du fer

Le fer est requis pour la peroxydation des lipides et la ferroptose. Il en découle que la transferrine et son récepteur, responsables de l'import du fer, sont aussi requis. IREB2 (*Iron Responsive Element Binding Protein 2*), qui est considéré comme le maître régulateur du fer, affecte également la sensibilité des cellules à la ferroptose. L'autophagie spécifique de la ferritine, nommée ferritinophagie, augmente aussi la sensibilité des cellules à l'induction de la ferroptose. Finalement, comme il l'a été déjà mentionné, des chélateurs de fer peuvent inhiber cette mort cellulaire.

Les lipides peroxydés peuvent être générés par deux mécanismes : un mécanisme enzymatique décrit précédemment ou non enzymatique, comme la réaction de Fenton¹⁹⁴. Les enzymes comme les LOX utilisent le fer comme cofacteur. La réaction de Fenton, quant à elle, participe à la formation de radicaux libres de l'oxygène. Le fer est majoritairement sous forme liée dans les cellules, soit à l'hème, soit à des centres Fer-Soufre (FeS) ou entreposé grâce à la ferritine. Toutefois, une petite proportion de fer est labile, c'est-à-dire qu'il est faiblement lié et peut participer à des réactions d'oxydo-réduction. Ce sont ces réactions qui sont nommées réactions de Fenton. Le fer peut alors réagir avec le peroxyde d'hydrogène ou les superoxydes pour former des radicaux libres de l'oxygène. Les radicaux libres produits par cette première étape d'initiation de la réaction de Fenton peuvent ensuite arracher un atome d'hydrogène à un acide gras polyinsaturé, générant un radical centré sur le carbone pouvant réagir avec une molécule de dioxygène afin de générer un radical lipide-peroxyde. Ce dernier pourra réagir avec un autre hydrogène d'une autre molécule PUFA, ce qui créera un lipide peroxydé et un autre radical lipide-peroxyde, qui pourra interagir avec une autre molécule d'oxygène et ainsi de suite.

Cette phase est nommée phase de propagation. Finalement, une phase de terminaison aura lieu s'il y a suffisamment de radicaux libres pour que deux d'entre eux réagissent ensemble et éliminent le radical, ou que des antioxydants, des molécules capables de donner des électrons aux radicaux libres sans devenir eux-mêmes des radicaux libres, y mettent fin.¹⁹⁴

On ignore si le mécanisme enzymatique ou le mécanisme non-enzymatique contribue d'avantage à la génération des lipides peroxydés et à l'induction de la ferroptose. Toutefois, il est plus que probable qu'une combinaison des deux mécanismes soit requise¹⁹⁴.

Sélénium et NADPH

Le NADPH est un réducteur intracellulaire puissant qui est nécessaire pour l'élimination des lipides peroxydés. Il constitue un biomarqueur de la sensibilité à la ferroptose de plusieurs lignées de cellules cancéreuses¹⁹⁵. Le sélénium, quant à lui, est nécessaire à la synthèse de GPX4, qui est une sélénoprotéine¹⁹⁶. Les niveaux de sélénium peuvent donc contrôler l'abondance de GPX4. Le sélénium est incorporé dans les sélénoprotéines grâce au 21ème acide

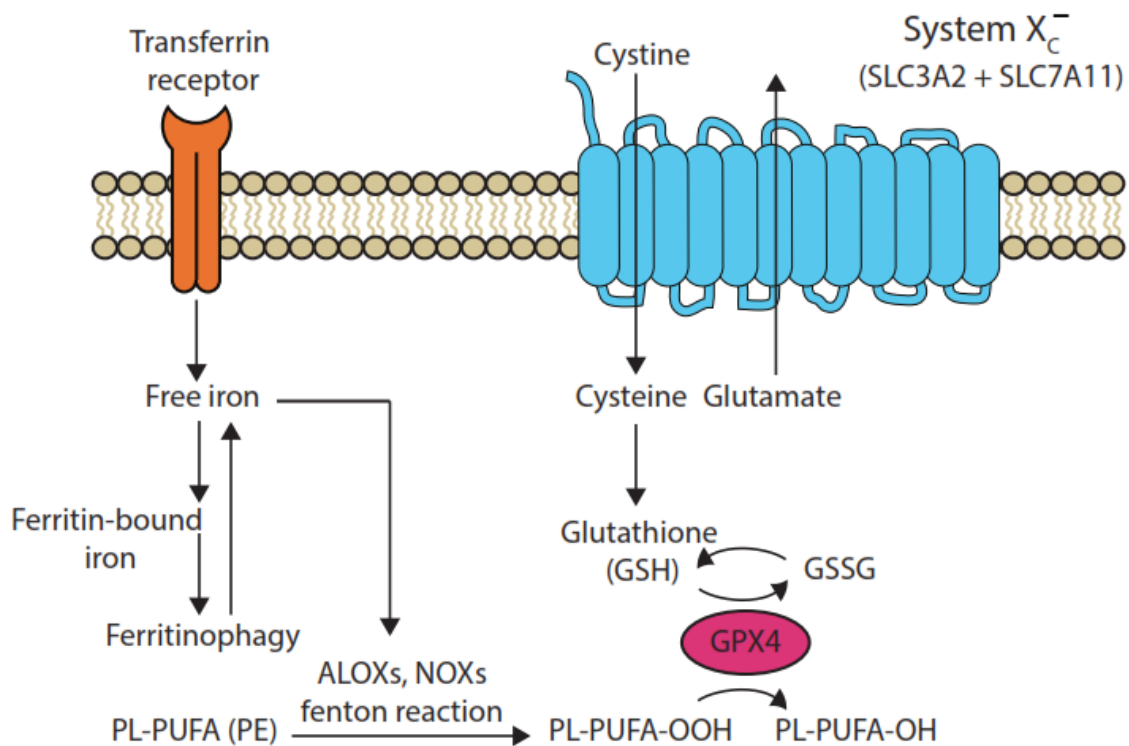


Figure 1.6 Voies de signalisation contrôlant la ferroptose. Figure adaptée de Zhang D. et al¹⁸¹

aminé, la sélénocystéine, qui est encodé par le codon stop UGA¹⁹⁷. La présence d'une séquence spécifique dans le 3' UTR (*Untranslated Region*) de ces gènes permet au ribosome de différencier le codon stop du codon codant pour la sélénocystéine¹⁹⁷.

1.5.3 Caractéristiques de la ferroptose

Différentes stimulations peuvent mener à la ferroptose. Il existe quatre grandes classes de composés qui peuvent l'induire¹⁹⁰. La première est constituée d'inhibiteurs du Système X_C^- comme l'érastine, la sulfasalazine, le glutamate et le sorafenib. La deuxième classe comprend les inhibiteurs de GPX4 comme RSL3 et ML162. La troisième contient Fin56 et CoQ10. Fin56 induit la dégradation de GPX4, probablement via l'inhibition de CoQ10, qui est un antioxydant au sein des membranes. Dans la quatrième classe de composés se retrouve FINO2, qui inhibe GPX4 de façon indirecte et qui stimule la peroxydation des lipides¹⁹⁰. Finalement, il faut ajouter que fournir un apport exogène de ROS, par le traitement des cellules avec du tert-butylhydroperoxyde, génère des lipides peroxydés qui induisent la ferroptose^{144,198}. La combinaison de l'induction de p53 et de ce stress oxydatif résulte en une induction de ferroptose encore plus efficace¹⁴⁴.

Plusieurs inhibiteurs de la ferroptose ont aussi été découverts. Parmi ceux-ci, on retrouve des inhibiteurs du métabolisme des lipides, qui empêchent l'incorporation des PUFA en phospholipides membranaires. Ceux-ci comprennent des inhibiteurs des protéines ACSL4 (*Acyl-CoA Synthetase Long Chain Family Member 4*) et LPCAT3 (*Lysophosphatidylcholine Acyltransferase 3*), qui sont impliqués dans le métabolisme des PUFA-PE^{192,199}. Les inhibiteurs de la peroxydation des lipides peuvent évidemment bloquer la ferroptose. Ceux-ci incluent les inhibiteurs des enzymes LOX par exemple¹⁹⁰, ainsi que les ferostatines et les liproxstatines²⁰⁰. Les inhibiteurs du métabolisme du fer, ainsi que les chélateurs de fer représentent une troisième catégorie (deferroxamine, ciclopirox)¹⁸³. On retrouve aussi des inhibiteurs de la glutaminolyse¹⁸⁸, des antioxydants lipophiliques (vitamine E, BHT, BHA)¹⁹¹ et le cycloheximide (qui supprime la ferroptose induite par inhibition du Système X_C^-)²⁰¹.

Certains marqueurs ont été définis pour caractériser des cellules affectées par la ferroptose. Le premier consiste à mesurer la peroxydation des lipides grâce au C-11-BODIPY et au Liperfluo, qui sont des senseurs de ROS lipophiliques¹⁸⁴. La spectrométrie de masse

couplée à la chromatographie liquide permet de détecter la modification de lipides spécifiques. Ensuite, la mesure des niveaux de fer au sein des cellules peut servir de marqueur, des concentrations plus élevées étant associées à la ferroptose. Enfin, l'abondance et l'activité de la protéine GPX4 est un élément clé de la ferroptose. Il est possible de mesurer l'activité de cette enzyme en mesurant la réduction de la phosphatidylcholine hydroperoxyde par spectrométrie de masse²⁰². À noter qu'il est aussi important de contrôler rigoureusement les conditions de culture cellulaire lors de l'étude de la ferroptose puisqu'elle est liée à de nombreux changements métaboliques¹⁸¹. Le phénotype des cellules ferroptotiques est différent de celui des autres morts cellulaires programmées. Les cellules ne montrent pas de changements morphologiques importants à part des mitochondries endommagées et plus petites, observables par microscopie électronique^{184,201,203}. Quant à eux, les noyaux de ces cellules restent intacts et il n'y a pas de formation de corps apoptotiques^{182,204}.

La ferroptose étant un domaine en émergence, il n'existe pas encore de consensus sur la définition moléculaire précise de la ferroptose. Un article de revue récent propose toutefois des critères permettant de définir une cellule ferroptotique¹⁸¹. La mort cellulaire, pour être appelée ferroptose, doit être inhibée à la fois par un chélateur de fer et un antioxydant lipophile. Elle doit être accompagnée d'une accumulation de lipides hydroperoxydés. La ferroptose induite par des inhibiteurs du Système X_c^- doit être inhibée par le β -mercaptoéthanol, qui réduit la cystine extracellulaire en cystéine¹⁸⁴. Cette dernière peut être importée par d'autres mécanismes et devrait donc contourner la mort cellulaire. Ce type de ferroptose devrait aussi être accompagné d'une déplétion de glutathion¹⁸¹. Enfin, quelques marqueurs d'expression peuvent être mesurés : les niveaux d'ARN messager de *CHAC1* (*Chac Glutathione Specific Gamma-Glutamylcyclotransferase 1*) et *PTGS2* (*Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2*) devraient augmenter, ainsi que les niveaux protéiques d'ACSL4, mais il est probable que ces marqueurs ne soient pas valides dans tous les contextes¹⁸¹.

1.5.4 Ferroptose et pathologies

Plusieurs maladies dégénératives semblent être reliées à l'incapacité de réparer des quantités abondantes de lipides oxydés, ce qui cause la mort des cellules. Par contre, la

ferroptose semble avoir des fonctions de suppresseur tumoral et très peu d'études se sont penchées sur le rôle physiologique normal de ce mécanisme.

La mort cellulaire provoquée par des lésions ischémiques a longtemps été catégorisée comme de l'apoptose. Cependant, depuis la découverte de nouveaux types de mort cellulaire, des études ont montré que la nécroptose avait une importance capitale dans cette pathologie dans le cœur et le foie¹⁸¹. Plus récemment, il a été montré que la ferroptose pourrait aussi y jouer un rôle important dans certains modèles²⁰⁵.

Il est intéressant de souligner que les inhibiteurs de ferroptose sont efficaces pour protéger les souris de plusieurs maladies neurodégénératives telles l'Alzheimer, le Parkinson, la maladie d'Huntington ainsi que d'autres formes de neurodégénération et de dommages au cerveau¹⁸¹. De plus, la délétion inductible de GPX4 dans le cerveau des souris adultes cause une perte de neurones de l'hippocampe avec une astrogliose, qui sont des caractéristiques de la maladie d'Alzheimer²⁰⁶. Il y a donc beaucoup d'opportunités thérapeutiques pour les inhibiteurs de ferroptose dans le traitement des maladies neurodégénératives qui devraient être exploitées dans les prochaines années, notamment puisqu'il est connu que les niveaux de fer présents dans le cerveau augmentent avec l'âge et dans les maladies dégénératives¹⁸¹.

D'autre part, les cellules cancéreuses sont sensibles à des variations du métabolisme des thiols et le stress oxydatif causé par de hauts niveaux de fer est associé à la carcinogénèse²⁰⁷. Les inhibiteurs de l'import de la cystine (système X_c^-) induisent un arrêt de croissance dans plusieurs types de tumeurs, or ces inhibiteurs induisent la ferroptose²⁰⁷⁻²⁰⁹. La déplétion directe de cystine, l'utilisation d'agents qui se conjuguent au glutathion ou encore l'inhibition de la synthèse du glutathion sont tous capables d'induire des arrêts de croissance et de la mort cellulaire ressemblant à la ferroptose²¹⁰. Cette dernière est caractérisée par des niveaux élevés d'espèces réactives de l'oxygène et elle est empêchée par des antioxydants.

Les composés inducteurs de ferroptose ont aussi montré de bons résultats *in vivo*. Ils permettent la diminution de la taille des tumeurs dans des xénogreffes de souris²⁰². Des résultats similaires ont été obtenus avec des nanoparticules qui induisent la ferroptose²¹¹. Le principal suppresseur tumoral de la cellule, p53, a aussi été relié à ce mécanisme de mort cellulaire et il semblerait que ses effets de suppression tumorale reposent en partie sur ce processus

cellulaire¹⁴⁴. CD44v, un marqueur de cellules souches cancéreuses, s'associe avec le transporteur de cystine/glutamate afin de le stabiliser²⁰⁷. CD44v pourrait être un biomarqueur intéressant, indicateur de tumeurs sensibles à la mort induite par la ferroptose²⁰⁷. Un groupe a aussi montré que les cellules cancéreuses hautement mésenchymateuses, qui sont généralement très résistantes aux thérapies, acquièrent pour ce faire des mécanismes de résistance à la ferroptose. Ainsi, de nombreuses cellules cancéreuses développent une dépendance envers GPX4, et son inhibition provoque la mort des cellules par ferroptose, ouvrant beaucoup d'avenues thérapeutiques²¹².

1.6 La protéine SOCS1 et la voie JAK/STAT

1.6.1 La voie de signalisation JAK/STAT

La voie JAK/STAT est une très importante voie de signalisation de réponse aux cytokines. Cette voie peut induire des réponses cellulaires très diverses telles la prolifération cellulaire, la différenciation, la migration des cellules, l'apoptose ou encore la survie cellulaire, tout dépendant du signal instigateur, du tissu et du contexte cellulaire²¹³. Les cytokines sont des médiateurs très importants de la signalisation cellulaire. Ce sont de petites molécules solubles produites par une cellule mais qui agissent majoritairement sur une autre cellule de l'organisme²¹⁴. Certaines cytokines agissent en tant que facteurs de transcription, mais la majorité d'entre elles agissent comme ligand extracellulaire envers des récepteurs spécifiques²¹⁴. Toutes les cellules, à l'exception des globules rouges, peuvent produire des cytokines, qui sont des protéines non structurées. Leur fonction principale est la régulation du système immunitaire : elles contrôlent la prolifération, la différenciation et l'activité de diverses cellules sanguines. Les cytokines regroupent les interférons (IFN), les chimiokines (CXCL ou CCL), les interleukines (IL), les facteurs de croissance mésenchymaux, les adipokines et la famille TNF (*Tumor Necrosis Factor*). Elles sont souvent regroupées en familles selon leur fonction, par exemple si elles sont pro-inflammatoires, anti-inflammatoires, ou encore si elles agissent comme facteurs de croissance²¹⁴. Les cytokines pro-inflammatoires regroupent les familles IL1, IL6, TNF α , IL17, et les Interférons (IFN) de type I, II et III, alors que les cytokines anti-inflammatoires regroupent les familles IL10 et IL12²¹⁵. Les effets médiés par ces molécules sont donc très divers et touchent pratiquement à tous les aspects de la biologie cellulaire.

La voie JAK/STAT est activée par la liaison de cytokines à certains de leurs récepteurs. Cette liaison cause une dimérisation ou une multimérisation des récepteurs et l'activation des protéines JAKs (*Janus Kinase*), qui sont constitutivement liées aux récepteurs, par phosphorylation croisée²¹⁶. En plus de pouvoir s'activer entre elles, les JAKs vont phosphoryler des tyrosines de la queue cytoplasmique des récepteurs, ce qui génère des sites de liaison pour les protéines STATs (*Signal Transducer and Activator of Transcription*). Les STATs vont se lier à ces tyrosines phosphorylées via leur domaine SH2 (*SRC Homology 2*) et être phosphorylés par les JAKs^{216,217}. La phosphorylation des STATs diminue leur affinité de liaison avec le récepteur, mais leur permet de former des dimères qui vont migrer au noyau afin d'agir à titre de facteurs de transcription²¹⁶. La majorité des cytokines cause une homodimérisation des STATs, mais certains cas particuliers favorisent la formation d'hétérodimères²¹⁶. Les homodimères se lient à un site consensus sur l'ADN nommé GAS (*γ-activated sequence*), alors que certains hétérodimères vont interagir avec un cofacteur comme IRF9 (*DNA binding Interferon Regulatory Protein 9*) et se lier à un autre type d'élément de réponse dans l'ADN²¹⁶. Il existe 4 JAKs (JAK1, JAK2, JAK3, TYK2) et 7 STATs (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b et STAT6) chez les mammifères²¹⁸. Les différents

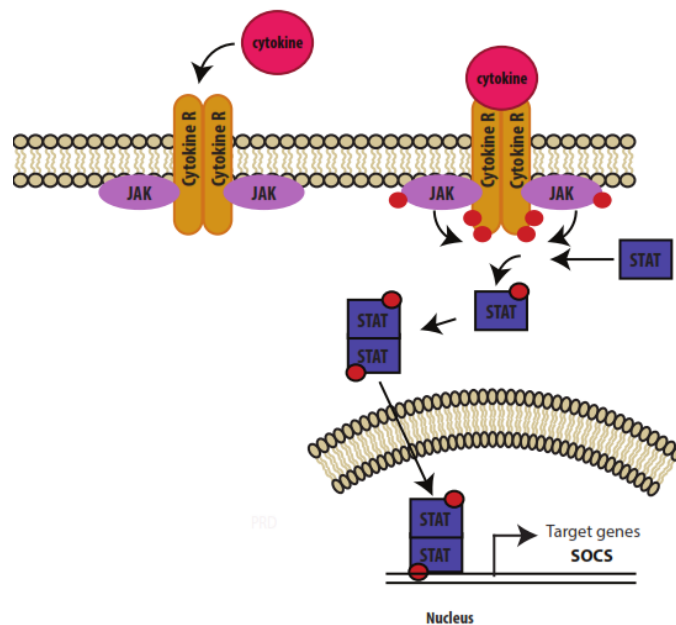


Figure 1.7 La voie de signalisation JAK/STAT

couples récepteurs-cytokines peuvent activer préférentiellement certains des membres de la famille au détriment de d'autres, mais c'est une signalisation très complexe vu le nombre de combinaisons possibles.

La dernière étape de cette voie de signalisation est la régulation négative. En effet, il a été montré qu'une activation constitutive de cette voie de signalisation mène à plusieurs cancers, maladies inflammatoires et autoimmunes, notamment par la mutation dans les gènes des STATs et des JAKs. L'inhibition complète de la voie, elle, peut mener à des maladies d'immunodéficience²¹⁸. Ainsi, un équilibre très fin entre l'activation et l'inhibition de la voie est requis afin de maintenir l'homéostasie. La famille de protéines SOCS (*Suppressors of Cytokine Signaling*) joue ce rôle de rétroinhibition de la voie, ainsi que des protéines phosphatases ciblant les STATs et les protéines PIAS qui inhibent les STATs dans le noyau²¹⁶.

1.6.2 La famille des SOCS – structure et fonction

La famille des SOCS est composée de 8 membres : SOCS1 à SOCS7 et CIS (*Cytokine Inducible SH2-containing protein*). Ces protéines sont induites par la voie JAK/STAT car elles font partie des gènes cibles des STATs. Il a été montré que les SOCS peuvent être induits par plus de trente cytokines. La première de ces protéines à être découverte fut CIS, en tant que protéine induite en réponse à l'EPO (érythropoïétine)²¹⁹. SOCS1 fut ensuite identifiée par trois groupes simultanément²²⁰⁻²²². Bien que l'inhibition de la voie JAK/STAT constitue leur fonction canonique, les SOCS ont des fonctions supplémentaires dans plusieurs processus immunologiques, l'athérosclérose, le métabolisme et le cancer²²³. Il a aussi été démontré que SOCS1 et SOCS3 peuvent inhiber d'autres voies de signalisation, telles les voies RAS/ERK et PI3K^{224,225}.

Les SOCS peuvent inhiber la voie JAK/STAT par différents mécanismes : ils peuvent tout d'abord lier certaines tyrosines phosphorylées sur les récepteurs de cytokines, compétitionnant par le fait même avec les STATs qui se lient aux mêmes sites. Certains membres des SOCS peuvent directement inhiber l'activité kinase des JAKs (SOCS1 et SOCS3) et finalement, les SOCS peuvent induire la dégradation protéasomique de leurs substrats en les marquant d'une modification post-traductionnelle, l'ubiquitination.

Les SOCS sont composés de trois domaines principaux : un domaine SH2, dont la fonction canonique est la liaison à des tyrosines phosphorylées, un domaine N-terminal variable et un SOCS-box, qui permet le recrutement de la machinerie d'ubiquitination. En plus de ces domaines, un plus petit domaine, situé en N-terminal du domaine SH2 et nommé sous-domaine SH2 étendu ou ESS (*Extended SH2 Subdomain*) est nécessaire à la liaison des tyrosines phosphorylées^{226,227}.

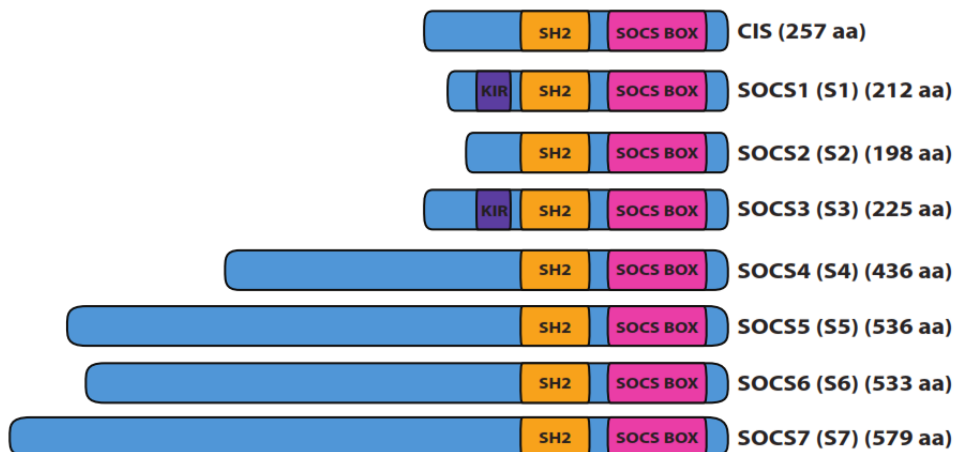


Figure 1.8 Domaines fonctionnels des protéines de la famille SOCS

Les domaines SH2 sont des domaines versatiles, retrouvés dans de nombreuses protéines, environ 106 chez l'humain²²⁸, et dont la structure est très bien conservée. Toutefois, malgré cette conformité structurale, on retrouve une spécificité de liaison différente dans chaque cas, qui est médiée par la reconnaissance spécifique de 3 à 5 acides aminés en C-terminal de la tyrosine phosphorylée²²⁹. Les domaines SH2 sont composés d'environ 100 acides aminés arrangés structurellement en deux hélices alpha et sept feuillets bêta arrangés dans l'ordre suivant : $\beta\alpha\beta\beta\beta\beta\alpha\beta$ ²³⁰. Bien que SOCS3 et SOCS1 soient très similaires, leurs domaines SH2 montrent des spécificités différentes : SOCS1 lie JAK2 via son domaine SH2 alors que SOCS3 va préférentiellement se lier aux récepteurs via ce même domaine²³¹. Il a été montré que c'est la tyrosine 1007 de JAK2 qui est liée par SOCS1 lorsqu'elle est phosphorylée²²⁶. Lors du remplacement du domaine SH2 de SOCS1 par celui de SOCS3, SOCS1 perd son pouvoir d'inhibition sur la signalisation par LIF²³². De plus, la mutation de l'arginine (R105) très conservée du motif FLVRES de SOCS1 résulte en une perte de ses activités inhibitrices²²⁶, alors

que la même mutation au sein de SOCS3 a peu d'effet²³³. La mutation de ce résidu résulte en une perte de liaison de la phosphotyrosine pour la plupart des domaines SH2²³³.

Le domaine SOCS-box est un domaine retrouvé dans plus de 80 protéines humaines²³⁴. C'est ce dernier qui confère l'activité E3 ubiquitine ligase aux protéines SOCS. L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle dont la conséquence la plus connue est la dégradation protéasomique. Cette modification nécessite l'action d'une protéine E1 qui active l'ubiquitine, d'une enzyme E2 qui effectue la conjugaison de l'ubiquitine et enfin d'une protéine ou d'un complexe E3 ligase qui définit la spécificité de la conjugaison de l'ubiquitine à une cible²³⁴. Les protéines de la famille SOCS ainsi que VHL (*Von Hippel Lindau tumor suppressor protein*) recrutent des enzymes afin de former un complexe qui agit en tant qu'E3 ligase²³⁴. La partie SOCS du complexe permet la liaison du substrat et donc la spécificité de la signalisation²³⁴. Le domaine SOCS box contient des sous-domaines de liaison aux cofacteurs nécessaires à la formation du complexe E3-ubiquitine ligase. Il contient un domaine BC-Box, qui permet la liaison des SOCS avec les élongines B et C et une Cul-Box qui permet le recrutement de culline 5²³⁵. Une fois ces trois protéines liées au SOCS-Box, le recrutement de RBX2 (*Ring finger domain only protein*) peut s'effectuer, permettant le recrutement de la protéine E2^{235,236}. La structure de différentes protéines SOCS ayant été résolue, leur comparaison a permis de comprendre que malgré la structure quasi-identique de la portion SOCS-Box et de son interaction avec les élongines, il existe des différences structurales majeures. En effet, la boîte SOCS de SOCS2 adopte une conformation très différente vis-à-vis le positionnement du domaine SH2 que celui de SOCS4²³⁷. En analysant la structure de SOCS2, il semble que le domaine C-terminal soit enfoui au cœur de la structure, permettant la stabilisation d'une interaction entre les domaines SH2 et SOCS-Box²³⁷. Étant donné les similitudes de séquence, cette conformation serait probablement celle adoptée par SOCS1 et SOCS3. Cela permet d'exposer le domaine ESS et par le fait même de rendre accessible le domaine KIR de SOCS1 et SOCS3²³⁷. Au contraire, la structure de SOCS4, qui possède une extension C-terminale tout comme SOCS5 à 7, démontre que son domaine ESS N-terminal est enfoui au sein de la structure à l'interface entre le domaine SH2 et le domaine SOCS-Box²³⁸.

Il a aussi été montré que la liaison des élongines B et C à la boîte SOCS permet la stabilisation des SOCS²³⁹. L'affinité de SOCS1 et SOCS3 pour la culline5 est respectivement

100 fois et 10 fois plus faible que celle des autres SOCS, suggérant que leur mécanisme d'action est moins dépendant de l'ubiquitination²⁴⁰. L'importance de la boîte SOCS a été montrée par des modèles génétiques murins, où la délétion de ce domaine causait l'apparition de maladies inflammatoires mortelles causées par une dérégulation des niveaux d'IFN γ ^{241,242}. Toutefois, le phénotype est moins sévère que la délétion complète du gène.

En plus de ces trois domaines conservés dans toute la famille, il existe une région d'inhibition des kinases ou KIR (*Kinase Inhibitory Region*) que ne possèdent que SOCS1 et SOCS3. C'est un petit domaine de douze acides aminés situés juste en amont du domaine SH2^{226,227}. Cette région se lie dans la poche catalytique des JAKs et empêche la liaison de ses autres substrats, sans inhiber l'activité kinase de la protéine^{243,244}.

Outre les domaines conservés, les domaines N-terminaux des SOCS sont très variables. Toutefois, la comparaison des séquences primaires d'acides aminés et de la structure génomique de chacun des membres a montré qu'il existait des « paires » de SOCS qui sont davantage similaires entre eux. Notamment, les SOCS 1 à 3 et CIS ont de courtes séquences N-terminales (environ 50 acides aminés) alors que les SOCS4 à 7 ont de très longs domaines N-terminaux (jusqu'à 380 acides aminés). Ces paires vont comme suit : CIS/SOCS2, SOCS1/SOCS3, SOCS4/SOCS5 et SOCS6/SOCS7.

1.6.3 SOCS1 et sa biologie

Inflammation

Afin de mieux comprendre les fonctions de SOCS1, plusieurs modèles de souris transgéniques ont été générés au courant des dernières années. Les souris SOCS1^{-/-} meurent environ trois semaines après la naissance, à cause d'une hypersignalisation par l'IFN γ . En effet, cela se traduit par une activation des cellules T périphériques, la nécrose du foie et l'infiltration de macrophages dans les organes vitaux²⁴⁵. La dépendance à l'interféron fut montrée avec des souris nulles pour les deux gènes, permettant la compensation du phénotype et la survie des souris²⁴⁶. Une souris nulle pour les gènes de *Socs1* et *Rag2* possède le même phénotype de survie, suggérant que les lymphocytes sont importants pour l'action de SOCS1²⁴⁵. Cela fut par la suite confirmé par la génération d'une souris où le gène de *Socs1* est supprimé spécifiquement

dans les lymphocytes T. Ces souris développent plusieurs maladies inflammatoires caractérisées par de hauts niveaux d'IFN γ ²⁴⁷.

SOCS1 peut réguler l'inflammation par l'intermédiaire des cellules immunitaires innées et des cellules non immunitaires. Cela fut montré par la génération de souris où le gène de *SOCS1* est supprimé dans le foie : les hépatocytes dans ce modèle possèdent des niveaux élevés de Concavoline A, menant à des hépatites causées par une augmentation de l'activité pro-apoptotique des voies de signalisation STAT1 et JNK (*Jun terminal Kinase*)²⁴⁸. SOCS1 régule donc normalement ces voies de signalisation et son absence cause l'apparition de maladies inflammatoires. Un autre modèle, dans lequel SOCS1 a cette fois été supprimé dans les cellules immunitaires NKT (*Natural Killer T cells*) montre un phénotype similaire²⁴⁹. De plus, l'absence de SOCS1 cause un déséquilibre dans le nombre de cellules présentes : un sous type de cellules NK (iNKT, *invariant NKT*) diminue drastiquement alors qu'un autre sous-type (NKT de type II) voit ses niveaux augmenter²⁴⁹. Le mécanisme par lequel SOCS1 contrôle cela n'est toutefois pas encore connu.

La délétion spécifique de SOCS1 dans les macrophages génère une réponse exagérée au LPS (*Lipopolysaccharide*), un composant des membranes bactériennes causant de très nombreux effets sur le système immunitaire²⁵⁰⁻²⁵². Ces souris étaient plus promptes à mourir des effets du LPS que les souris où SOCS1 était présent. Il a aussi été montré que SOCS1 est activé en réponse au LPS et contrôle négativement la signalisation induite par cet agent²⁵⁰.

Finalement, la délétion spécifique de SOCS1 dans les cellules dendritiques (DC, *Dendritic Cells*) résulte en une hyper activation des cellules T auxiliaires Th1, l'apparition de maladies auto-immunes telles le lupus, et une augmentation de l'immunité anti-tumorale^{253,254}.

Réponse bactérienne et virale

SOCS1 est fortement activé en réponse à plusieurs parasites, bactéries ou virus tels *M. Tuberculosis*²⁵⁵, *Toxoplasma Gondii*²⁵⁶, le virus de l'hépatite C²⁵⁷ et le virus de l'Ebola²⁵⁸. Dans tous ces cas, l'activation de SOCS1 dans les macrophages semble inhiber IL-12 via les TLR (*Toll-Like Receptors*) et ainsi la signalisation de l'IFN γ , ce qui permet à ces infections d'échapper au système immunitaire²⁵⁵⁻²⁵⁸. Étant donné qu'il est estimé qu'environ 20% des

cancers sont initiés ou exacerbés par l'inflammation, tout porte à croire que SOCS1 risque d'être impliqué dans la tumorigenèse.

1.6.4 Régulation de SOCS1

Régulation post-traductionnelle

SOCS1 est la cible de quelques modifications post-traductionnelles, notamment la phosphorylation. Il a été proposé que les SOCS en général pourraient être la cible de kinases oncogéniques et que celles-ci pourraient empêcher leur activité de suppresseur tumoral en les phosphorylant²⁵⁹. Par exemple, la protéine de fusion BCR-ABL, qui produit une protéine oncogénique résultant d'une translocation chromosomique à l'origine des lymphomes myéloïdes chroniques (CML, *Chronic Myeloid Leukemia*), peut phosphoryler SOCS1 sur deux tyrosines en C-terminal de sa séquence (Y155 et Y204)²⁶⁰. Cette étude n'a toutefois pas montré la phosphorylation directe de ces résidus, les auteurs ayant seulement eu recours à des mutants de phosphorylation. Cette phosphorylation cause une perte de fonction de l'inhibition de la voie JAK/STAT. Ensuite, la phosphorylation de SOCS1 favorisée par v-Abl empêche son interaction avec l'elongine C, ce qui entrave l'ubiquitination de ses cibles²⁶¹. Cette phosphorylation ne s'effectue pas sur des tyrosines, ce qui suggère que v-Abl active d'autres kinases qui seront responsables à leur tour de phosphoryler SOCS1. Il a été proposé que ces kinases fassent partie de la famille des PIM²⁵⁹. Une étude indépendante a montré que les kinases PIM1 et PIM2 pouvaient phosphoryler SOCS1, ce qui avait pour effet de stabiliser la protéine²⁶².

Régulation de la stabilité de SOCS1

La demi-vie de SOCS1 est courte, soit environ deux heures. Non seulement la protéine n'est pas très stable, mais elle est peu exprimée dans presque tous les types cellulaires. Il semble que la protéine SOCS1 soit dégradée par un mécanisme protéasome-dépendant^{263,264}, et que l'interaction avec les élongines B et C ainsi que la phosphorylation favorisent sa stabilisation.

Une étude a aussi montré que SOCS1 est régulé au niveau de l'initiation de la traduction²⁶⁵. Il est relativement facile de détecter les niveaux endogènes de l'ARN messager de SOCS1, mais il en va tout autrement pour ses niveaux protéiques. La région en 5' non traduite (5' UTR, *Untranslated Region*) du gène de *SOCS1* semble responsable d'une régulation

de la traduction de la protéine²⁶⁵. La surexpression du cDNA de la séquence codante de *SOCS1* a été comparée à la surexpression du cDNA complet, comprenant les régions non traduites. La surexpression de la séquence codante seule provoquait de bien plus hauts niveaux de la protéine, estimés à trente fois supérieurs. Par délétion des UTR, il fut ensuite déterminé que c'est celui situé en 5' qui permet cette régulation. La présence d'un cadre de lecture ouvert supplémentaire situé en amont et contenant deux codons AUG et un codon STOP ainsi que d'une séquence riche en GC peuvent expliquer ces résultats. Cela fut confirmé par la nécessité de muter les deux codons initiateurs afin de désactiver la répression traductionnelle.²⁶⁵

Régulation transcriptionnelle

Les facteurs de transcription contrôlant l'expression du gène de *SOCS1* sont bien sûr classiquement les diverses protéines STAT. Toutefois, certains autres facteurs de transcription peuvent jouer ce rôle pour *SOCS1*. Il a été montré qu'en réponse à l'IFN γ , plusieurs facteurs de transcription pouvaient contrôler l'expression de *SOCS1*. Ces facteurs semblent varier selon le type cellulaire utilisé : IRF1 (*Interferon Regulatory Factor 1*) peut activer sa transcription dans des fibroblastes murins et des kératinocytes humains et SP2 peut faire la même chose dans des cellules HaCat humaines²⁶⁶⁻²⁶⁸. Le promoteur de *SOCS1* comprend des séquences GAS qui, comme mentionné précédemment, sont des sites de liaison des STAT comme STAT1. Toutefois, en réponse à l'interféron il a été montré que STAT1 ne semble pas responsable de l'induction de *SOCS1*. Par contre, STAT1 induit la transcription d'*IRF1*²⁶⁹, qui subséquemment se lie au promoteur de *SOCS1*. Des études ont cependant démontré la liaison de STAT6 à ces éléments du promoteur en réponse à l'IL4^{270,271}, et la liaison de STAT5²⁷² en réponse à l'EPO. Au niveau basal, il semble que ce soit Sp1 qui contrôle la transcription de *SOCS1*^{266,268}. En réponse au LPS, le rôle du facteur de transcription EGR1 (*Early Growth Response 1*) a été mis à jour. Il lie le promoteur de *SOCS1* et semble nécessaire à la transcription du gène²⁷³. Finalement, une étude a montré que *SOCS1* est une cible transcriptionnelle directe de Hh/GLI dans les kératinocytes et les cellules de médulloblastome²⁷⁴. Deux facteurs de transcription effectuent aussi la répression de la transcription du gène : GFI-1b (*Growth Factor Independence 1b*) et KLF4 (*Krüppel Like Factor 4*)²⁶⁸.

1.6.5 SOCS1 en tant que suppresseur tumoral

SOCS1 est considéré comme un suppresseur tumoral puisqu'il est retrouvé muté fréquemment dans certains cancers hématopoïétiques particuliers comme les lymphomes Hodgkiniens²⁷⁵⁻²⁷⁷, les lymphomes médiastinaux primitifs à grandes cellules B²⁷⁸ et les lymphomes B diffus à larges cellules (DLBCL, *Diffuse Large B Cell Lymphoma*)²⁷⁹, où il résulte une signalisation plus active de STAT5 et STAT6. Mais surtout, l'expression de SOCS1 est souvent inhibée à cause de l'hyperméthylation de son promoteur dans de nombreux cancers dont les leucémies myéloïdes aiguës (AML, *Acute Myeloid Leukaemia*)^{280,281}, les leucémies myéloïdes chroniques (CML, *Chronic Myeloid Leukaemia*)²⁸², dans 61% des cancers cervicaux²⁸³, 45% des carcinomes épidermoïdes de l'œsophage²⁸⁴, les carcinomes hépatocellulaires, les glioblastomes, les cancers du sein et de l'ovaire. Des cancers colorectaux apparaissent aussi de façon spontanée dans les souris nulles pour SOCS1.

Il existe un autre mécanisme par lequel l'expression de SOCS1 est diminuée dans les tumeurs. Il a été montré que plusieurs micro-ARNs ayant pour cible *SOCS1* sont augmentés dans plusieurs types de cancers. Les miRNAs sont de petits ARNs non-codants d'environ 22 nucléotides impliqués dans la régulation de l'expression génique²⁸⁵. Ils peuvent lier leurs cibles par complémentarité de séquence et soit bloquer la traduction de l'ARN messager ciblé, soit provoquer sa dégradation²⁸⁵. Les deux miARNs les plus importants qui ciblent *SOCS1* semblent être miR155 et miR19. Quelques autres miARNs ont aussi été identifiés comme ciblant *SOCS1* dans un cadre oncogénique : miR210-3p et miR30d dans le cancer de la prostate^{286,287}, et miR572 dans le cancer de l'ovaire²⁸⁸. De nombreuses études ont montré que SOCS1 est une cible directe de miR155 dans un contexte de leucémies²⁸⁹, de lymphomes^{290,291}, de myélome multiple^{292,293}, de cancer du pancréas²⁹⁴, de cancer du larynx²⁹⁵ et de cancer du sein²⁹⁶. De même, il a été montré par plusieurs groupes que *SOCS1* est une cible de miR19a et b dans les myélomes^{293,297}, le cancer du poumon²⁹⁸, le carcinome verruqueux²⁹⁹ et le cancer de l'estomac³⁰⁰. Dans la plupart des cas, l'expression de ces miARN est augmentée dans le cancer, ce qui correspond avec une diminution des niveaux de l'ARN messager et de la protéine SOCS1. La surexpression de SOCS1 dans ces modèles permet généralement d'inhiber la croissance et même le potentiel métastatique des cellules cancéreuses, *in vitro* et *in vivo*. Les miARNs ciblent aussi SOCS1 dans des contextes d'inflammation, et ceux-ci peuvent avoir des répercussions

directes sur l'initiation des cancers, ou encore sur l'immunité anti-tumorale. Une étude a montré que la délétion de miR155 chez les souris résulte en une résistance à l'induction de la carcinogenèse chimique et au développement de diverses tumeurs implantées³⁰¹. L'étude a montré que miR155 contrôle la quantité de cellules suppressives d'origine myéloïde, qui ont la capacité de supprimer la réponse anti-tumorale médiée par les lymphocytes T. Ce groupe a montré que la suppression de SOCS1 par ce micro ARN était un des mécanismes par lesquels miR155 inhibe l'immunité anti-tumorale³⁰¹. Tous ces résultats soutiennent encore une fois la théorie stipulant que SOCS1 agit en tant que suppresseur tumoral.

Au niveau moléculaire, il est déjà bien connu que SOCS1 réprime la voie JAK/STAT, qui promeut une signalisation pro-croissance. Toutefois, des mécanismes additionnels non canoniques de SOCS1 pourraient aussi expliquer sa fonction de suppresseur tumoral. Tout d'abord, il a été montré que SOCS1 effectue une régulation nucléaire du suppresseur tumoral p53 et inhibe NFκB^{302,303}. En effet, SOCS1 peut se lier directement à p53 ainsi qu'à ses kinases, ATM et ATR, et permettre sa phosphorylation en sérine 15³⁰², ce qui a pour conséquence l'activation de p53. Ces résultats furent obtenus dans le cadre de recherches sur la sénescence cellulaire induite par l'oncogène STAT5a, où l'expression de SOCS1 est grandement augmentée. Ce mécanisme est nécessaire pour l'induction de la sénescence cellulaire en réponse à cet oncogène³⁰². De plus, la surexpression de SOCS1 dans des cellules normales humaines est suffisante pour induire une sénescence cellulaire dépendante de p53³⁰². Ces résultats furent confirmés par d'autres études, notamment en montrant que miR155 et miR19 régulent négativement p53 par l'entremise de SOCS1^{290,293}. Un autre groupe a montré que SOCS1 permet l'activation de p53 et l'induction d'apoptose dans des cellules de cancer colorectal³⁰⁴. Finalement, des études ont montré que la surexpression de SOCS1 dans des cellules de mélanome et de cancer du poumon induisait l'apoptose, ce qui était associé à une augmentation de l'activation de p53 en plus de corrélérer avec une diminution de la voie JAK/STAT^{305,306}.

SOCS1 peut aussi contrôler la protéine p21, généralement considérée comme un suppresseur tumoral. Toutefois, p21 peut exercer des fonctions oncogéniques lorsqu'elle se retrouve dans le cytoplasme au lieu du noyau suivant sa phosphorylation sur la thréonine 146 et la sérine 145 par AKT³⁰⁷. Dans les carcinomes hépatocellulaires, il est déjà connu que p21 est surexprimé. Ses niveaux corrélaient aussi avec la progression de la maladie chez les patients

atteints de maladie chronique du foie³⁰⁸. SOCS1 peut inhiber l'expression et l'activité oncogénique de p21 dans les hépatocytes en interagissant directement avec la protéine, ce qui favorise son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome³⁰⁹.

Enfin, SOCS1 a maintes fois été montré comme un inhibiteur de la signalisation par les récepteurs à tyrosine kinase. Ce fut montré pour la première fois dans une expérience de double-hybride chez la levure, où SOCS1 fut identifié comme un partenaire d'interaction de la tyrosine kinase KIT. SOCS1 est capable d'inhiber la signalisation par SCF (*Stem Cell Factor/SCF receptor*) qui induit la mitogenèse des cellules hématopoïétiques. Suivirent ensuite l'interaction de SOCS1 avec le récepteur CSF1, les récepteurs de FLT3L, de l'EGF (*Epidermal Growth Factor*), du FGF (*Fibroblast Growth Factor*) et de PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*). La signalisation par ces récepteurs induit fréquemment l'expression de SOCS1, qui interagit préférentiellement avec les récepteurs activés via la liaison de tyrosines phosphorylées par le domaine SH2. Il est ensuite stipulé que SOCS1 favorise l'ubiquitination des récepteurs et leur dégradation. Toutefois, encore bien peu d'expériences ont réussi à démontrer cela concrètement : les exemples clairement définis comprennent l'ubiquitination de JAK2, de la protéine oncogénique TEL-JAK2, de VAV, du récepteur de GM-CSF et les substrats du récepteur de l'insuline, bien que les preuves soient basées sur la surexpression^{236,310-312}. Dans le cas des récepteurs à l'insuline, SOCS1 ne cible non pas le récepteur mais des effecteurs situés en aval, les protéines IRS1 et IRS2 (*Insulin Receptor Substrate*), par le même mécanisme³¹³. SOCS1 est de plus un inhibiteur de la signalisation du récepteur MET (*Mesenchymal Epithelial Transition*) dans les hépatocytes³¹⁴. La surexpression de SOCS1 atténue la prolifération, la migration et l'invasion de cellules de carcinomes hépatocellulaire^{314,315}. Les cellules exprimant SOCS1 ont aussi un plus faible potentiel d'induction de tumeurs *in vivo* et celles-ci montrent une perte d'expression de MET. SOCS1 accomplit ces effets par l'ubiquitination du récepteur et sa dégradation subséquente³¹⁵.

1.6.6 Fonctions oncogéniques de SOCS1

Bien que SOCS1 soit fréquemment, comme nous venons de le décrire, inactivé dans divers cancers, son expression peut aussi y être augmentée. En effet, dans les cancers du sein³¹⁶, dans plusieurs types de cancers hématopoïétiques³¹⁷⁻³²⁰, dans des cellules de médulloblastome²⁷⁴

et dans le cancer colorectal³²¹, il a été montré que SOCS1 est surexprimé. SOCS1 semble aussi jouer un rôle d'oncogène dans les mélanomes, où les niveaux de l'ARNm et de la protéine corrélaient avec le potentiel d'invasion des tumeurs, mais aussi avec le stade du cancer^{322,323}. Les plus hauts niveaux d'expression sont retrouvés dans les métastases³²⁴. La diminution des niveaux de SOCS1 dans des cellules de mélanome résulte en une inhibition de la prolifération dans un cas³²⁵, et dans une autre étude de la prolifération, de la motilité et des capacités d'invasion des cellules³²⁶. Toutefois, certains résultats opposés ont été obtenus dans une autre lignée de mélanomes, suggérant que l'effet de SOCS1 est probablement contexte-dépendant³⁰⁵.

Une des fonctions oncogéniques bien connues de SOCS1 est son action inhibitrice des effets anti-tumoraux de la signalisation de l'IFN γ . Cette signalisation permet normalement d'augmenter l'immunité anti-tumorale, ainsi que d'induire l'apoptose et d'inhiber la prolifération dans les cellules tumorales³²⁷⁻³³². Enfin, il a été montré que SOCS1 favorisait l'activation de la voie MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*) par FGFR3 et que SOCS1 était une cible transcriptionnelle directe du facteur de transcription oncogénique HH/Gli dans les médulloblastomes. La diminution des niveaux de SOCS1 dans ces cellules de médulloblastome inhibait la formation de colonies³³².

1.7 La famille des kinases SRC

1.7.1 Généralités

La découverte de SRC représente un important tournant scientifique car c'est le premier oncogène à être découvert. Des études de Peyton Rous ont permis de découvrir qu'un type de cancer pouvait être transmis d'un poulet à un autre par l'intermédiaire d'extraits des tumeurs (exemptes de cellules)³³³. Cela impliquait la présence d'un agent de transmission, qui fut identifié comme étant un virus (RSV, *Rous Sarcoma Virus*) porteur d'un oncogène viral. Ce dernier fut nommé v-SRC, mais est dérivé d'un oncogène cellulaire nommé c-SRC³³⁴, qui fut aussi la première kinase à agir sur une tyrosine identifiée³³⁵.

Il y a huit membres à la famille des kinases SRC, et trois protéines qui sont des membres éloignés de la famille. Les protéines SRC, YES, FYN et FGR sont les plus similaires entre elles au niveau de la séquence. Les protéines BLK, HCK, LCK et LYN forment un second groupe de

kinases et enfin les trois membres plus distants sont FRK, SRM et BRK. SRC, FYN et YES sont exprimés de manière ubiquitaire dans tous les tissus du corps^{336,337}. BLK, FGR, HCK, LCK et LYN sont exprimées principalement dans les cellules hématopoïétiques, SRM dans les kératinocytes, FRK dans la vessie, le cerveau, le colon, le tissu mammaire et les cellules lymphoïdes et BRK dans le colon, la prostate et le petit intestin³³⁶⁻³³⁸.

1.7.2 Structure et fonction

Les membres de la famille SRC possèdent tous une série de domaines conservés. En effet, ces kinases possèdent un domaine SH1 (*SRC Homology 1*), qui est le domaine kinase, un domaine SH2, un domaine SH3, un domaine SH4 et un domaine Unique.

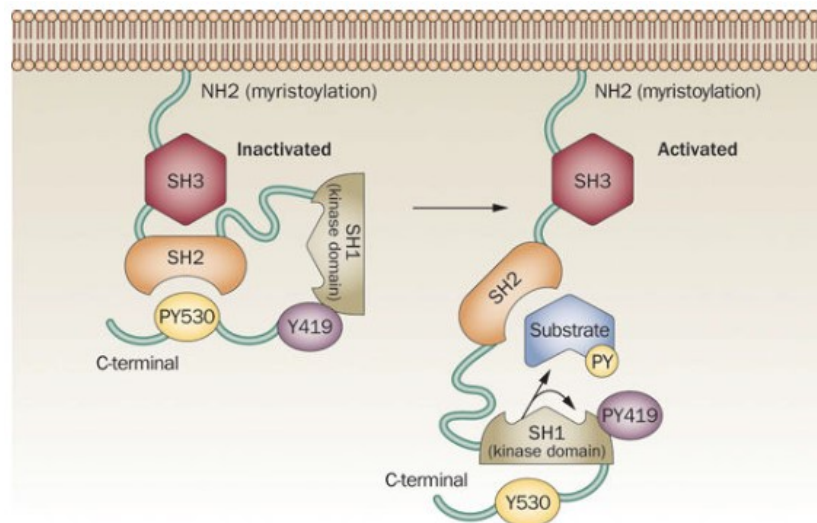


Figure 1.9 Modèle des formes inactive et active des SFK

Figure tirée de Haura E.B. et al, 2009³³⁹

Le domaine SH4 est un tout petit domaine de 15 acides aminés situé en N-terminal et contenant des signaux provoquant l'ajout de lipides. Les SRC sont donc myristoylés ou palmitoylés, ce qui permet leur ancrage à la membrane cytoplasmique, à la membrane péri-nucléaire, aux endosomes ou aux vésicules de sécrétion^{340,341}. Il a été montré que la myristoylation est nécessaire à l'activité des SRC et celle-ci est contrôlée par les 7 premiers acides aminés de la protéine^{342,343}. Ce domaine contient aussi des résidus basiques au sein de SRC et BLK qui lui servent à interagir avec les groupements acides des phospholipides

membranaires³⁴⁴. Les autres membres de la famille ne possèdent pas ces groupements, mais possèdent des cystéines qui permettent la palmitoylation, stabilisant par le fait même l'association avec les membranes^{345,346}. Le groupement palmitoylé ne peut être ajouté qu'à une protéine possédant déjà un groupe myristoylé et constitue une modification réversible, alors que la myristoylation est irréversible³³⁶.

On retrouve ensuite le domaine Unique, qui varie évidemment d'un membre de la famille à l'autre. Il est stipulé que ce domaine permette des interactions protéines-protéines spécifiques à chaque membre de la famille et puisse par le fait même conférer une spécificité de réponse.

Le domaine SH3 est un domaine retrouvé au sein de multiples protéines. C'est un domaine d'interaction protéique composé d'environ 50 acides aminés dans le cas de la famille SRC et qui adopte une structure de baril β formé de cinq brins β antiparallèles³³⁷. Les domaines SH3 permettent la liaison de petites séquences riches en proline et lient en général la séquence consensus PXXP³⁴⁷. Toutefois, les résidus situés de part et d'autre de cette séquence de base confèrent une spécificité additionnelle. Celle-ci peut être déterminée soit par les résidus situés en N-terminal ou en C-terminal^{105,348}.

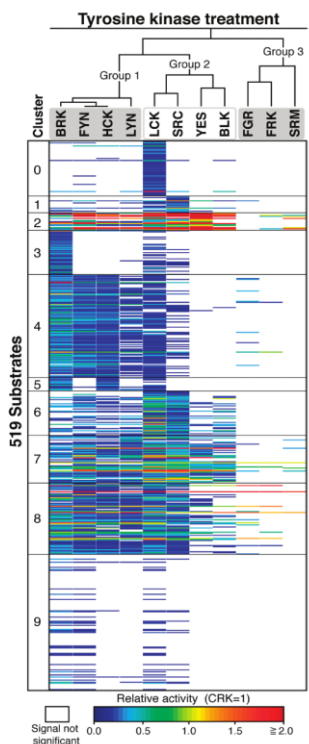
Le domaine SH2 a déjà été décrit plus tôt dans cette thèse comme un domaine liant les tyrosines phosphorylées. Il a été déterminé avec des essais de liaison de peptides que la séquence optimale de liaison du SH2 de SRC à une tyrosine phosphorylée était YEEI³⁴⁹. Dans le cas des SRC, les liaisons médiées par le domaine SH2 affectent la régulation de leur activité catalytique ainsi que leur localisation et celle de leurs partenaires d'interaction. En effet, malgré le fait que les différents membres de la famille soient myristoylés et palmitoylés correctement, ils ne démontrent pas tous la même localisation cellulaire, et un même membre de la famille ne sera pas nécessairement localisé au même endroit selon le type cellulaire étudié, suggérant qu'un mécanisme supplémentaire contrôle la localisation. De plus, il a été montré que des mutations dans les domaines SH2 et SH3 affectent la localisation des protéines SFK (*SRC Family Kinase*)³⁵⁰. Structuralement, le domaine SH2 des SRC est composé d'un feuillet β formé de 3 brins et entouré d'une hélice α de chaque côté³⁵¹. Cela forme deux poches de liaison, l'une qui lie la tyrosine phosphorylée et l'autre qui lie des résidus hydrophobes en C-terminal de la tyrosine³⁵¹.

Un aspect très important de l'activité de SRC est la régulation de son activité catalytique. Le SH2 joue un rôle important à ce niveau car il peut lier de façon intramoléculaire la tyrosine 530 du domaine C-terminal lorsque celle-ci est phosphorylée et que la séquence de phosphorylation est YQPG^{337,352}. Cette séquence est non optimale ce qui signifie que l'interaction pourra être déplacée par une interaction plus forte. En conditions basales, SRC est retrouvée à 90-95% sous une forme inactive dans laquelle cette tyrosine est phosphorylée³⁵³. Les kinases responsables de cette phosphorylation incluent CSK (*C-SRC Kinase*) et CHK (*Csk Homologous Kinase*)^{354,355}.

Une molécule de SRC peut phosphoryler une autre molécule sur la tyrosine 419, ce qui participe à son activation^{356,357}. Les kinases de la famille SRC subissent un changement conformationnel lors de leur activation, ce qui permet de rendre fonctionnel le domaine catalytique par le déplacement d'un résidu très important, le glutamate 313^{337,358}. Ce processus d'activation comprend plusieurs étapes. Tout d'abord, la déphosphorylation de la Y530 permet de relâcher l'inhibition causée par l'interaction entre le domaine C-terminal et le SH2. Cela résulte en une conformation ouverte dans laquelle la Y419 devient accessible à la phosphorylation activatrice³⁵⁸. La mutation de cette tyrosine en phénylalanine ou l'absence de ce résidu en C-terminal résultent en une protéine constitutivement active, comme c'est le cas de la forme virale de SRC, v-SRC. De plus, la liaison de protéines aux domaines SH2 et SH3 permet de relâcher la « pince » que représente la conformation fermée, et donc est associée à l'activation de cette famille de kinases³³⁷.

Le domaine SH1 de SRC est son domaine kinase. Il a été montré que le substrat idéal de SRC comporte la séquence EEEIYG^G/_EEFD alors que le substrat idéal de LCK est XEXIYGV $\Phi\Phi$ ³⁵⁹. Les séquences liées préférentiellement par le domaine SH2 et celle du substrat se ressemblent beaucoup, ce qui suggère que la famille SRC pourrait lier certains de ses substrats une fois phosphorylés, possiblement pour favoriser la phosphorylation d'autres résidus ou partenaires d'interaction³³⁶.

1.7.3 Substrats des SRC



selon la similitude de leur patron de phosphorylation de substrats. Les substrats sont classés en 9 groupes, ce qui permet de montrer que les kinases montrent des préférences envers certains substrats. Figure tirée de Takeda et al, 2010³⁶⁰.

Une étude a comparé *in vitro* la capacité des onze membres de la famille SRC à phosphoryler 579 substrats potentiels³⁶⁰. Cela a permis de révéler des similarités et de grandes différences au sein de la famille SRC. Il est tout d'abord aisé de noter qu'il y a bien une redondance dans la phosphorylation des substrats par les SRC. 81.7% des substrats étaient phosphorylés par au moins 1 membre de la famille, 31% par six à onze membres, 11.1% par huit membres, et seulement moins de 1% par les 11 membres. Toutefois, il ressort aussi de cette étude que les différents membres des SRC ont une spécificité pour certains substrats. Les auteurs ont classé en trois groupes les kinases de la famille selon la similarité de leur patron de phosphorylation (Figure 1.9). On retrouve dans le premier groupe BRK, FYN, HCK, LYN, dans le second groupe LCK, SRC, YES et BLK et dans le troisième groupe FGR, FRK et SRM, ce qui est intéressant car cela ne suit pas la similitude de séquence entre les kinases. En effet, BRK par exemple, qui est un membre éloigné de la famille, est ici classé avec les membres classiques selon sa spécificité catalytique.³⁶⁰

Il existe une longue liste de protéines phosphorylées par SRC. Toutefois, certaines des protéines démontrant une phosphorylation en présence de la kinase sont probablement des protéines phosphorylées par d'autres kinases activées par SRC. Il est donc important de démontrer l'interaction entre la kinase et le substrat potentiel pour confirmer le tout. L'identification de substrats a été facilitée par l'utilisation de mutants constitutivement actifs de SRC, dans des cellules transformées par ces derniers versus des cellules non transformées.

Figure 1.10 Spécificité de phosphorylation des SFK

Spécificité des kinases de la famille SRC par une étude *in vitro* de phosphorylation de substrats³⁶⁰ Les kinases sont regroupées

La kinase c-YES a été moins étudiée que son homologue SRC et ses substrats précis sont moins connus. Il a été montré que c-YES possède des fonctions redondantes à celles de SRC, l'apparition de certains phénotypes nécessitant la délétion de plusieurs membres de la famille. Les souris nulles pour SRC, YES ou FYN séparément développent des phénotypes distincts mais montrent une longue survie post-natale³⁶¹. Au contraire, les souris nulles pour SRC et YES démontrent un phénotype de létalité périnatale. Les souris dans lesquelles les gènes de YES et de FYN sont délétés, elles, développent des dommages rénaux dégénératifs³⁶¹. Bien que certaines fonctions soient redondantes, d'autres semblent spécifiques. YES n'est pas en mesure d'accomplir certaines des fonctions associées à SRC comme la régulation du cytosquelette d'actine. L'utilisation de chimères des deux protéines a permis de démontrer des différences de spécificité de liaison et de phosphorylation des protéines cibles³⁶².

Au niveau des substrats classiques des SRC, il existe deux catégories majeures. En effet, les SRC sont activés par les récepteurs à tyrosine kinase et beaucoup de leurs substrats recourent des protéines phosphorylées en réponse à l'activation de ces récepteurs, par exemple les récepteurs du PDGF et de l'EGF. De plus, ces substrats sont connus pour posséder des fonctions mitogéniques. On y retrouve la Phospholipase C γ (PLC γ), RasGAP, SHPTP2, SHC et la sous-unité p85 de PI3K (*PhosphoInositide-3-Kinase*)³³⁶.

La seconde catégorie majeure est constituée des protéines contenant des tyrosines phosphorylées dans les cellules transformées par SRC, qui interagissent avec les SRC et qui ne semblent pas être des substrats activés par les récepteurs à tyrosine kinase³³⁶. On retrouve plusieurs protéines impliquées dans l'organisation du cytosquelette, l'adhésion cellule-cellule, cellule-substrat, la communication cellulaire et le *processing* de l'ARN³³⁶. Plusieurs substrats, comme AFAP110, cortactine, FAK, paxilline, tensine, vinculine, taline et p130^{CAS} sont des protéines associées au cytosquelette d'actine ou à des structures associées à l'actine au point de contact cellule-substrat³³⁶.

1.7.4 Fonctions des SRC

Les fonctions des SFK sont multiples et parfois complexes. Elles seront décrites sommairement dans les prochains paragraphes. Un des rôles très importants de SRC est sa régulation de l'adhésion cellulaire. Les jonctions entre la cellule et la matrice extracellulaire

permettent l'attachement des cellules à la matrice extracellulaire via la signalisation par les intégrines. Les SFK peuvent y agir en tant que protéines d'échafaudage, grâce au recrutement de divers médiateurs de ce processus via des interactions protéine-protéine³⁶³. Ils peuvent aussi contrôler des facteurs d'échange de guanine ou GEF (*Guanine Exchange Factors*) et des protéines activatrices de GTPases ou GAP (*GTPase activating Proteins*) ciblant la famille des Rho-GTPases. Entre autres, SRC peut se lier à FAK (*Focal Adhesion Kinase*) et l'activer par phosphorylation³⁶³. Ces sites de phosphorylation sur FAK permettent le recrutement d'autres protéines effectrices. Le complexe SRC-FAK est très important dans la régulation des protrusions cellulaires et de l'étalement des cellules, qui sont des mécanismes déréglés dans les cellules tumorales, facilitant leur migration et leur invasion³⁶³. Les SRC permettent la déstabilisation des contacts focaux en favorisant les cycles de renouvellement de ces adhésions. Les cellules déficientes en SRC présentent des défauts de migration cellulaire.

SRC peut aussi contrôler les jonctions adhérentes, qui agissent comme un pont moléculaire reliant directement le cytosquelette d'actine d'une cellule à une autre cellule³⁶⁴. Ces jonctions permettent de maintenir l'organisation tissulaire et sont dépendantes des cadhérines³⁶⁴. La cadhérine E est un suppresseur tumoral dont la perte de fonction favorise le potentiel métastatique et l'invasion des cellules cancéreuses. L'activation constitutive de SRC cause la phosphorylation des cadhérines et la perte du complexe cadhérine-caténine nécessaire à ces jonctions^{365,366}. SRC phosphoryle aussi la p120 caténine, ce qui a pour effet de déréguler les cadhérines³⁶⁷. Toutefois, l'inactivation de SRC cause aussi une inhibition des jonctions adhérentes, démontrant que son activité est nécessaire à la régulation normale de ce mécanisme d'adhésion³³⁹.

SRC peut également contrôler la prolifération et la survie cellulaire par l'intermédiaire de son interaction avec de nombreux récepteurs à tyrosine kinase, tels les récepteurs de VEGF, EGF, FGF, PDGF et IGFR-1, HGF. SRC peut ensuite amplifier le signal de ces récepteurs, participant à l'activation d'une panoplie de voies de signalisation favorisant des processus mitogènes. SRC transmet donc des signaux de survie par l'intermédiaire d'effecteurs en aval comme PI3K/AKT et STAT3. Dans certains cas, SRC peut phosphoryler le récepteur, comme pour EGFR, et ainsi augmenter l'activité de signalisation de la voie MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*)³⁶⁸. SRC peut aussi interagir avec des récepteurs comme ERBB2 et ERBB3 et

favoriser la formation du complexe ERBB2/ERBB3 qui provoque une signalisation oncogénique³⁶⁹.

Finalement, les SRC peuvent favoriser l'angiogenèse, c'est-à-dire le développement de nouveaux vaisseaux sanguins au sein d'une tumeur. C'est un des processus clés de la transformation tumorale et cela implique la migration, l'invasion et la prolifération des cellules endothéliales. Cela dépend de facteurs angiogéniques comme VEGF, FGF, HGF, IL8 ou encore les angiopoïétines qui se lient à leur récepteur et activent la signalisation appropriée. Un des mécanismes par lesquels SRC régule l'angiogenèse est par l'induction de l'expression de certains des facteurs angiogéniques tels VEGF et IL8³⁷⁰⁻³⁷². Le second mécanisme par lequel SRC promeut l'angiogenèse est par la coopération avec les récepteurs de ces facteurs d'angiogenèse et de leur signalisation en aval³³⁹. D'après les modèles de souris dans lesquels le gène de *SRC* est délété, SRC semble requis pour l'angiogenèse VEGF-dépendante³³⁹.

1.7.5 SRC, cancer et potentiel thérapeutique

Vu les fonctions de SRC qui viennent d'être décrites, il n'est pas étonnant de constater que la famille SRC est dérégulée dans de nombreux cancers. SRC joue notamment un rôle crucial dans la formation de métastases, de par sa régulation du cytosquelette, de la migration, de l'adhésion et de l'invasion des cellules. Il existe plusieurs inhibiteurs des SRC et ceux-ci se sont rendus en phase d'essais cliniques de niveau II. Toutefois, les résultats quant à l'utilisation de ces inhibiteurs comme monothérapie du cancer ne sont pas du tout prometteurs, malgré des résultats pré-cliniques qui semblaient encourageants.

De tous les membres de la famille SRC, c-SRC est la protéine la plus fréquemment impliquée dans le cancer. La surexpression et l'augmentation de l'activité de c-SRC est observée dans de nombreux types de cancers, notamment dans les cancers colorectaux, où l'activité de c-SRC croît en fonction de la progression de la maladie³⁷³. Une activité augmentée de SRC a aussi été notée dans les cancers gastrointestinaux (hépatocellulaire, pancréatique, gastrique, œsophage) ainsi que dans les cancers du sein, de l'ovaire et du poumon³⁷⁴. Les cancers colorectaux et hépatiques sont particulièrement intéressants car ils surexpriment la kinase en plus d'inhiber son inhibiteur, CSK, ce qui permet une activation maximale de SRC^{375,376}.

Bien que v-SRC soit extrêmement oncogénique même lorsqu'exprimée à de faibles niveaux, c-SRC nécessite une très forte activation et de hauts niveaux afin de transformer des cellules³⁷⁷. Ainsi, l'activation et les niveaux d'expression de SRC sont importants au cours de la tumorigénèse. C-SRC est rarement muté dans les cancers, son activation étant plutôt médiée par une dérégulation des phosphatases et kinases qui la contrôlent, ainsi que par la surexpression de récepteurs à tyrosine kinase^{374,377}.

SRC semble causer la résistance à certains traitements contre le cancer. Par exemple, dans le cas des leucémies myéloïdes chroniques, HCK et FYN semblent essentiels à la transformation tumorale médiée par BCR-ABL grâce à leur interaction directe qui n'est pas inhibée par l'imatinib (inhibiteur de BCR-ABL)³⁷⁸. L'activité de ces kinases semble être corrélée avec la résistance aux médicaments imatinib et dasatinib³⁷⁹. Ce type de résistance est aussi présent dans les thérapies anti-endocrines (cancers du sein et de la prostate) et les thérapies visant la signalisation par les récepteurs à tyrosine kinase, ainsi qu'avec la chimiothérapie et la radiothérapie³⁸⁰.

Le dasatinib est le premier double inhibiteur de SFK/ABL approuvé par la FDA pour le traitement des leucémies myéloïdes chroniques et l'ALL dépendante du chromosome de Philadelphie³⁸¹. D'autres inhibiteurs de SRC en phases d'essais cliniques sont le saracatinib et le bosutinib. Ces inhibiteurs sont bien tolérés, ils causent peu de toxicité, mais leurs effets sont peu probants³⁸¹ avec moins de 25% d'efficacité clinique pour le dasatinib dans une variété de cancers du sein, de la prostate et de mélanomes³⁸⁰. Le dasatinib ne montrait aucun bénéfice clinique dans le traitement de cancers du poumon à petites cellules³⁸² et de cancer colorectal métastatique³⁸³. Le saracatinib lui, n'a montré aucun bénéfice clinique en tant que monothérapie pour les stades avancés des cancers de la prostate, du pancréas, du cancer gastrique, du cancer du sein et du carcinome squameux de la tête et du cou³⁸¹. Le bosutinib, quant à lui, a montré des résultats encourageants dans la prolongation de temps précédant la progression de la maladie pour les cancers du sein de stade avancés ou métastatiques³⁸⁴.

Un premier point à considérer en regard de ces échecs est qu'aucune sélection de patients ne fut effectuée lors de ces essais cliniques, entre autres à cause du défi de trouver de bons biomarqueurs de l'activité des SRC *in vivo*³⁸¹. Dans un essai pré-clinique destiné à trouver une solution à ce problème, 23 lignées de cancer colorectal furent classées selon l'activité de SRC.

Les auteurs ont montré que la réponse au saracatinib corrèle avec l'activité de SRC³⁸⁵. Cela démontre l'importance de sélectionner des patients susceptibles de répondre au traitement.

Les monothérapies ne semblent pas très efficaces, mais avec les connaissances des études pré-cliniques, il pourrait être très prometteur de combiner des inhibiteurs de SRC avec d'autres molécules. Par exemple, SRC joue un rôle dans l'addiction des tumeurs à la signalisation par les récepteurs à tyrosine kinase. Il a été montré que des inhibiteurs de SRC ne sont pas efficaces en monothérapie contre les cancers du sein positifs pour le récepteur HER2 (*Human Epidermal growth factor Receptor 2*) et résistants au lapatinib ou au trastuzumab. Par contre, l'administration d'inhibiteurs de SRC dans ce cas de figure sensibilise les cellules cancéreuses aux thérapies anti-HER2^{386,387}. Pour les tumeurs de cancer gastrique et colorectal avec une amplification de c-MET, l'inhibition de SRC bloque la signalisation par Met et supprime la croissance tumorale³⁸⁸. Dans les cancers du cou et de la tête, c-Met provoque une résistance à la monothérapie des inhibiteurs de SRC, mais l'administration combinée d'inhibiteurs de MET et de SRC provoque une synergie de l'effet cytotoxique³⁸⁹. Plusieurs autres études ont aussi obtenu des résultats semblables, soulignant l'importance de planifier des essais cliniques de combinaisons thérapeutiques visant à causer la létalité synthétique, qui consiste en une mort cellulaire due à l'inactivation simultanée de deux gènes ou voies de signalisation, qui seules n'ont pas d'effet.

Finalement, SRC joue un rôle important dans le processus métastatique. Il serait donc important d'effectuer des essais cliniques de SRC sur des stades moins avancés de cancer, dans le but de limiter la progression métastatique. Le rôle de SRC semble plutôt de faciliter la progression tumorale que d'en être la cause principale³⁸¹. Cela explique aussi pourquoi les monothérapies qui le ciblent ne sont pas très efficaces contre des cancers de stade très avancé, dans lesquels de multiples altérations génétiques promeuvent l'agressivité des tumeurs. Malgré des premiers essais cliniques peu concluants, le développement d'études cliniques plus ciblées et combinatoires pourraient se révéler très prometteuses pour le traitement de certains cancers³⁸¹.

1.8 Objectifs de la thèse

En résumé, les mécanismes de suppression tumorale, que ce soient la mort cellulaire programmée ou la sénescence, contribuent fortement à limiter la transformation tumorale des

cellules mais jouent aussi un rôle dans l'efficacité des thérapies cancéreuses. Ces mécanismes sont dépendants de suppresseurs de tumeurs qui coordonnent l'activation de ces programmes en réponse à de nombreux stress.

Il a été montré que l'interaction des protéines suppresseurs tumorales p53 et SOCS1 est importante pour l'induction de la sénescence cellulaire en réponse à l'oncogène STAT5a. SOCS1 permet l'activation de p53 en agissant en tant qu'adaptateur moléculaire permettant la liaison à la fois de p53 et de sa kinase ATM ou ATR, facilitant ainsi la phosphorylation de p53. À la fois SOCS1 et p53 sont mutés et/ou dérégulés dans de nombreux cancers ce qui pourrait compromettre leur interaction et une activation rigoureuse de p53 dans certains contextes. Bien que les rôles de SOCS1 dans la régulation de la voie JAK/STAT soient bien décrits, ceux liés à l'interaction de p53 et SOCS1 sont peu étudiés, même si de nombreuses études ont confirmé son importance biologique en lien avec la signalisation des miARNs.

Les mécanismes moléculaires précis de cette interaction ne sont pas connus et leur découverte pourrait fournir des stratégies permettant la réactivation de p53 dans des cellules cancéreuses. De plus, les gènes cibles régulés par p53 et importants pour la suppression tumorale ne sont pas encore bien définis, mais il est connu que plusieurs de ses cibles classiques ne sont pas requises pour cette fonction. Ainsi, découvrir les cibles transcriptionnelles de p53 contrôlées par un suppresseur tumoral tel que SOCS1 pourrait permettre d'identifier des gènes impliqués dans la suppression tumorale.

Il a été déterminé que le domaine SH2 de SOCS1 lie le domaine de transactivation de p53 et que le TAD de p53 ne contient aucune tyrosine. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'un mécanisme d'interaction différent de ce qui est connu dans la littérature régule la liaison entre SOCS1 et p53. De plus, nous pensons que les mutations de SOCS1 présentes dans les cancers pourraient nous renseigner sur des acides aminés importants pour cette interaction.

L'objectif de cette thèse est donc de mieux comprendre le mécanisme d'interaction moléculaire de l'interaction des protéines SOCS1 et p53 et de ses implications dans la suppression tumorale médiée par SOCS1. Notre hypothèse est que les mutations dans la séquence de SOCS1 pourront nous renseigner sur les acides aminés importants pour ses fonctions de suppression tumorale et que SOCS1 est peut être régulé par modification post-

traductionnelle, ce qui affecterait ses rôles de suppression tumorale et son interaction avec p53. Les deux prochains chapitres présentent les résultats obtenus en lien avec cet objectif. Ces derniers sont présentés sous forme d'articles scientifiques et précédés par une mise en contexte et la description de la contribution des auteurs.

2. SOCS1 regulates senescence and ferroptosis by modulating the expression of p53 target genes

2.1 Présentation de l'article 1

Ce premier article avait pour but de mieux comprendre l'impact de l'activation de p53 par SOCS1. En effet, notre laboratoire avait publié précédemment que SOCS1 interagit avec p53 et permet son activation. Toutefois, le programme transcriptionnel activé par p53 en réponse à SOCS1 n'avait pas été étudié. Ce contexte est très intéressant car il représente un mode d'activation chronique et non aigu, ce qui peut permettre la découverte de cibles de p53 impliquées dans la suppression tumorale. Une méthode non biaisée fut donc utilisée pour ce faire : une expérience de micropuces à ADN. L'objectif était donc d'analyser les résultats et de valider certaines des cibles obtenues. La découverte de cibles impliquées dans l'induction de la ferroptose fut très intrigante et permit de faire un lien entre SOCS1 et la ferroptose.

Cet article a été publié dans le journal *Aging* en octobre 2017 (Saint-Germain et al., SOCS1 regulates senescence and ferroptosis by modulating the expression of p53 target genes, *Aging* (Albany, NY), 9(10), 2137-2162)³⁹⁰.

Ma contribution est la principale contribution de cet article. J'ai planifié les expériences et effectué la plupart de la culture cellulaire, des western blots, des qPCRs, des essais de ferroptose, des co-immunoprécipitations et des GST pull-downs. J'ai aussi réalisé l'expérience, l'analyse et la validation du microarray. Lian Mignacca a participé à la culture cellulaire et à la réalisation de plusieurs qPCRs et essais de ferroptose. Mathieu Vernier a réalisé les immunofluorescences et a aidé à l'analyse du microarray. Diwakar Bobbala et le Dr. Ilangumaran ont réalisé des analyses bioinformatiques de corrélation entre les cibles de p53 trouvées et l'expression de SOCS1 dans des échantillons de cancer du foie.

2.2 Article 1

SOCS1 regulates senescence and ferroptosis by modulating the expression of p53 target genes

Emmanuelle Saint-Germain¹, Lian Mignacca¹, Mathieu Vernier², Diwakar Bobbala³, Subburaj Ilangumaran³ and Gerardo Ferbeyre¹

1) Département de Biochimie et Médecine Moléculaire; Université de Montréal; C.P. 6128, Succ. Centre-Ville, Montréal, Québec, H3C 3J7; Canada.

2) Department of Biochemistry, Medicine & Oncology, Faculty of Medicine, McGill University Goodman Cancer Research Centre, 1160 Pine avenue west, Room 711 McIntyre Pavilion, Montreal, Quebec, H3A 1A3; Canada

3) Immunology Division, Department of Pediatrics; Faculty of Medicine, University of Sherbrooke, Sherbrooke, Canada

2.2.1 Abstract

The mechanism by which p53 suppresses tumorigenesis remains poorly understood. In the context of aberrant activation of the JAK/STAT5 pathway, SOCS1 is required for p53 activation and the regulation of cellular senescence. In order to identify p53 target genes acting during the senescence response to oncogenic STAT5A, we characterized the transcriptome of STAT5A-expressing cells after SOCS1 inhibition. We identified a set of SOCS1-dependent p53 target genes that include several secreted proteins and genes regulating oxidative metabolism and ferroptosis. Exogenous SOCS1 was sufficient to regulate the expression of p53 target genes and sensitized cells to ferroptosis. This effect correlated with the ability of SOCS1 to reduce the expression of the cystine transporter SLC7A11 and the levels of glutathione. SOCS1 and SOCS1-dependent p53 target genes were induced during the senescence response to oncogenic STAT5A, RasV12 or the tumor suppressor PML. However, while SOCS1 sensitized cells to ferroptosis neither RasV12 nor STAT5A mimicked the effect. Intriguingly, PML turned cells highly resistant to ferroptosis. The results indicate different susceptibilities to ferroptosis in senescent cells depending on the trigger and suggest the possibility of killing senescent cells by inhibiting pathways that mediate ferroptosis resistance.

2.2.2 Introduction

p53 is by far the most commonly mutated gene in human cancers with mutations present in 36% of all patients [1]. p53 acts mainly as a transcription factor suggesting that p53-target genes should have important functions in cancer biology. Combining chromatin immunoprecipitation and gene expression data of different cellular models revealed a number of p53 target genes that range between 122 to 3697 genes with little overlap between studies but including both genes that are activated or repressed by p53 [2,3,4,5]. A meta-analysis of different p53 and cell cycle regulatory networks revealed that p53 acts mainly as an activator through proximal promoter binding while gene repression is mostly indirect and dependent on the DREAM or RB/E2F complexes [5]. Identifying the key p53 targets that mediate tumor suppression and the cellular processes they regulate is a pressing goal for cancer research.

The tumor suppressor activity of p53 in mice does not correlate with the expression of p53 targets controlled by an acute DNA damage response [6]. For example, mice deficient for p21, Puma and Noxa, which are p53 target genes mediating cell cycle arrest and apoptosis, do not display the tumor prone phenotype typical of p53 null mice [7]. Genes controlling cell signalling, the cytoskeleton, DNA repair and ferroptosis were then identified as new candidates to mediate the tumor suppressor functions of p53 [4,6]. Genome wide analysis of p53 binding under conditions of acute or chronic stimulation revealed distinct p53 binding sites and regulated genes suggesting that upon chronic stimulation p53 DNA binding properties are regulated differently than in acute conditions [8]. The present state of knowledge indicates that context largely determines the transcriptional response to p53 activation. Hence, the identification of p53 targets in conditions where p53 regulates tumor suppression will help to identify important pathways and mechanisms to halt tumorigenesis.

Activation of p53 is often mediated by the DNA damage response that triggers a series of post-translational modifications on p53 preventing its degradation by E3 ubiquitin ligases such as MDM2 [9,10]. A similar mechanism is activated by the nucleolar protein p19ARF [11], the tumor suppressor PML [12] and several ribosomal proteins linking p53 activation to nucleolar stresses [13]. During cellular senescence induced by aberrant STAT5A stimulation both DNA damage and SOCS1 expression are required for p53 activation [14,15]. The specific

role of SOCS1 in the senescence response to activated STAT5A and the p53 target genes modulated in this context remain for the most part unknown.

In order to identify and characterize p53 target genes whose regulation depends on SOCS1 we compared the transcriptome of cells that enter senescence in response to constitutive STAT5A-signaling with the transcriptome of cells that failed to do so due to inactivation of SOCS1. We define a set of SOCS1-dependent p53 target genes, some of which are downregulated in many human cancers. Interestingly, this set of genes included the ferroptosis regulators SLC7A11 and SAT1 as well as p53 target genes previously linked to the cellular response to oxidized phospholipids. Consistent with the gene expression analysis overexpression of SOCS1 sensitized cells to ferroptosis. In contrast, induction of senescence by RasV12, STAT5A or PML did not sensitize cells to ferroptosis indicating different susceptibilities to ferroptosis depending on the senescence trigger. We also provide new insights into the mechanism of modulation of p53 by SOCS1 by showing that SOCS1 can stabilize p53 independently of its effects on serine 15-phosphorylation and that SOCS1 can form a complex with the p53 repressor KAP1.

2.2.3 Results

SOCS1 inhibition affects a selective group of p53 target genes

To investigate how SOCS1 modulates the p53 pathway we used a model of oncogene-induced senescence where p53 activation is dependent on SOCS1 [14,15]. In this model, a constitutively active allele of STAT5A (cS5A) is introduced into human fibroblasts IMR90-E7. These cells express the papillomavirus protein E7 to inactivate the retinoblastoma tumor suppressor, allowing us to focus on the p53 pathway contribution to cellular senescence. Expression of cS5A in these cells induced a cell cycle arrest and reduced the expression of proliferation markers (MCM6 and phospho-histone H3) that was rescued by expression of a small hairpin RNA against SOCS1 (Figure 1A-C). Consistent with the reported role of SOCS1 in p53 phosphorylation at serine 15, cS5A failed to induce this modification in cells expressing the shRNA against SOCS1 (Figure 1D). We then compared the transcriptome of IMR90-E7 cells expressing cS5A and co-expressing an shRNA against SOCS1 or a non-targeted shRNA using RNA purified from cells 7 days after introduction of cS5A. The microarray data was deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus (GEO) GSE98216. Genes whose expression changed +/- 1.5 fold were used for pathway analysis with the online bioinformatics platform DAVID. The most significant pathways regulated by SOCS1 in cells expressing cS5A are indicated in Figure 1E and S1. They include genes coding for secreted proteins (Figure S1A-C) and a few genes in the p53-signaling pathway (Figure 1E and Table I). The bypass of senescence induced by cS5A and the inhibition of p53 activity was also confirmed by a second shRNA against SOCS1 (shS1b), (Figure S2). Therefore, although these results confirm the requirement for SOCS1 in p53 phosphorylation and the senescence response to aberrant STAT5A activation, the pattern of p53 target genes identified does not include the classic p53 target genes associated to the DNA damage response.

To further investigate whether SOCS1 modulates the p53 pathway we performed Gene set enrichment analysis (GSEA) of the microarray data. We found that SOCS1-disabled cells have high levels of genes in the set TANG_SENESCENCE_TP53_TARGETS_DN that contain genes upregulated by a dominant negative p53 in normal human fibroblasts (Figure 1F). This gene set mostly includes cell cycle regulated genes, which are known to be regulated by RB. However, the RB pathway was disabled in the IMR90-E7 cell line used in our experiments.

These results thus imply a SOCS1-p53-dependent pathway that regulates cell cycle genes independently of the RB tumor suppressor. SOCS1-disabled cells also have a downregulation of the gene set MODULE_474 (<http://robotics.stanford.edu/~erans/cancer/>) containing several genes upregulated in senescent cells such as IGFBP2, 3, 5, 6 and 7, NOV and SOCS3 (Figure 1G). Further proof that SOCS1 controls the expression of p53 target genes was obtained using the platform DiRE that analyses the promoters of gene sets for signatures of transcription factors. P53 was one of the top transcription factors associated to transcriptome changes induced by an shRNA against SOCS1 (Figure 1H). In addition, this algorithm identified 12 new candidates for p53-target genes (Table II). Many of these genes are poorly expressed in human cancers suggesting that they could be novel tumor suppressors (Table 3). The microarray data was validated using qPCR for either known p53-target genes or the new candidates suggested by the DiRE platform (Figure 1I). We also used data in TCGA from hepatocellular carcinoma a tumor type where promoter DNA methylation often silences SOCS1 expression [16]. We found a significant correlation between the expression of SOCS1 and the SOCS1-dependent p53 target genes defined in human fibroblasts (Figure 2). For several genes (SLC7A11, SAT1, SERPINE1, IGFBP7, GADD45 and ATF3) these correlations decreased in samples from p53 mutant tumors (Figure S3). Taken together our results show that SOCS1 controls a unique set of p53 target genes.

To investigate the biological importance of SOCS1-dependent p53 target genes we analysed their overlap with gene sets mediating specific p53-dependent responses. First, genes regulated by SOCS1 matched gene sets that regulate the response to chemotherapy (Figure S4A), which is largely influenced by the p53 pathway [17]. Second, SOCS1-disabled cells expressed high levels of genes upregulated by a dominant negative BRCA1 allele (Figure S4B), which also disrupts the p53 pathway [18]. Third, SOCS1-disabled cells have a decrease in the expression of genes that blocked angiogenesis in endothelial cells (Figure S4C). These genes include IGFBP3 [19] and COL4A2 which encodes the potent antiangiogenic factor canstatin [20]. It is well known that p53 inhibits angiogenesis [21,22], and our gene expression data suggest that SOCS1 modulates this p53 function as well. Finally, SOCS1-regulated genes also overlapped with a set of genes induced by oxidized phospholipids (Figure S4D), which has been recently linked to iron-dependent cell death or ferroptosis [23]. P53 sensitizes cells to

ferroptosis by repressing the cystine transporter SLC7A11 [4] and inducing the polyamine metabolic enzyme SAT1 [24]. The regulation of those two genes in cS5A expressing cells was SOCS1-dependent (Table 1) suggesting a role for SOCS1 in ferroptosis.

The inhibition of SOCS1 expression in IMR90-E7 bypasses cS5A-induced senescence, raising the possibility that the defects in p53 target gene expression we described above are the consequence of senescence inhibition and are not directly linked to SOCS1. In IMR90 cells, where the retinoblastoma pathway remains intact, inactivation of SOCS1 does not bypass cS5A-induced senescence [14]. This is due to the known fact that the RB pathway is sufficient to regulate senescence in the absence of p53 [25,26]. We thus took advantage of this fact to investigate whether expression of p53 target genes still required SOCS1 in these cells. For most of the genes measured, disabling SOCS1 also inhibited the expression of p53 targets as well (Figure 3A-B) although cells remained senescent (Figure 3C-E). We conclude that the defects in p53 target gene expression we have seen after disabling SOCS1 are not the result of cell cycle re-entry after bypass of senescence and suggest a direct effect of SOCS1 on p53.

SOCS1 is sufficient to activate p53 and regulate the expression of its target genes

Previous research established a function for SOCS1 as an adaptor protein facilitating the phosphorylation of p53 at serine 15 by the DNA damage response activated kinases ATM and ATR [14]. In culture, cells are exposed to high concentrations of oxygen and growth factors increasing the probability of DNA damage by either replication stress or reactive oxygen species. We reasoned that enforcing SOCS1 expression might cooperate with these factors and engage the p53 pathway. Indeed, expressing SOCS1, in U2OS cells (Figure 4A-B) or IMR90 cells (Figure 4C-E) increased the expression of most of the genes that were positively regulated by p53 in cS5A-induced senescence and decreased the expression of SLC7A11, a gene that is repressed by p53. As reported before, SOCS1 was sufficient to trigger senescence in close to 50% of the cells overexpressing the protein (Figure 4F). The increase in expression of p53 target genes by SOCS1 was, for the most part, dependent on p53 since knockdown of p53 (Figure 4G-H) abolished their stimulation and prevented senescence (Figure 4I). However, the decrease in SLC7A11 was not blocked after knockdown of p53 suggesting that SOCS1 regulates the

expression of this gene by additional mechanisms. Of note, not all p53 target genes that required SOCS1 in cS5A-induced senescence were induced by SOCS1 expression alone. The following genes (IGFBP3, IGFBP5, DUSP1, ALDH1L12, IGFBP7, DDIT3, PPP1R3C, NOLC1, NTN4 and SVEP1) were not significantly induced by SOCS1 in either U2OS or IMR90 cells. In addition, RGCC, ESM1, ATF3 and PROCR were induced in U2OS but not in IMR90 cells. These results indicate that SOCS1 partially reproduces oncogenic STAT5A signaling to p53 but additional STAT5A functions also contribute to p53 activation.

SOCS1 sensitizes cells to ferroptosis

The mechanisms by which p53 prevents tumor progression include apoptosis, senescence and ferroptosis [27,28]. The latter is an iron-dependent cell death mechanism that involves reactive oxygen species and lipid oxidation and that does not depend on caspases or Bcl2 family members Bak and Bax [28]. The SOCS1-dependent p53 target genes SLC7A11 [4] and SAT1 [24] play key roles in ferroptosis suggesting that SOCS1 could be a novel regulator of this process. As anticipated, expression of SOCS1 in U2OS or IMR90 cells sensitized them to the ferroptosis inducer tert-butyl-hydroperoxide (TBH). This effect of SOCS1 correlated with its ability to reduce the expression of the cystine transporter SLC7A11 (Figure 5A-F) and was efficiently blocked by treatment with deferoxamine, an iron chelator known to inhibit ferroptosis (Figure 5G-H and Figure S4). Ferroptosis depends on the actions of oxidized lipids, which are detoxified by the glutathione (GSH)-dependent enzyme GPX4 [29]. Cystine is used in the cells to generate cysteine, a metabolite required for the synthesis of glutathione (GSH). As expected, expression of SOCS1 reduced the levels of GSH (Figure 5I) explaining in part its ability to sensitize cells to ferroptosis.

The SOCS1-p53 axis is active in oncogene-induced senescence (OIS) but additional factors control ferroptosis in these cells

OIS is triggered by activated oncogenes and involves replication stress, mitochondrial dysfunction, reactive oxygen species and the DNA damage response [30,31,32]. We anticipated that SOCS1 is generally upregulated during OIS and not only in the specific case of cS5A-induced senescence. This is because senescent cells secrete a variety of inflammatory mediators

that activate JAK-STAT signaling [33], the major regulator of SOCS1 expression [14,34]. We thus induced senescence in IMR90 normal human fibroblasts with constitutively active RAS (RASV12), cS5A or the tumor suppressor PML, that acts downstream of RAS and cS5A to induce senescence (Figure 6A). As published before for cells expressing cS5A [14], we found SOCS1 localizing with phospho-ATM [35] in DNA damage foci in senescent cells, which are known to contain phosphorylated p53 at serine 15 [36] (Figure 6B). Also, induction of senescence by RASV12 or PML led to induction of SOCS1-dependent p53 target genes and the downregulation of the p53-repressible gene SLC7A11 (Figure 6C). Hence, despite the differences in the mechanisms triggering senescence by RasV12, STAT5A, SOCS1 or PML, they regulate a common set of p53 target genes.

Next we performed ferroptosis assays in cells expressing RASV12, STAT5A or PMLIV using the ferroptosis inducer TBH and the ferroptosis inhibitor deferoxamine. For this assay we plated the same amount of cells for each condition and found that neither RasV12 nor STAT5A sensitized cells to ferroptosis despite both having an increase in endogenous SOCS1 expression and a reduction in SLC7A11. Intriguingly, PML expression turned cells highly resistant to ferroptosis providing a mechanistic insight into a ferroptosis resistance pathway in senescent cells (Figure 6D-E). Glutathione levels correlated with ferroptosis resistance in senescent cells (Figure 6F) suggesting compensatory mechanisms of GSH biosynthesis as a possible mechanism for resistance to ferroptosis. Targeting anti-ferroptosis pathways activated in senescent cells might selectively kill them in the same way as targeting anti-apoptotic proteins.

SOCS1 activates p53 via both phosphorylation and stabilization

The pattern of p53 target genes regulated by SOCS1, including ferroptosis regulators, is unique and anticipates unique mechanisms of p53 activation by SOCS1. So far, SOCS1 has been linked to the regulation of serine 15 phosphorylation of p53 [14,15], a modification that is also efficiently induced during an acute DNA damage response, which does not necessarily evolve into a permanent senescent cell cycle arrest [37,38]. Therefore, the ability of SOCS1 to induce senescence must involve additional mechanisms capable of changing the quality of the p53 response.

To investigate how SOCS1 modulates p53 activity, we first induced endogenous p53 using the DNA damaging drug doxorubicin and measured both p53 phosphorylation and total p53 levels. SOCS1 expression increased p53 levels during the course of a doxorubicin treatment without changing the levels of serine 15-phosphorylation of p53, which are highly induced by the drug (Figure 7A and B). In other words, in the context of oncogenic stress that involves relatively modest rates of DNA damage, SOCS1 stimulates serine 15 phosphorylation of p53 by promoting p53-ATM interactions as described before [14]. In cells treated with doxorubicin, high levels of DNA damage maximally stimulate serine 15 phosphorylation of p53 in a SOCS1-independent manner but SOCS1 can still stabilize p53 in this condition.

In order to find additional mechanisms of p53 activation by SOCS1, we looked at the SOCS1 interactome [15]. Interestingly, KAP1, a repressor of p53 [39], immunoprecipitated with SOCS1 [15]. To confirm this finding we expressed wild type SOCS1 in U2OS cells and immunoprecipitated endogenous KAP1 using a specific antibody. We found SOCS1 in KAP1 immunoprecipitates but not in immunoprecipitates obtained with a control antibody (Figure 7C). The reciprocal co-IP analysis confirmed that endogenous KAP1 interacted with SOCS1 (Figure 7D). Next we used a GST-pull-down assays with two fragments of KAP1 and an *in vitro* translated and 35S labelled SOCS1. We found that the Bromo/PHD domain of KAP1 directly interacted with SOCS1 (Figure 7E-G). We thus propose that SOCS1 activates the senescence functions of p53 via two mechanisms (Figure 7H): 1) facilitating serine 15 phosphorylation of p53 and 2) p53 stabilization by interfering with KAP1. Together, these mechanisms can contribute to convert an acute p53 response into a chronic response characterized by the expression of a unique pattern of p53 target genes.

2.2.4 Discussion

The tumor suppressor activity of the transcription factor p53 does not correlate with the expression of target genes induced by acute DNA damage [6]. The discovery and characterization of p53 targets in conditions of chronic stimulation of the p53 pathway should give critical insights into the mechanisms of tumor suppression by p53. Oncogene-induced senescence is a tumor suppressor mechanism where a lasting p53 response mediates a stable cell cycle arrest and the clearance of senescent cells, which prevents tumor progression [40]. The

suppressor of cytokine signaling SOCS1 was previously shown to be required for p53 activation and senescence in response to constitutive JAK-STAT5 signaling [14,15,41,42]. However, the p53 target genes requiring SOCS1 remained poorly characterized. Here we used RNA interference and transcriptome analysis to identify the set of SOCS1-dependent p53 target genes. Although SOCS1 was required for the expression of several previously identified p53 targets, most of the classic targets associated with acute DNA damage response such as p21 and MDM2 were not affected by SOCS1 inhibition (Table I). In addition, bioinformatics analysis using the platform DiRE, uncovered several genes that required SOCS1 expression and contained p53-binding sites in their promoter regions (Table II). This unbiased transcriptome analysis confirms that SOCS1 regulates the p53 pathway and reveals a unique and interesting biology for the SOCS1-p53 axis.

The identification of SOCS1-dependent p53 targets links p53 to several interesting tumor suppression pathways. For example, DDIT-3 (also known as C/EBP Zeta) is a dominant negative inhibitor of C/EBP family of transcription factors [43]. This family is important for the expression of inflammatory cytokines in senescent cells that contribute to the SASP [44,45]. SOCS1 may regulate the SASP via p53 and DDIT-3 (Table 2). In addition, several SOCS1-dependent p53 targets are secreted proteins suggesting that the SOCS1-p53 pathway changes the quality of the SASP. They include the bona fide p53 targets IGFBP3, IGFBP7, SERPINE1/PAI1, DKK1 and GDF15 (Table 1) and the new candidate p53 targets ESM1 and SRPX2 (Table 2). Another interesting target is GADD45B that mediates activation of the p38MAPK pathway, which is required for OIS [46]. Perhaps the most intriguing connection found by our analysis involves the ferroptosis pathway. This form of cell death was linked to p53-dependent tumor suppression and involves the SOCS1-dependent p53 targets SLC7A11 [4] and SAT1 [24]. In addition, ferroptosis is mediated by oxidized lipids [23] and the overall gene expression pattern of SOCS1-expressing cells overlaps with genes regulated by oxidized lipids (Figure S3D). The SOCS1-dependent p53 targets DDIT3, PMAIP1, ATF3 and ESM1 are part of the gene set induced by oxidized phospholipids and therefore bona fide new candidates to regulate ferroptosis downstream the SOCS1-p53 axis.

SOCS1 not only plays a role in the senescence response to constitutively active JAK-STAT5 signaling. In cells expressing oncogenic RAS, SOCS1 is recruited to DNA damage

foci, colocalizing with phospho-ATM. The extent to which SOCS1 modifies gene expression in RAS-induced senescence remains to be fully characterized. However, DKK1, GDF15, Noxa, Dusp1 and SLC7A11 were modulated in Ras- or PML-expressing cells in the same way as in cells expressing STAT5A or SOCS1. In contrast to SOCS1-cells, RAS- or STAT5A-senescent cells were not more sensitive to ferroptosis induced by TBH, suggesting that other pathways activated in these cells control ferroptosis. Intriguingly, PML expressing cells were highly resistant to ferroptosis providing a mechanistic insight into ferroptosis resistance pathways. In addition to influencing p53 target gene expression, SOCS1 could play a general role in senescence by stabilizing the interactions of p53 with protein complexes at DNA damage foci. This would allow the maintenance of a pool of pre-active p53 that can be slowly released during the senescence cell cycle arrest contributing to generate a lasting chronic p53 response. Another function for maintaining p53 in DNA damage foci could be to suppress homologous recombination in cells arrested in G1 [47,48], an event that could lead to chromosome aberrations and potentially tumor development.

2.2.5 Concluding remarks

In summary, we report here that SOCS1 impacts the pattern of secreted products in cells with active p53 and is required for the expression of a selective set of p53 target genes including those involved in ferroptosis. SOCS1 can use several mechanisms to activate p53, including promotion of serine-15 phosphorylation by ATM/ATR kinases and inhibition of the p53 repressor KAP1. Further investigation of the SOCS1-p53 pathway will help to better understand p53 tumor suppression activity and provide insights for novel cancer therapies.

2.2.6 Materials and methods

Cell lines, reagents, growth analysis and senescence. U2OS were purchased from the American Type Culture Collection, (Manassas, VA) and normal human diploid fibroblasts IMR90 were purchased from the Coriell Institute (Camden, New Jersey, USA). IMR90 were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Wisent, Montréal, QC, Canada) and 1% penicillin G/streptomycin sulphate. U2OS were supplemented with 5% FBS (Wisent) and 5% Newborn Calf serum (Wisent), with 1% penicillin G/streptomycin sulphate and with 2mM L-glutamine. Tert-butyl Hydroperoxide was purchased from Sigma (cat #458139) and used at 350 μ M in U2OS cells and 88 μ M in IMR90 cells. Doxorubicin was purchased from Sigma. Growth curves and the senescence associated β -galactosidase were performed as previously described [49].

Plasmid constructions and viral gene transfer. Ca-STAT5A was previously described in [50]. pLPC-SOCS1 was previously described in [14]. pLPC PML IV and pBabe RASV12 were previously described in [49]. GST-KAP1 constructs were a kind gift of Dr. Xavier Mascle. Lentiviral shRNAs against SOCS1 were purchased from Sigma-Aldrich in the pLKO vector. ShSOCS1a (shS1) (TRCN0000356245, Sigma) has the following sequence: CCGGCTGGTTGTTGTAGCAGCTTAACTCGAGTTAAGCTGCTACAACAACCAGTTTT TG and shSOCS1b (TRCN0000057065, Sigma) has the following sequence:

CCGGCTTCCGCACATTCCGTTTCGCACTCGAGTGCGAACGGAATGTGCGGAA
GTTTTTG. shNTC has the following sequence:
CCGGCAACAAGATGAAGAGCACCAACTCGAG

TTGGTGCTCTTCATCTTGTTGTTTTT. pLXSN E7 was a kind gift from Dr. D. Galloway. Retroviral gene transduction was performed as previously described [49]. Lentiviral gene transduction was performed by co-transfecting 6 μ g of the lentiviral vector with the packaging vectors in 293T cells as follows: 3 μ g of the VSV-G envelope protein expression plasmid pMD2, 1.5 μ g of the regulator of virion expression (REV) expression plasmid pRSV and 1.5 μ g of gag/pol elements expression plasmid pMDLg/pRRE. 24 hours post transfection, media were changed and the supernatants (viral soup) were collected 48 hours post transfection, filtered through 0.45 μ m filters (Sarstedt) and added to target cells together with DMEM and 4 μ g/mL polybrene. Viruses were removed after 8 hours and replaced by fresh medium. Selection was

started 24 hours post-infection. For triple infections in IMR90 cells, G418 (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 6 days) and puromycin (1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 3 days) were used first. After puromycin selection was over, hygromycin (80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was added for 4 days. Cells were selected for a total of 7 days before RNA collection. For U2OS and IMR90 single infections, puromycin was used at 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 3 days.

Ferroptosis cell death assays. U2OS and IMR90 cells were seeded 24 hours prior to treatments in 10 cm plates (Corning) at 60% confluence. Cells were then treated with 350 μM (U2OS) or 88 μM (IMR90) TBH (Sigma #458139) for 16 hours. Cell death was assessed by imaging the cells under a white-light microscope and by counting live and dead cells using Trypan-Blue (BioRad) and a cell counter. Supernatants were collected and added to trypsinized cells before counting. All assays were performed at least three times. For IC50 assays, 20 000 IMR90 cells of each condition were plated per well of a 48 well plate. Cells were plated 24 hours prior to TBH treatment. Cells were then treated with either: 0, 10, 20, 40, 60, 80, 90, 100, 120, 160, 180 or 200 μM of TBH for 16 hours. Cells were then fixed with 1% gluteraldehyde in PBS and stained with Crystal Violet (Sigma #C0775). The dye was then resuspended in 10% acetic acid and dosed with a spectrophotometer. GraphPad Prism was used to generate IC50 curves and determine IC50 values.

Western Blotting. Protein analysis was performed by lysing cells in Cell Lysis Buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM β -glycerolphosphate and a cocktail of protease inhibitors (Roche). Quantification of protein content was performed with the Bradford method. Extracts were prepared with Laemmli buffer (1X final). For endogenous SOCS1 detection, 150 μg of total extract was loaded on a 12% SDS-PAGE gel and transferred on an Immobilon P membrane (Millipore). For SOCS1 overexpression and other protein detection, 50 μg of total cells extract was loaded on a 12% SDS polyacrylamide gel. Western blots were performed as described previously [14]. The following primary antibodies were used: anti-SOCS1, clone 4H1 MBL (cat #K0175-6) used at 1:1000 dilution overnight at 4 $^{\circ}\text{C}$. Anti-phospho-p53 (Serine15), NEB (cat #9284) used at 1:1000 dilution overnight at 4 $^{\circ}\text{C}$. Total p53 (DO1 clone), Santa Cruz biotechnology (cat# sc-126) used at 1:1000 overnight at 4 $^{\circ}\text{C}$. Anti-MCM6, Bethyl (#A300-194A) used at 1:1000 overnight at 4 $^{\circ}\text{C}$. Anti-phosphorylated-Rb (Serine 795), Cell Signaling

(#9301) used at 1:1000 overnight at 4°C. Anti-phosphorylated Histone H3 (Serine 10), Millipore (#6570) used at 1:1000 overnight at 4°C. Alpha Tubulin antibody clone B-5-1-2, Sigma (cat # T6074) used at 1:20,000 1 hour at Room Temperature and served as loading control. Signals were revealed by using secondary antibodies coupled to peroxidase (BioRad laboratories) and ECL (GE Healthcare, cat# RPN2106) or Clarity ECL (BioRad #cat 1705061).

Co-Immunoprecipitation: U2OS cells were collected in Cell Lysis Buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM β -glycerolphosphate and a cocktail of protease inhibitors (Roche)) and protein concentration measured using the Bradford method. 2 mg of cell extract from each condition was used for IP and 50 ug was loaded as input (Whole Cell Lysate). Immunoprecipitation of either KAP1 (Bethyl #A300-274A) or SOCS1 (Santacruz #sc-7005R) were performed at an antibody dilution of 1:200 overnight at 4°C. Protein A Sepharose 4B fast flow beads (Sigma #P9424) were used to immunoprecipitate antibody-protein complexes for 1 hour at 4°C. Beads were then washed four times with Cell Lysis Buffer and complexes were eluted by adding Laemmli 2X buffer directly to the beads. Samples were heated for 5 minutes at 100°C prior to loading on an SDS-PAGE gel for western blotting.

GST-Pull-down. BL21 E. coli strain harboring each of the KAP1-GST-fusion vectors were grown at 37°C to an OD of 0.6 in 400 ml YTA 2X medium (16g/l tryptone, 10g/l yeast extract, 5g/l NaCl) and induced with 0.4 mM IPTG for 4 hr at 30°C. Cell pellets were resuspended in STE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl) supplemented with DTT (5mM) and a Protease Inhibitor Cocktail (Roche). Cells were lysed by adding 1mg/mL lysozyme and incubating 45 minutes on ice prior to sonicating with a microtip five times for 10 s. Extracts were centrifuged (13 000 rpm 10 minutes) and supernatants were incubated for 2 hr at 4°C with glutathione Sepharose-4B (Amersham) and washed four times with NETN buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0.5% NP-40). Beads were resuspended in PBS after the last wash.

Briefly, 35[S] Flag-SOCS1 was produced by in vitro transcription/translation (Promega #L1170) and incubated with GST, GST-KAP1, GST KAP1 PHD/BROMO or GST-KAP1 Δ N purified proteins bound to glutathione Sepharose-4B for 2 hr at 4°C. Equal amounts of GST fusion proteins were used as judged from SDS gel electrophoresis and Coomassie blue staining.

Beads were washed 5 times with NETN buffer. Precipitates were eluted in 20 μ l of SDS Sample Buffer and 10 μ l of Bromophenol Blue and boiled for 5 min. Eluates (30 μ l) were separated on SDS-PAGE, dried and exposed for autoradiography.

GSH quantification. Cells were collected in Cell Lysis Buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM β -glycerolphosphate and a cocktail of protease inhibitors (Roche)). GSH was then quantified with the QuantiChrom Glutathione (GSH) Assay Kit (BioAssay Systems, DIGT-250) following manufacturer's instructions. Quantification was normalized to total protein concentration of each sample.

Real-Time Quantitative PCR (qPCR). Total RNA was isolated using Trizol (Invitrogen). Reverse transcription was performed using 5X All-In-One RT MasterMix (Abmgood) on 2 μ g of total RNA in 20 μ L final volume according to the kit's instructions. Reverse transcription products were diluted 10-fold in RNase free water before proceeding to qPCR. QPCR was performed using primers and probe sets from Roche Universal Probe Library (https://lifescience.roche.com/en_ca/brands/universal-probe-library.html?_ga=1.38905443.192324701.1470126343#overview). 96-well plate formats with SYBR-green technology was used as described previously (Bourdeau et al 2004). Relative target-gene quantification was obtained by using the $\Delta\Delta$ CT method in a light Cycler 480 (Roche). The mRNA expressions were measured relative to the mRNAs of two housekeeping genes: HMBS and TBP. All forward and reverse primers are listed below.

Gene symbol	Forward primer	Reverse primer
DUSP1	caacgaggccattgacttcataga	atggaggctgaccgggaaat
IGFBP3	tctcccaggctacaccaccaa	ggcatatttgagctccacattaacct
IGFBP5	ccgcgagcaagtcgaagatcg	taggtctcctcggccatctca
ATF3	tgaggtttgccatccagaacaa	tttcatcttctcaggggctacc
SLC7A11	ctccatgaacgggtggtgtgtt	ccctctcgagacgcaacataga
ALDH1L2	tctggctttggaaaagacttagg	cctgatgatggtgttgcctaat
Serpine1	cggccaagcaagtgacttttc	ggctccttccaagcaagtt
NOXA	gaagaa ggcgc gcaagaac g	tgagtagcacactcgactcca
RGCC	cgcacttcactacgaggag	cactgaagctgaagctgttct
IGFBP7	cctgtctcatctggaacaaggt	tctgaatggccagggtgtcc
DKK1	atgatcatagcaccttgatggg	gcacaacacaatcctgaggcaca
DDIT3	catacatcaccacactgaaagca	gctggtctgatgcctgtttgt
PPP1R3C	agcgggtgctgcttttagg	tggatctaaaacctggatcattctg
NOLC1	gcggcagtggtagtccaaat	tgaagctttatcttctggcctga
NTN4	cgtgcacaataagagcgaacca	tgttccttacattcgcattacctg
SVEP1	tctgttggttgccataacctg	ttatggagcccacaaaagactc
PROCR	aacattgctgccgatactgctg	tctgga gcatatgaagctttgga
ESM1	catggatggcatgaa gtgtg	ccagatgcatgtcatgctcttt
IGFBP4	gcaactccacccaagcag	cggccacacaccagcactt
IGFBP6	aggaatccaggcacctctacca	agtcagatgtctacggcatgg
SOCS1	ggtccccctggttgttga	taggagggtgcgagttcaggt
GDF15	agtcggatactcacgccagaa	gcccga gatacgcaggtg
GADD45B	tgcattgtctcctggtcacgaa	cccggcttcttcgcagtag

Microarray analysis. RNA was collected from IMR90 cells expressing oncoprotein E7, seven days after co-infection with pWZL ca-STAT5A (5A) and pLKO shNTC or pWZL 5A and pLKO shSOCS1 a. Total RNA samples were isolated with the RNeasy mini kit (Qiagen) and sent to the Genome Quebec facility at McGill University for cRNA amplification and subsequent hybridization on GeneChip Human Gene 2.0 ST Array Affymetrix DNA Chip. Data were analyzed using Affymetrix Expression Console Software and Transcriptome Analysis Console (www.affymetrix.com). Each condition was analysed in biological triplicates and the cut-off applied for analysis was an ANOVA p-value <0.05 for genes that have a fold change $\geq \pm 1.5$. Data are available at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE98216> Further analysis were conducted with DiRE (<https://dire.dcode.org/>), Gene-Set Enrichment

Analysis (GSEA) (<http://software.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>) and DAVID database (<https://david.ncifcrf.gov/>). Genes identified by DiRE were further analysed with Oncomine (<https://www.oncomine.org/resource/login.html>).

Gene expression analysis in hepatocellular carcinoma (HCC) specimens. The correlation between SOCS1 gene expression and that of p53 target genes related to ferroptosis was analysed using The Cancer Genome Atlas (TCGA) [51] provisional dataset containing 373 hepatocellular carcinoma (HCC) specimens, which was accessed via the cBioportal (<http://www.cbioportal.org>) [52]. The transcript levels were expressed as RNASeq V_e RESM (RNA-Seq by Expectation Maximization) [53]. The downloaded data were plotted using the GraphPad Prism software to determine the Spearman correlation (ρ) and statistical significance (p).

2.2.7 References

1. Lawrence MS, Stojanov P, Mermel CH, Robinson JT, Garraway LA, Golub TR, Meyerson M, Gabriel SB, Lander ES, Getz G Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature*. 2014; 505: 495-501.
2. Wei CL, Wu Q, Vega VB, Chiu KP, Ng P, Zhang T, Shahab A, Yong HC, Fu Y, Weng Z, Liu J, Zhao XD, Chew JL, et al. A global map of p53 transcription-factor binding sites in the human genome. *Cell*. 2006; 124: 207-219.
3. Li M, He Y, Dubois W, Wu X, Shi J, Huang J Distinct regulatory mechanisms and functions for p53-activated and p53-repressed DNA damage response genes in embryonic stem cells. *Mol Cell*. 2012; 46: 30-42.
4. Jiang L, Kon N, Li T, Wang SJ, Su T, Hibshoosh H, Baer R, Gu W Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression. *Nature*. 2015; 520: 57-62.
5. Fischer M, Grossmann P, Padi M, DeCaprio JA Integration of TP53, DREAM, MMB-FOXM1 and RB-E2F target gene analyses identifies cell cycle gene regulatory networks. *Nucleic Acids Res*. 2016; 44: 6070-6086.
6. Brady CA, Jiang D, Mello SS, Johnson TM, Jarvis LA, Kozak MM, Kenzelmann Broz D, Basak S, Park EJ, McLaughlin ME, Karnezis AN, Attardi LD Distinct p53 transcriptional programs dictate acute DNA-damage responses and tumor suppression. *Cell*. 2011; 145: 571-583.
7. Valente LJ, Grabow S, Vandenberg CJ, Strasser A, Janic A Combined loss of PUMA and p21 accelerates c-MYC-driven lymphoma development considerably less than loss of one allele of p53. *Oncogene*. 2015.
8. Kirschner K, Samarajiwa SA, Cairns JM, Menon S, Perez-Mancera PA, Tomimatsu K, Bermejo-Rodriguez C, Ito Y, Chandra T, Narita M, Lyons SK, Lynch AG, Kimura H, et al. Phenotype specific analyses reveal distinct regulatory mechanism for chronically activated p53. *PLoS Genet*. 2015; 11: e1005053.

9. Banin S, Moyal L, Shieh S, Taya Y, Anderson CW, Chessa L, Smorodinsky NI, Prives C, Reiss Y, Shiloh Y, Ziv Y Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science*. 1998; 281: 1674-1677.
10. Sakaguchi K, Herrera JE, Saito S, Miki T, Bustin M, Vassilev A, Anderson CW, Appella E DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev*. 1998; 12: 2831-2841.
11. Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liegeois NJ, Silverman A, Alland L, Chin L, Potes J, Chen K, Orlov I, Lee HW, Cordon-Cardo C, DePinho RA The Ink4a tumor suppressor gene product, p19^{Arf}, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell*. 1998; 92: 725-734.
12. Bernardi R, Scaglioni PP, Bergmann S, Horn HF, Vousden KH, Pandolfi PP PML regulates p53 stability by sequestering Mdm2 to the nucleolus. *Nat Cell Biol*. 2004; 6: 665-672.
13. Donati G, Peddigari S, Mercer CA, Thomas G 5S ribosomal RNA is an essential component of a nascent ribosomal precursor complex that regulates the Hdm2-p53 checkpoint. *Cell Rep*. 2013; 4: 87-98.
14. Calabrese V, Mallette FA, Deschenes-Simard X, Ramanathan S, Gagnon J, Moores A, Ilangumaran S, Ferbeyre G SOCS1 links cytokine signaling to p53 and senescence. *Mol Cell*. 2009; 36: 754-767.
15. Mallette FA, Calabrese V, Ilangumaran S, Ferbeyre G SOCS1, a novel interaction partner of p53 controlling oncogene-induced senescence. *Aging (Albany NY)*. 2010; 2: 445-452.
16. Yoshikawa H, Matsubara K, Qian GS, Jackson P, Groopman JD, Manning JE, Harris CC, Herman JG 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.
17. Khoo KH, Verma CS, Lane DP Drugging the p53 pathway: understanding the route to clinical efficacy. *Nat Rev Drug Discov*. 2014; 13: 217-236.

18. Fabbro M, Savage K, Hobson K, Deans AJ, Powell SN, McArthur GA, Khanna KK BRCA1-BARD1 complexes are required for p53Ser-15 phosphorylation and a G1/S arrest following ionizing radiation-induced DNA damage. *J Biol Chem.* 2004; 279: 31251-31258.
19. Liu B, Lee KW, Anzo M, Zhang B, Zi X, Tao Y, Shiry L, Pollak M, Lin S, Cohen P Insulin-like growth factor-binding protein-3 inhibition of prostate cancer growth involves suppression of angiogenesis. *Oncogene.* 2007; 26: 1811-1819.
20. Magnon C, Galaup A, Mullan B, Rouffiac V, Bouquet C, Bidart JM, Griscelli F, Opolon P, Perricaudet M Canstatin acts on endothelial and tumor cells via mitochondrial damage initiated through interaction with α v β 3 and α v β 5 integrins. *Cancer Res.* 2005; 65: 4353-4361.
21. Yeh JR, Mohan R, Crews CM The antiangiogenic agent TNP-470 requires p53 and p21CIP/WAF for endothelial cell growth arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97: 12782-12787.
22. Assadian S, El-Assaad W, Wang XQ, Gannon PO, Barres V, Latour M, Mes-Masson AM, Saad F, Sado Y, Dostie J, Teodoro JG p53 inhibits angiogenesis by inducing the production of Arresten. *Cancer Res.* 2012; 72: 1270-1279.
23. Kagan VE, Mao G, Qu F, Angeli JP, Doll S, Croix CS, Dar HH, Liu B, Tyurin VA, Ritov VB, Kapralov AA, Amoscato AA, Jiang J, et al. Oxidized arachidonic and adrenic PEs navigate cells to ferroptosis. *Nat Chem Biol.* 2017; 13: 81-90.
24. Ou Y, Wang SJ, Li D, Chu B, Gu W Activation of SAT1 engages polyamine metabolism with p53-mediated ferroptotic responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016; 113: E6806-E6812.
25. Chicas A, Wang X, Zhang C, McCurrach M, Zhao Z, Mert O, Dickins RA, Narita M, Zhang M, Lowe SW Dissecting the unique role of the retinoblastoma tumor suppressor during cellular senescence. *Cancer Cell.* 2010; 17: 376-387.
26. Vernier M, Bourdeau V, Gaumont-Leclerc MF, Moiseeva O, Begin V, Saad F, Mes-Masson AM, Ferbeyre G Regulation of E2Fs and senescence by PML nuclear bodies. *Genes Dev.* 2011; 25: 41-50.

27. Sinha VC, Qin L, Li Y A p53/ARF-dependent anticancer barrier activates senescence and blocks tumorigenesis without impacting apoptosis. *Mol Cancer Res.* 2015; 13: 231-238.
28. Jiang L, Hickman JH, Wang SJ, Gu W Dynamic roles of p53-mediated metabolic activities in ROS-induced stress responses. *Cell Cycle.* 2015; 14: 2881-2885.
29. Yang WS, SriRamaratnam R, Welsch ME, Shimada K, Skouta R, Viswanathan VS, Cheah JH, Clemons PA, Shamji AF, Clish CB, Brown LM, Girotti AW, Cornish VW, et al. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell.* 2014; 156: 317-331.
30. Mallette FA, Gaumont-Leclerc MF, Ferbeyre G The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence. *Genes Dev.* 2007; 21: 43-48.
31. Bartkova J, Rezaei N, Liontos M, Karakaidos P, Kletsas D, Issaeva N, Vassiliou LV, Kolettas E, Niforou K, Zoumpourlis VC, Takaoka M, Nakagawa H, Tort F, et al. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature.* 2006; 444: 633-637.
32. Di Micco R, Fumagalli M, Cicalese A, Piccinin S, Gasparini P, Luise C, Schurra C, Garre M, Nuciforo PG, Bensimon A, Maestro R, Pelicci PG, d'Adda di Fagagna F Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature.* 2006; 444: 638-642.
33. Hubackova S, Novakova Z, Krejcikova K, Kosar M, Dobrovolna J, Duskova P, Hanzlikova H, Vancurova M, Barath P, Bartek J, Hodny Z Regulation of the PML tumor suppressor in drug-induced senescence of human normal and cancer cells by JAK/STAT-mediated signaling. *Cell Cycle.* 2010; 9: 3085-3099.
34. Tamiya T, Kashiwagi I, Takahashi R, Yasukawa H, Yoshimura A Suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins and JAK/STAT pathways: regulation of T-cell inflammation by SOCS1 and SOCS3. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011; 31: 980-985.
35. Bakkenist CJ, Beumer JH, Schmitz JC ATM serine-1981 phosphorylation is a plausible biomarker. *Cell Cycle.* 2015; 14: 3207-3208.

36. Al Rashid ST, Dellaire G, Cuddihy A, Jalali F, Vaid M, Coackley C, Folkard M, Xu Y, Chen BP, Chen DJ, Lilge L, Prise KM, Bazett Jones DP, et al. Evidence for the direct binding of phosphorylated p53 to sites of DNA breaks in vivo. *Cancer Res.* 2005; 65: 10810-10821.
37. Webley K, Bond JA, Jones CJ, Blaydes JP, Craig A, Hupp T, Wynford-Thomas D Posttranslational modifications of p53 in replicative senescence overlapping but distinct from those induced by DNA damage. *Mol Cell Biol.* 2000; 20: 2803-2808.
38. Zhang XP, Liu F, Wang W Two-phase dynamics of p53 in the DNA damage response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108: 8990-8995.
39. Wang C, Ivanov A, Chen L, Fredericks WJ, Seto E, Rauscher FJ, 3rd, Chen J MDM2 interaction with nuclear corepressor KAP1 contributes to p53 inactivation. *EMBO J.* 2005; 24: 3279-3290.
40. Xue W, Zender L, Miething C, Dickins RA, Hernando E, Krizhanovsky V, Cordon-Cardo C, Lowe SW Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature.* 2007; 445: 656-660.
41. Bouamar H, Jiang D, Wang L, Lin AP, Ortega M, Aguiar RC MicroRNA 155 control of p53 activity is context dependent and mediated by Aicda and Socs1. *Mol Cell Biol.* 2015; 35: 1329-1340.
42. Mignacca L, Saint-Germain E, Benoit A, Bourdeau V, Moro A, Ferbeyre G Sponges against miR-19 and miR-155 reactivate the p53-Socs1 axis in hematopoietic cancers. *Cytokine.* 2016; 82: 80-86.
43. Ron D, Habener JF CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes Dev.* 1992; 6: 439-453.
44. Acosta JC, O'Loghlen A, Banito A, Guijarro MV, Augert A, Raguz S, Fumagalli M, Da Costa M, Brown C, Popov N, Takatsu Y, Melamed J, d'Adda di Fagagna F, et al. Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell.* 2008; 133: 1006-1018.

45. Kuilman T, Michaloglou C, Vredeveld LC, Douma S, van Doorn R, Desmet CJ, Aarden LA, Mooi WJ, Peeper DS Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell*. 2008; 133: 1019-1031.
46. Takekawa M, Tatebayashi K, Itoh F, Adachi M, Imai K, Saito H Smad-dependent GADD45beta expression mediates delayed activation of p38 MAP kinase by TGF-beta. *EMBO J*. 2002; 21: 6473-6482.
47. Willers H, McCarthy EE, Wu B, Wunsch H, Tang W, Taghian DG, Xia F, Powell SN Dissociation of p53-mediated suppression of homologous recombination from G1/S cell cycle checkpoint control. *Oncogene*. 2000; 19: 632-639.
48. Dudenhoffer C, Rohaly G, Will K, Deppert W, Wiesmuller L Specific mismatch recognition in heteroduplex intermediates by p53 suggests a role in fidelity control of homologous recombination. *Mol Cell Biol*. 1998; 18: 5332-5342.
49. Ferbeyre G, de Stanchina E, Querido E, Baptiste N, Prives C, Lowe SW PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence. *Genes Dev*. 2000; 14: 2015-2027.
50. Mallette FA, Gaumont-Leclerc MF, Huot G, Ferbeyre G Myc Down-regulation as a Mechanism to Activate the Rb Pathway in STAT5A-induced Senescence. *J Biol Chem*. 2007; 282: 34938-34944.
51. Wang F, Wang R, Li Q, Qu X, Hao Y, Yang J, Zhao H, Wang Q, Li G, Zhang F, Zhang H, Zhou X, Peng X, et al. A transcriptome profile in hepatocellular carcinomas based on integrated analysis of microarray studies. *Diagn Pathol*. 2017; 12: 4.
52. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, Sun Y, Jacobsen A, Sinha R, Larsson E, Cerami E, Sander C, Schultz N Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal*. 2013; 6: p11.
53. Li B, Dewey CN RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*. 2011; 12: 323.

2.2.8 Legends

Figure 2.1 Microarray analysis identifies SOCS1-dependent p53 target genes. A. Growth curves. Normal human fibroblasts (IMR90) expressing viral oncoprotein E7 were retrovirally infected with either an empty vector (V) or with constitutively activated STAT5A (cS5A) and with either a control shRNA (shNTC) or an shRNA against SOCS1 (shS1 a). Cells were counted and plated for the growth assay. B. SOCS1 mRNA levels were measured by qPCR using cells collected 7 days post infection, as in (A). C. Western blots of IMR90 cells at day 7 post infection, as described in (A) for MCM6, phosphorylated Histone H3 (S10) and Tubulin. D. Western blots of IMR90 cells described in (A) for p53, phosphorylated p53 at serine 15 (p-p53 S15) and SOCS1 levels. E. DAVID analysis (Kegg pathway) of Affymetrix microarray experiment performed on triplicates of IMR90 cells expressing E7 and either constitutively active STAT5A (cS5A) combined with a control shRNA (NTC) versus cells expressing cS5A combined with an shRNA against SCOS1 (shS1), collected 7 days after infection. F. Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) of differentially regulated genes between the conditions in (D). G. GSEA of differentially regulated genes. I. H. DiRE analysis of genes differentially regulated between cS5A NTC and cS5A shS1 conditions of the Affymetrix microarray analysis. I. QPCR validation in IMR90 cells expressing the same constructs as mentioned in (A), for the p53 target genes identified by the microarray analysis. All experiments were performed three times, error bars indicate SD of triplicates (growth curves) or standard errors of triplicates (QPCR), *= $p < 0.05$, using the Student's t test. **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.005$.

Figure 2.2 Correlation between SOCS1 and p53-target gene expression in hepatocellular carcinoma samples. The TCGA dataset human HCC specimens was analysed to determine the correlation between the expression of *SOCS1* (x-axis) and the indicated p53 target genes (y-axis), as indicated by the slope. The Spearman correlation (ρ) and the p values are given at the top of each plot.

Figure 2.3 The regulation of p53 target genes by SOCS1 is not dependent on a disabled RB pathway. A. QPCR validation of the p53 target genes identified by microarray analysis but in normal IMR90 fibroblasts expressing either an empty vector (V) or a constitutively activated

STAT5A (cS5A) and with either a control shRNA (shNTC) or an shRNA against SOCS1 (shS1). Cells were collected 7 days after infection. B. SOCS1 knockdown efficiency measured by qPCR in the conditions described in (A). C. Status of the cells was assessed at the day of RNA collection (day 7 post infection) with a Senescence-Associated β -Galactosidase staining. Positively stained and unstained cells were counted under a light microscope in order to obtain the percentage of senescent cells. D. Growth curves. Normal human fibroblasts (IMR90) were retrovirally infected with either an empty vector (V) or with constitutively activated STAT5A (cS5A) and with either a control shRNA (shNTC) or an shRNA against SOCS1 (shS1 a). Cells were counted and plated for the growth assay. E. Western blots of IMR90 cells described in A at day 7 post infection of senescence markers (MCM6, pRb and SOCS1). Tubulin was used as a loading control. All experiments were performed three times, error bars indicate the standard errors of triplicates, * = $p < 0.05$, using the Student's t test, **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.005$

Figure 2.4 SOCS1 overexpression is sufficient to regulate the expression of SOCS1-dependent p53 target genes. A. Western blots of SOCS1 and phospho-p53 (p-p53 S15) in U2OS cells expressing either empty vector (V) or SOCS1 (S1). B. QPCR for p53 target genes in cells as in (A). Cells were collected at day 5 or 7 post-infection. C. Growth curves of IMR90 cells expressing either empty vector (V) or SOCS1 (S1). D. Western blots of SOCS1 and phospho-p53 (p-p53 S15) in IMR90 cells expressing either empty vector (V) or SOCS1 (S1). E. QPCR for p53 target genes in cells as in (C). Cells were collected at day-7 post infection. F. Senescence associated β -galactosidase of IMR90 cells expressing either empty vector (V) or SOCS1 (S1). Cells were fixed and stained at day 12 post- infection. G. QPCR of IMR90 cells expressing either a control shRNA (shNTC) or an shRNA against p53 (shp53) combined with SOCS1 (S1) or empty vector (V) to confirm that the genes in (E) are targets of p53. H. Western blots for the indicated proteins in IMR90 cells expressing a control shRNA (NTC) or an shRNA against p53 (shp53) and also infected with a SOCS1 expressing vector (S1) or a vector control (V). I. Senescence-Associated β -Galactosidase staining. Positively stained and unstained cells were counted under a light microscope in order to obtain the percentage of senescent cells. All experiments were performed three times, error bars indicate the standard errors of triplicates, * = $p < 0.05$, using the Student's t test, **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.005$.

Figure 2.5 SOCS1 sensitizes cells to ferroptosis. A. Representative photos of IMR90 cells expressing an empty vector (V) or SOCS1 (S1) and treated 24 hours after plating with 88 μ M tert-butyl-hydroperoxide (TBH). Cells were assayed for cell death 16 hours after treatment. B. Quantification of cell viability portrayed in (A) by Trypan blue staining. C. SLC7A11 mRNA levels measured by qPCR of IMR90 cells described in (A). D. Representative photos of U2OS cancer cells expressing either V or S1 by retroviral infection and treated 24 hours after plating with 350 μ M TBH for 16 hours. E. Quantification of cell viability of U2OS cells as portrayed in (D) by Trypan blue staining. F. Relative SLC7A11 mRNA expression measured by qPCR in U2OS cells expressing either V or S1 as described in (D). G. Representative photos of U2OS cancer cells expressing either V or S1 by retroviral infection and treated 24 hours after plating with either 350 μ M TBH alone, 100 μ M Deferoxamine mesylate (DFO) alone or the combination of both drugs. H. Quantification of cell viability portrayed in (G) by Trypan blue cell counts. I. GSH quantification in U2OS cells expressing either V or S1. All experiments were performed three times, error bars indicate the standard deviation of triplicates, * = $p < 0.05$, using the Student's t test, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.005$.

Figure 2.6 Ferroptosis sensitivity in senescent cells depends on the trigger (A) Senescence was assessed by staining cells for the Senescence-Associated β -Galactosidase in IMR90 cells expressing either a control vector (V), the RASV12 oncogene (RAS), PML or STAT5A (cS5A). (B) Immunofluorescence of SOCS1 (α -SOCS1) and phosphorylated ATM at S1981 (α -ATM) in IMR90 cells rendered senescent by overexpressing the RASV12 oncogene compared to IMR90 expressing a control vector (Vector). (C) QPCR for mRNA levels of SOCS1-dependent p53 target genes in IMR90 cells expressing a control vector (V) or rendered senescent by overexpression of RASV12 (RAS) or PML (PML). (D) IC50 curves of IMR90 cells overexpressing a control vector (V), the RASV12 oncogene (RAS), PML or STAT5A (cS5A). Cells were treated 24 hours after plating with 12 different doses (0, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 160, 180 and 200 μ M) of tert-butyl-hydroperoxide (TBH). Cells were fixed and stained with Crystal Violet to assess cell death 16 hours after treatment. The dye was then solubilized with acetic acid 10% and measured with a spectrophotometer. (E) The value of IC50 of each condition graphed in D is presented. No IC50 could be calculated for PML as it was resistant at the doses used. (F) GSH quantification in IMR90 cells rendered senescent by overexpression of

RASV12, PML IV or STAT5A, compared with empty vector control (V). All experiments were performed three times, error bars indicate the standard deviation of triplicates, * = $p < 0.05$, using the Student's t test, **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.005$.

Figure 2.7 SOCS1 favors p53 accumulation in response to Doxorubicin. A. Western blots of SOCS1, phosphorylated p53 at serine 15 [p-p53 (S15)] total p53 and tubulin in IMR90 cells expressing either empty vector (V) or SOCS1 and treated with doxorubicin (Doxo: 300 ng/mL) for 3, 6, 9, 16 hours or untreated (-). B. Graphic representation of Western blots as (A). Bands were quantified using image analysis software and normalized to tubulin, then plotted in a graph to show the kinetics of p53 stabilization. C. Co-Immunoprecipitation of KAP1 with SOCS1. U2OS cell lysates of either empty vector cells (V) or SOCS1 overexpressing cells (S1) were immunoprecipitated with an antibody against KAP1 or a control antibody (IP ctl). Western blots against both KAP1 and SOCS1 were performed to confirm the presence of SOCS1 in complex with KAP1. Whole cell lysates (WCL) are used to control the expression of SOCS1 and KAP1 levels. D. Co-immunoprecipitation as described in C. Cell lysates were immunoprecipitated with an antibody against SOCS1 or with a control antibody (IP ctl). Whole cell lysates (WCL) show the expression level of SOCS1 and KAP1. E. Maps of the different KAP1 constructs used in experiments are depicted: KAP1 full length (KAP1), KAP1 with a deletion of its N-terminal RBCC domains (KAP1 Δ N) or KAP1 C-terminus including PHD and Bromo domains (KAP1 PHD/BROMO). F. The constructs depicted in E. were expressed by IPTG induction in BL21 bacterial cells. Expression levels of the various constructs were assessed by migration of an SDS-PAGE gel and Coomassie staining. G. GST pull down was performed on KAP1 constructs which were incubated with radiolabeled SOCS1. Autoradiography revealed the absence or presence of SOCS1 in each pull down. GST was used as a negative control. H. Model for p53 activation by SOCS1 via two pathways.

2.2.9 Tables

Table 2.1 List of SOCS1-dependent p53 target genes identified by microarray analysis

Of note, the microarray data indicates many more known p53 target genes regulated by SOCS1 than found by DAVID. Relevant references for those genes are indicated by their PMID.

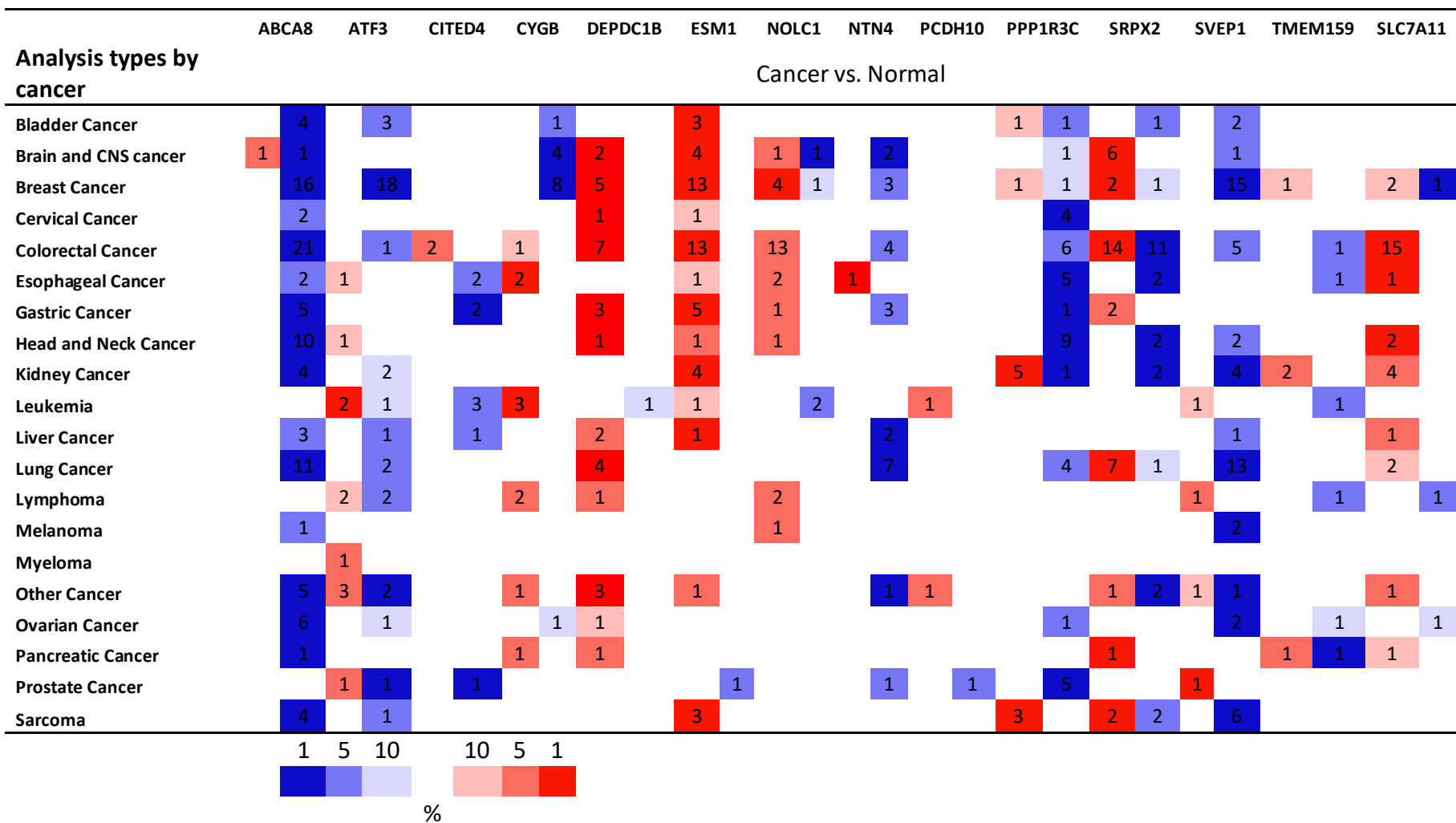
Reported p53 target genes	Fold Change	PMID
DDIT3	-1.79	16917513
GADD45B	-1.74	23948959
IGFBP3	-1.85	20182617
PMAIP1	-1.65	19641509
SERPINE1	-1.52	17882266
LOXL1	-1.81	16888633
DKK1	-2.37	16888633
GDF15	-1.65	16888633
DDB2	-1.47	16888633
SLC7A11	1.58	25799988
ALDH1L2	-1.42	25799988
ABHD4	-1.43	25799988
BCAT1	-1.44	25799988
LRP1	-1.53	25799988
DUSP1	-1.52	25799988
PROCR	-1.52	25799988
RGCC	-2.49	17146433
IGFBP7	-1.72	21095038
SAT1	-1.56	27698118

Table 2.2 List of potential SOCS1 dependent p53 target genes identified by DiRE analysis

For previously linked p53 target genes, PMID is indicated in parenthesis as reference.

DiRE Analysis	Fold change	Function
ABCA8	-1.56	Transmembrane lipid transporter
ATF3	-1.69	Transcription factor, response to stress (16888633)
CITED4	-1.63	Transcriptional co-activator
CYGB	-1.51	Regulation of oxidative stress
DEPDC1B	1.62	Cell adhesion, mitosis regulation
ESM1	-1.53	Secreted factor, role in inflammation and cancer
KIAA1467	1.56	Uncharacterized protein
NOLC1	-1.87	Ribosome biosynthesis (21642980)
NTN4	-1.61	Role in metastasis (25590240)
PCDH10	-1.57	Cell adhesion and motility
PPP1R3C	-1.83	Regulation of glycogen metabolism
SRPX2	-1.83	Role in angiogenesis and migration
SVEP1	-1.67	Cell attachment
TMEM159	-1.73	Uncharacterized protein
ZNF2	-1.53	May be involved in transcriptional regulation

Table 2.3 Cancer vs. Normal expression of SOCS1-dependent p53 target genes identified by DiRE. Red squares signal the number of studies showing upregulation and blue squares the number of studies showing downregulation. Cell color is determined by the best gene rank percentile for the analyses within the cell.



2.2.10 Figures

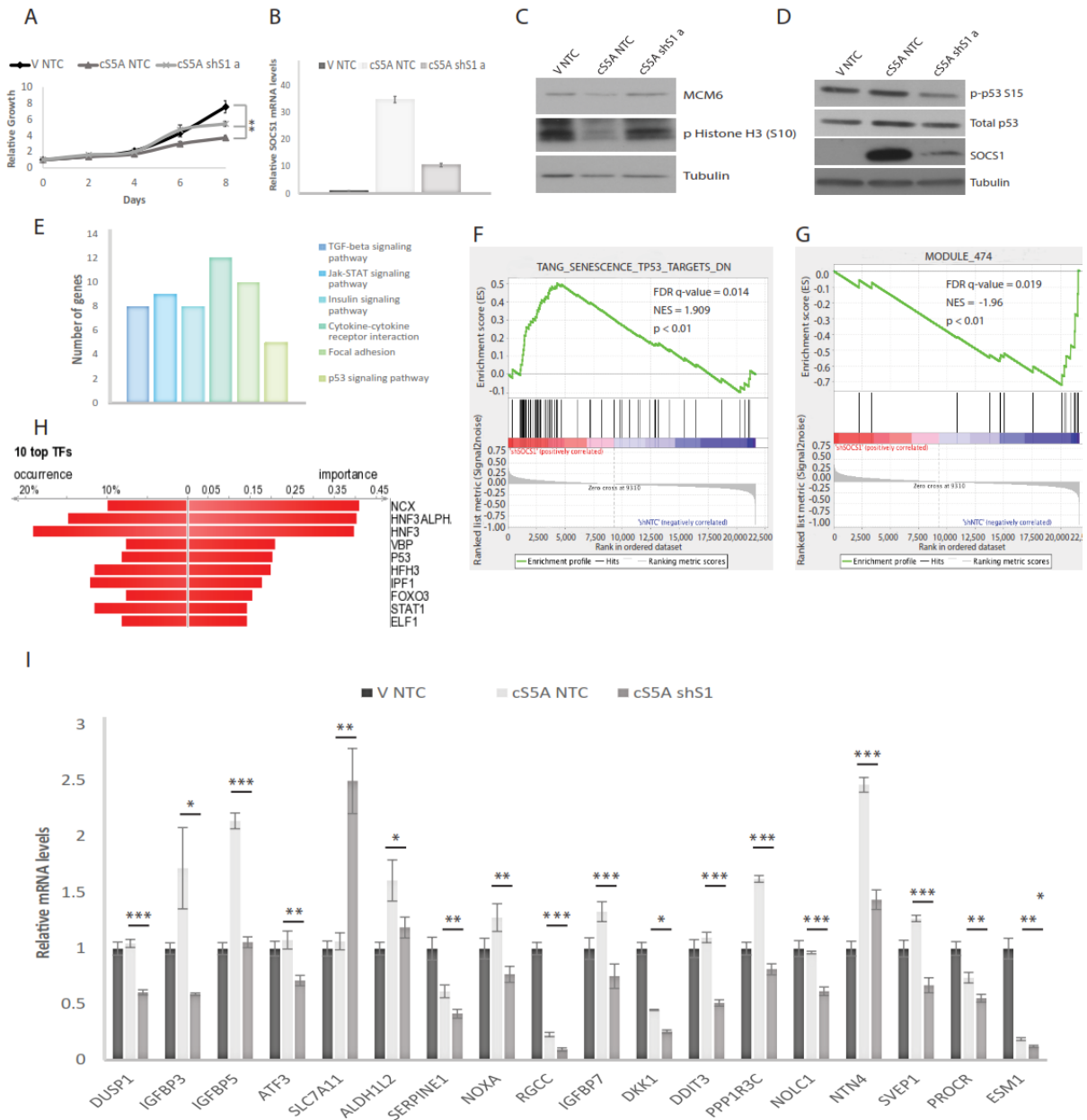


Figure 2.1 Microarray analysis identifies SOCS1-dependent p53 target genes

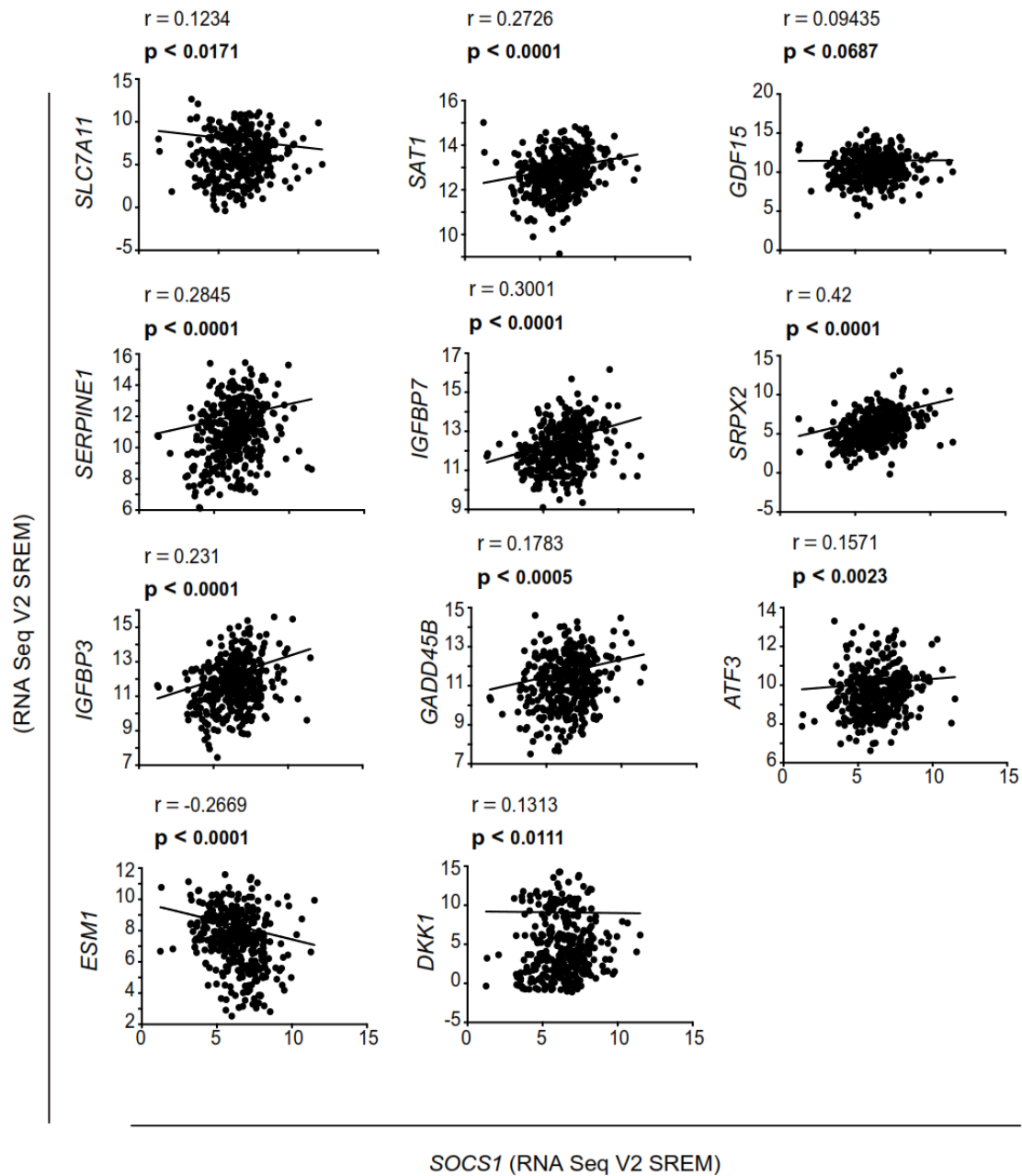
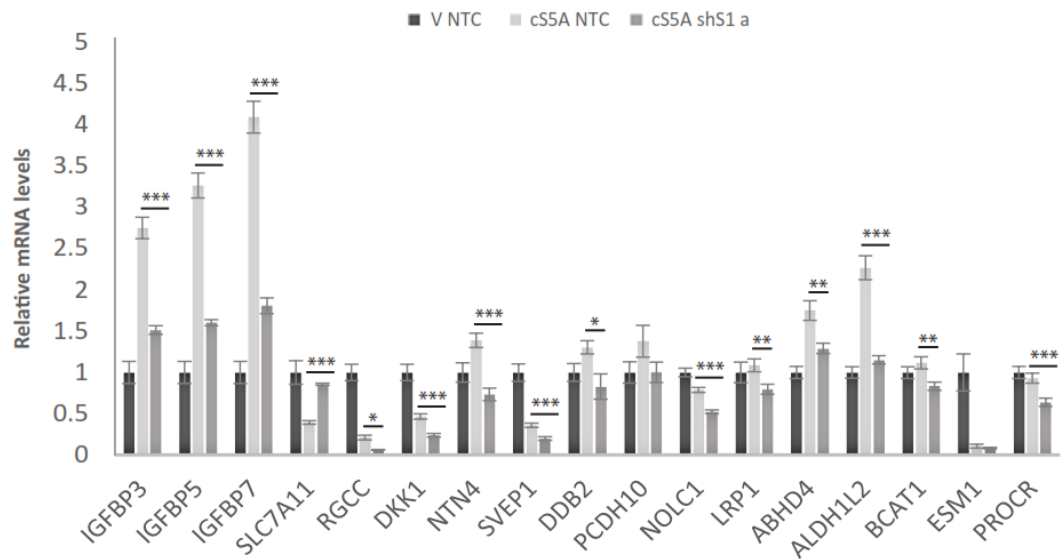
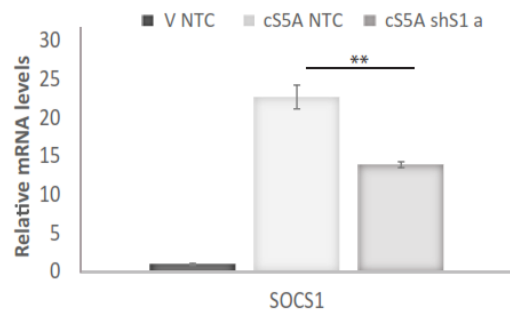


Figure 2.2 Correlation between SOCS1 and p53-target gene expression in hepatocellular carcinoma samples.

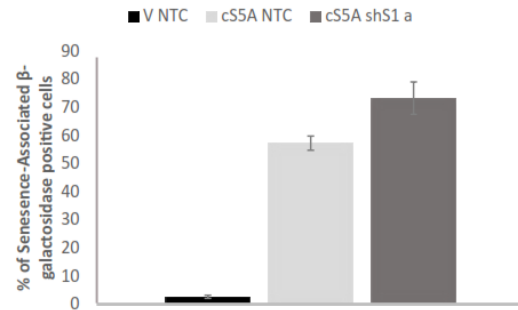
A



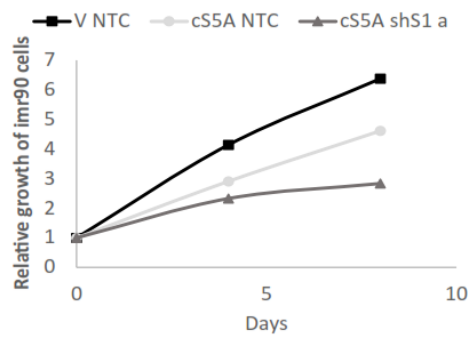
B



C



D



E

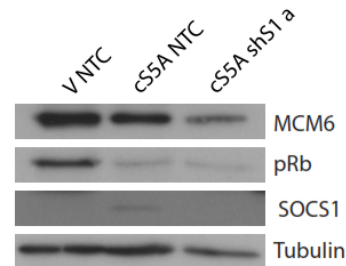


Figure 2.3 The regulation of p53 target genes by SOCS1 is not dependent on a disabled RB pathway

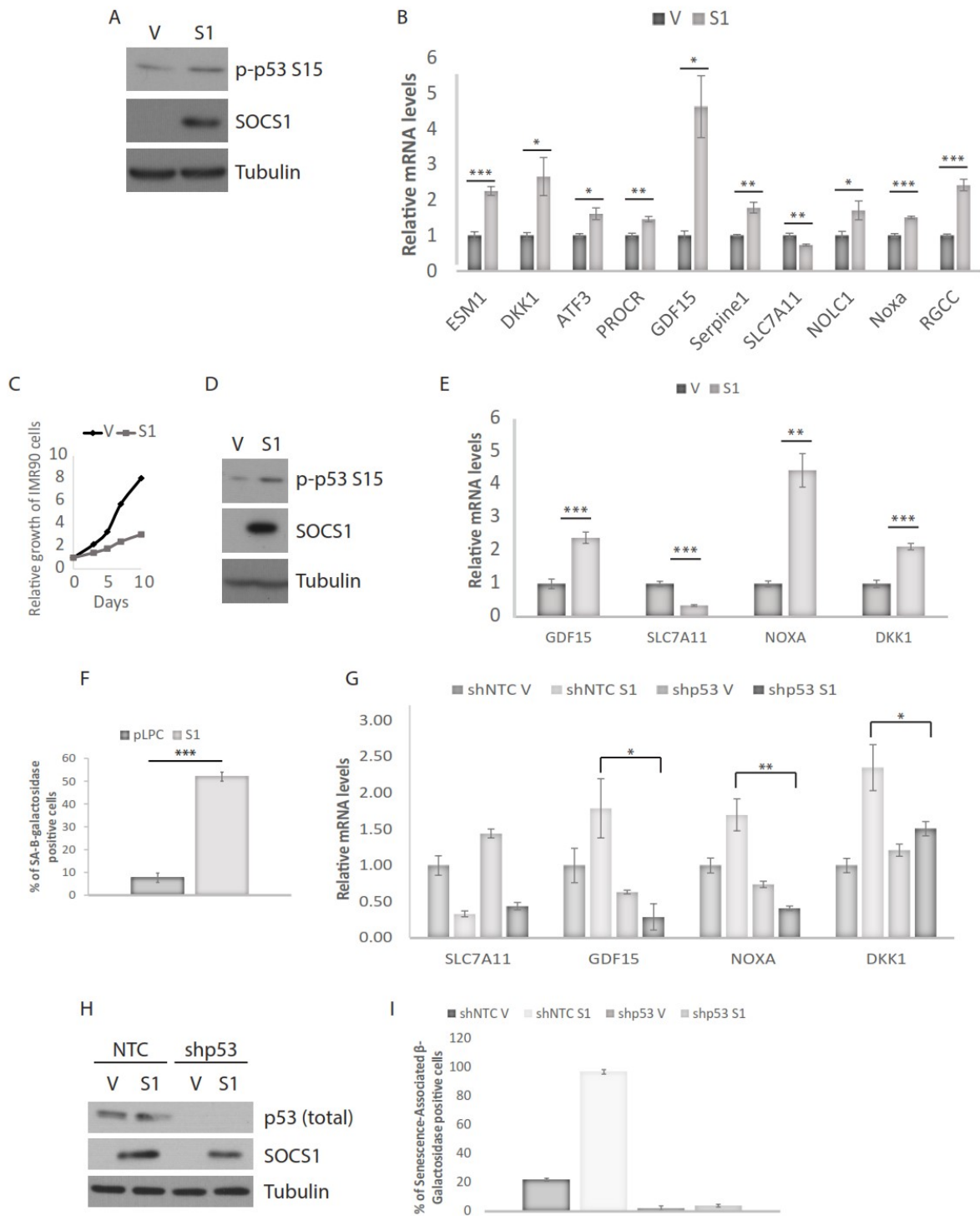


Figure 2.4 SOCS1 overexpression is sufficient to regulate the expression of SOCS1-dependent p53 target genes.

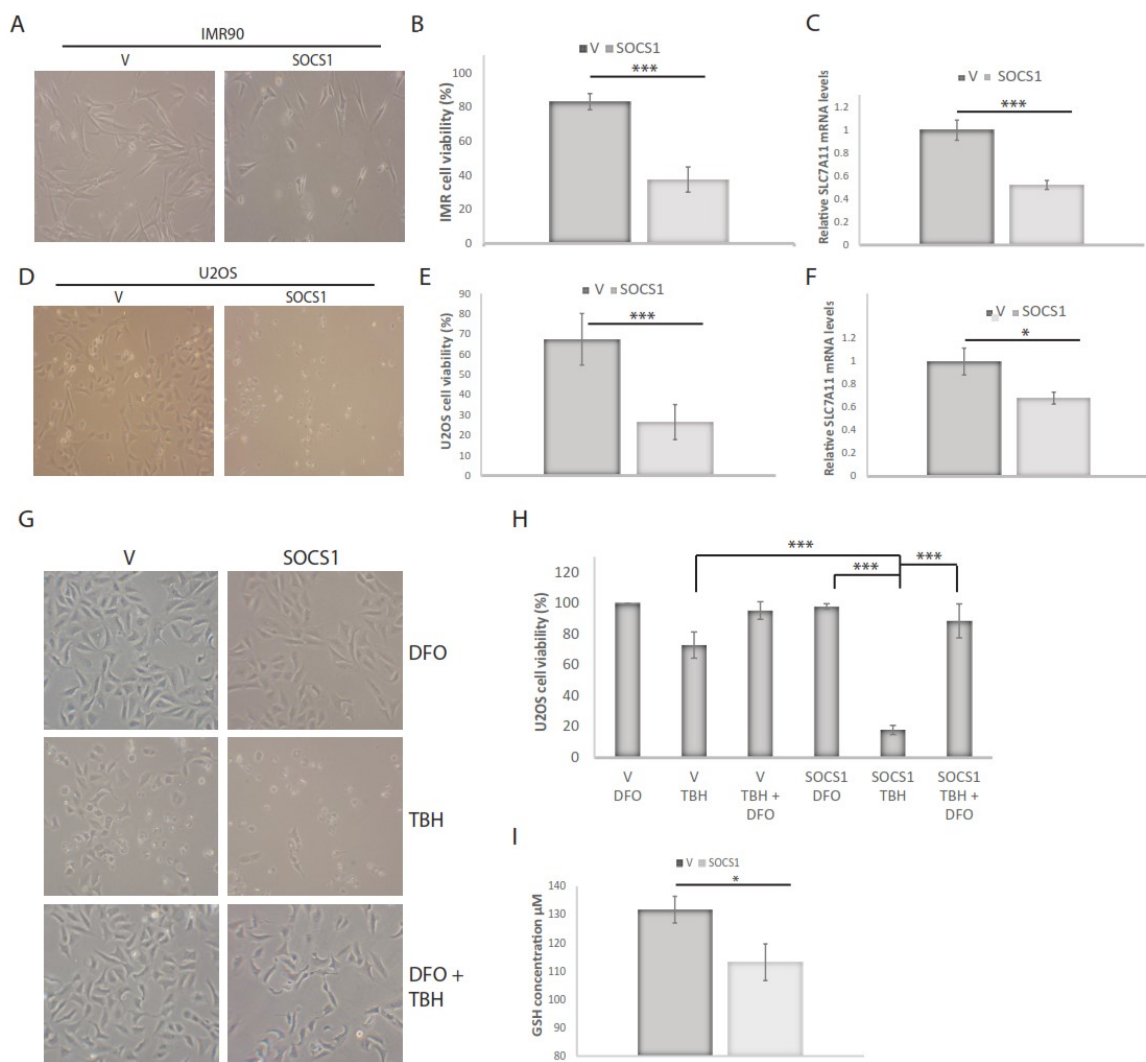


Figure 2.5 SOCS1 sensitizes cells to ferroptosis.

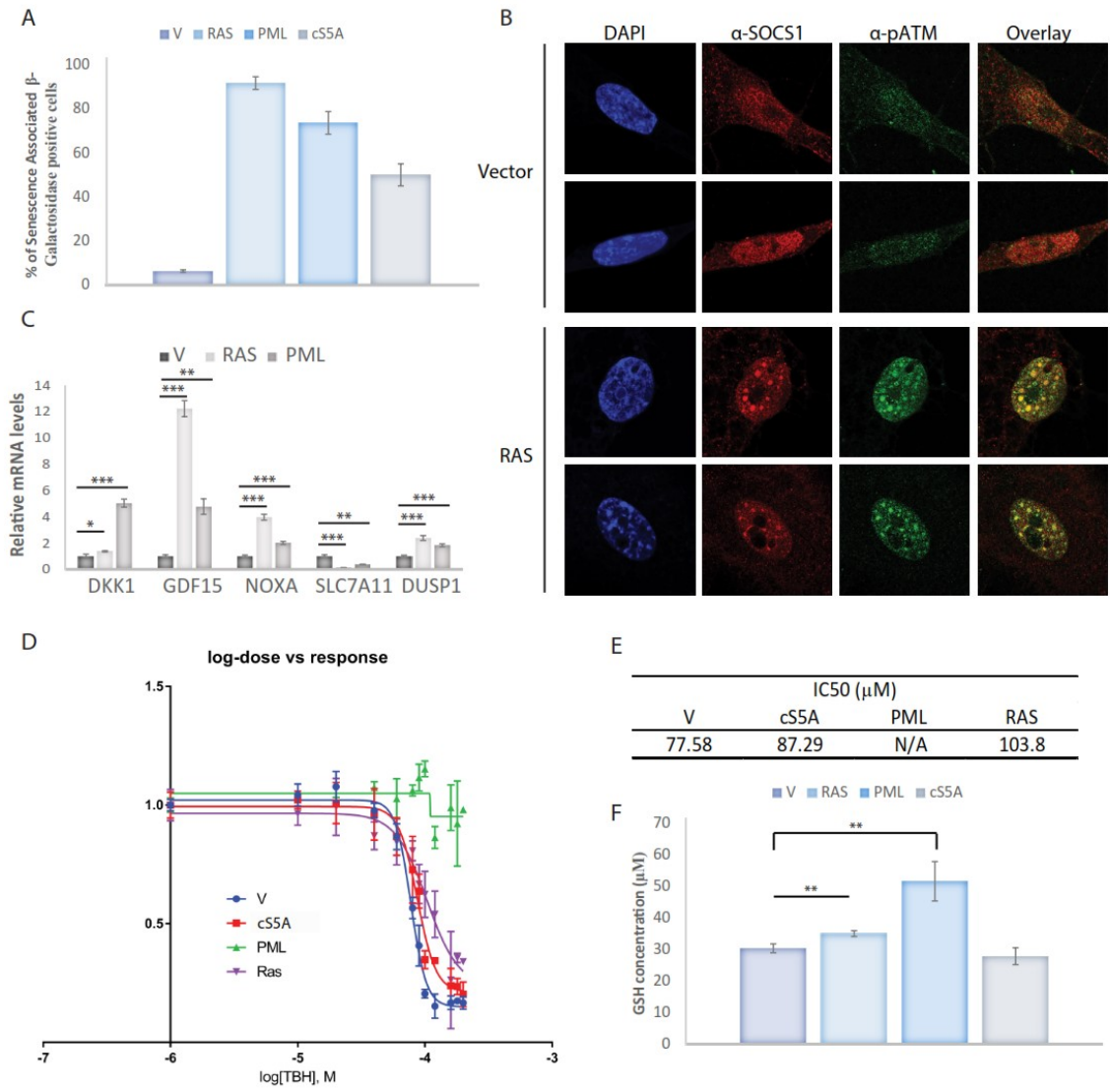


Figure 2.6 Ferroptosis sensitivity in senescent cells depends on the trigger

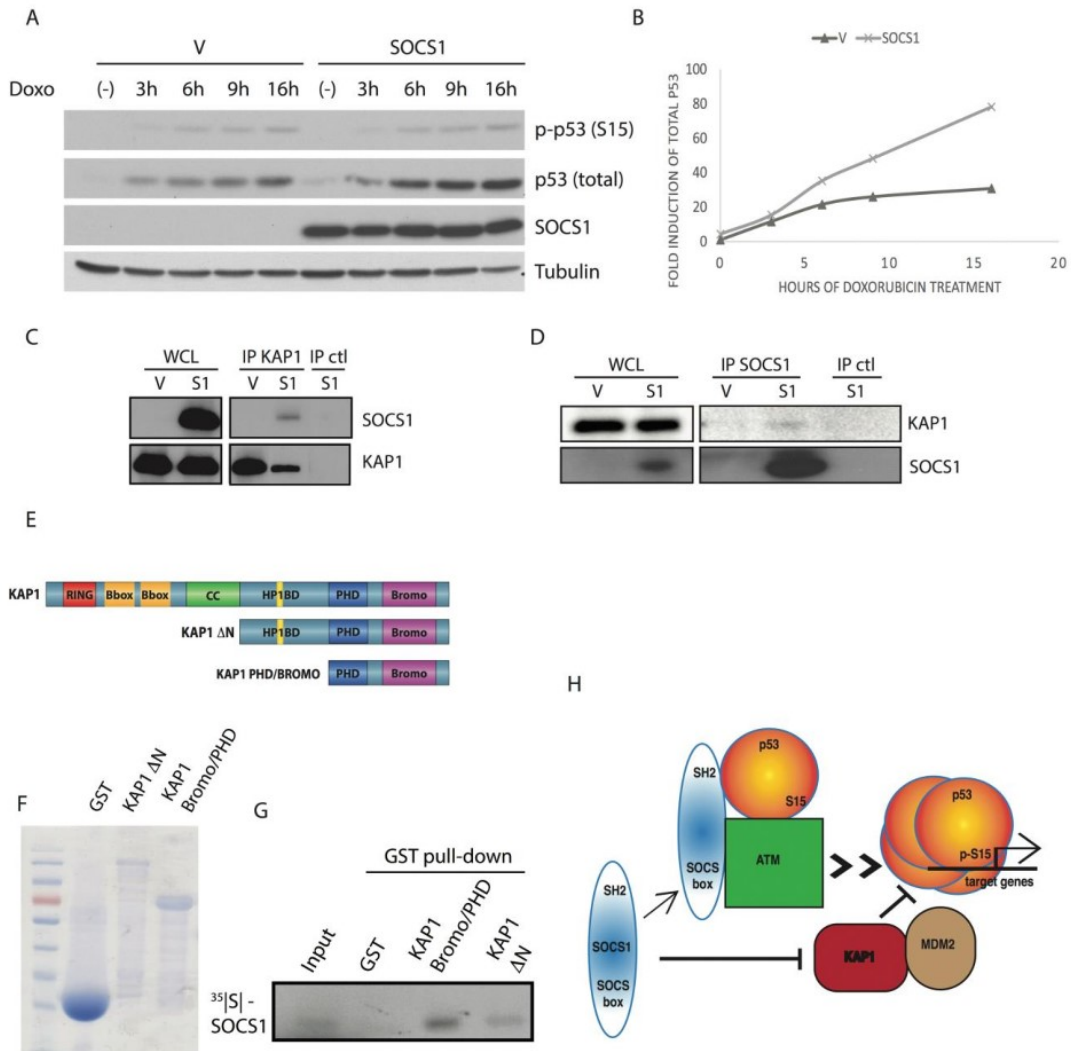


Figure 2.7 SOCS1 favors p53 accumulation in response to Doxorubicin.

2.2.11 Supplementary legends

Figure S2.1 David Analysis identifies Secreted proteins as differentially regulated in cells with SOCS1 knockdown. A. DAVID Analysis of Key words category. B. Genes differentially regulated in the “Secreted” category as identified by David Analysis. C. QPCR validation of secreted factors of the IGFBP family identified by David Analysis in IMR90 cells expressing E7 in combination with either an empty vector (V) or with constitutively activated STAT5A (cS5A) and with either a control shRNA (shNTC) or an shRNA against SOCS1 (shS1). All experiments were performed three times, error bars indicate standard errors of triplicates *= p<0.05, using the Student’s t test, **=p<0.01, ***=p<0.005.

Figure S2.2 Validation of SOCS1-dependent p53 target genes with two shRNAs against SOCS1. A. Growth curves of IMR90 cells expressing E7 with either an empty vector (V) or with constitutively activated STAT5A (cS5A) and with either a control shRNA (NTC) or one of two shRNAs (shS1a or shS1b). B. SOCS1 mRNA levels were measured by qPCR in IMR90 cells expressing the same constructs as described in (A) to assess SOCS1 knockdown efficiency. C. QPCR of SOCS1-dependent p53 target genes in the conditions described previously. All experiments were performed three times, error bars indicate SD of triplicates (growth curves) or standard errors of triplicates (QPCR), *= p<0.05, using the Student’s t test, **=p<0.01 and ***=p<0.005.

Figure S2.3 Correlation between SOCS1 and p53-target gene expression in hepatocellular carcinoma samples separated according to p53 status. The Spearman correlation (ρ) and the p values are given at the top of each plot.

Figure S2.4 GSEA analysis identifies genes sets associated with p53, angiogenesis and lipid oxidation as differentially regulated by SOCS1 knockdown. A. Genes upregulated in a doxorubicin resistance context correlate with genes upregulated in presence of shSOCS1. B. Genes upregulated in a BRCA1 dominant negative context are upregulated in presence of

shSOCS1. C. Genes silenced during tumor angiogenesis correlate with genes upregulated in the presence of SOCS1. D. Genes upregulated in response to oxidized phospholipids are enriched in the presence of SOCS1.

Figure S2.5 DFO rescues TBH-induced ferroptosis in IMR90 cells. A. Representative photos of IMR90 cells expressing either V or S1 by retroviral infection and treated 24 hours after plating with either 88 μ M tert-butyl-hydroxyperoxide (TBH) alone, 100 μ M Deferoxamine mesylate (DFO) alone or the combination of both drugs. B. Quantification of cell viability of cells portrayed in A. All experiments were performed three times, error bars indicate SD of triplicates, * = $p < 0.05$, using the Student's t test, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.005$.

2.2.12 Supplementary Figures

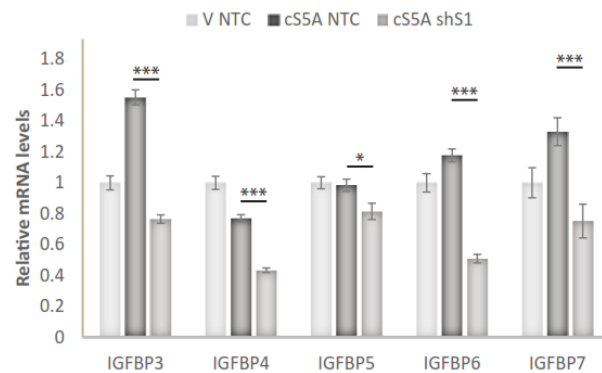
A

Category	Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamini
SP_PIR_KEY WORDS	Secreted	RT		87	19.7	2.90E-15	1.10E-12
SP_PIR_KEY WORDS	signal	RT		119	26.9	1.70E-10	3.30E-08
SP_PIR_KEY WORDS	glycoprotein	RT		137	31	5.30E-08	7.00E-06
SP_PIR_KEY WORDS	disulfide bond	RT		100	22.6	2.90E-07	2.80E-05
SP_PIR_KEY WORDS	egf-like domain	RT		19	4.3	1.60E-06	1.20E-04
SP_PIR_KEY WORDS	extracellular matrix	RT		18	4.1	1.20E-05	8.10E-04
SP_PIR_KEY WORDS	Growth factor binding	RT		5	1.1	2.70E-04	1.50E-02
SP_PIR_KEY WORDS	cell adhesion	RT		20	4.5	1.40E-03	6.60E-02

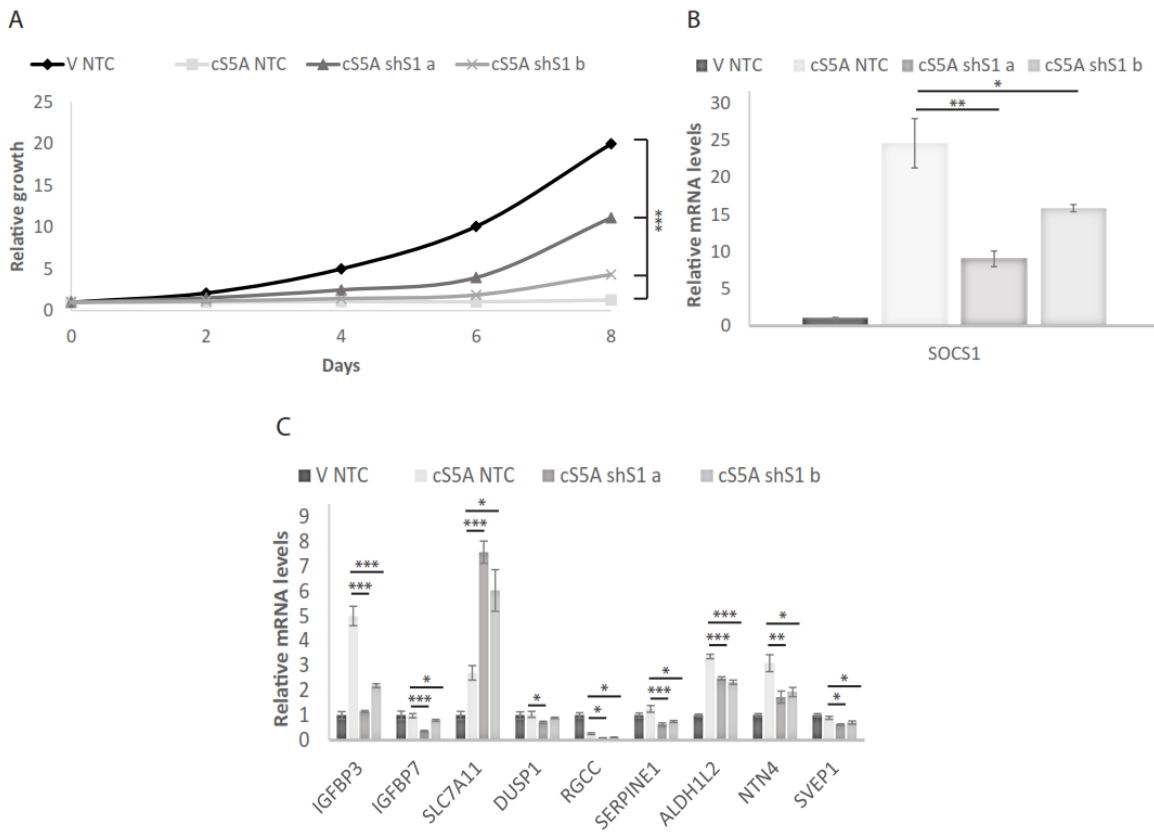
B

Genes from "secreted" group	GENE SYMBOL	Related Genes	Species
Kazal-type serine peptidase inhibitor domain 1	KAZALD1	RG	Homo sapiens
connective tissue growth factor	CTGF	RG	Homo sapiens
endothelial cell-specific molecule 1	ESM1	RG	Homo sapiens
insulin-like growth factor binding protein 3	IGFBP3	RG	Homo sapiens
insulin-like growth factor binding protein 4	IGFBP4	RG	Homo sapiens
insulin-like growth factor binding protein 5	IGFBP5	RG	Homo sapiens
insulin-like growth factor binding protein 6	IGFBP6	RG	Homo sapiens
insulin-like growth factor binding protein 7	IGFBP7	RG	Homo sapiens

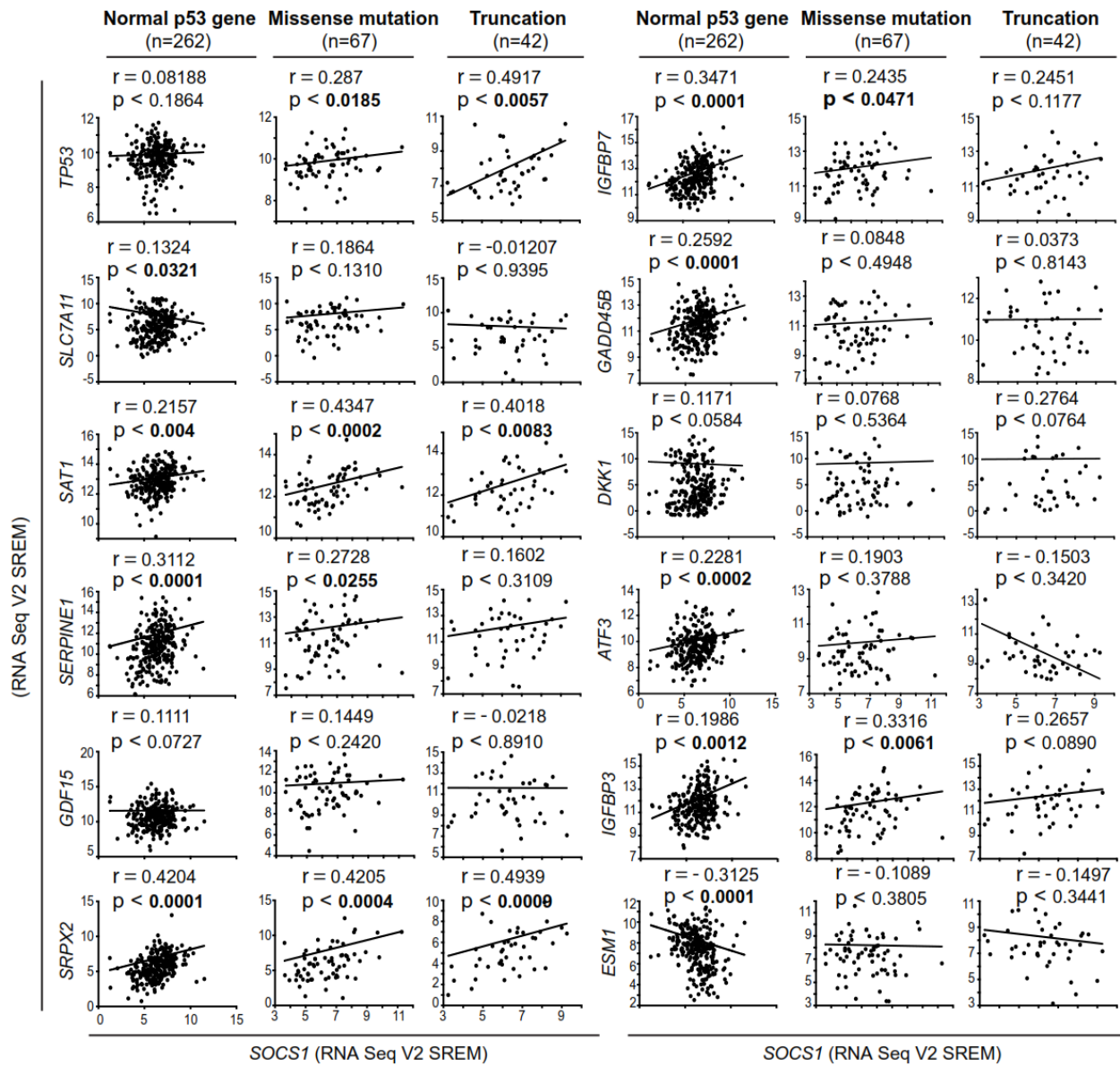
C



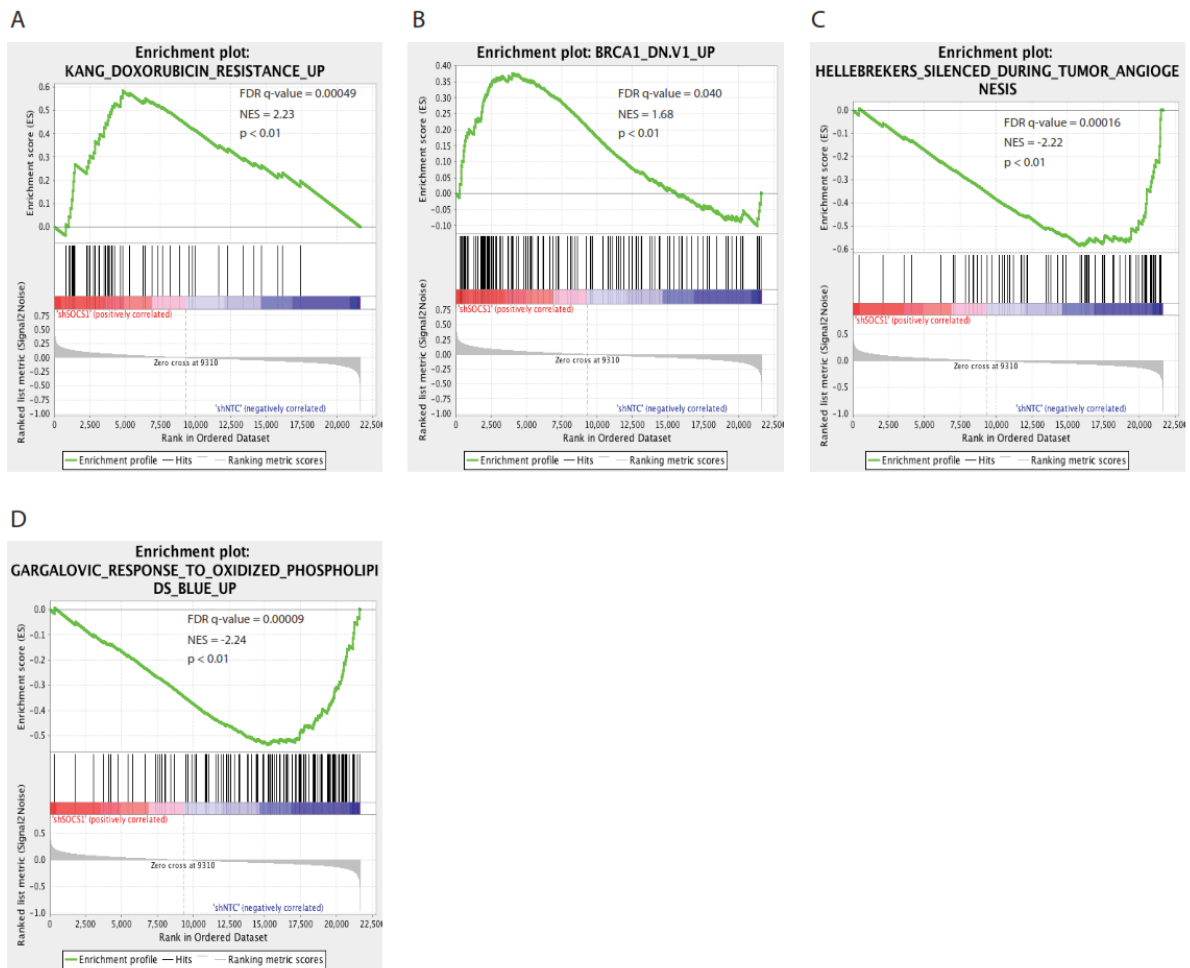
Supplementary figure 2.1 David Analysis identifies Secreted proteins as differentially regulated in cells with SOCS1 knockdown.



Supplementary figure 2.2 Validation of SOCS1-dependent p53 target genes with two shRNAs against SOCS1.

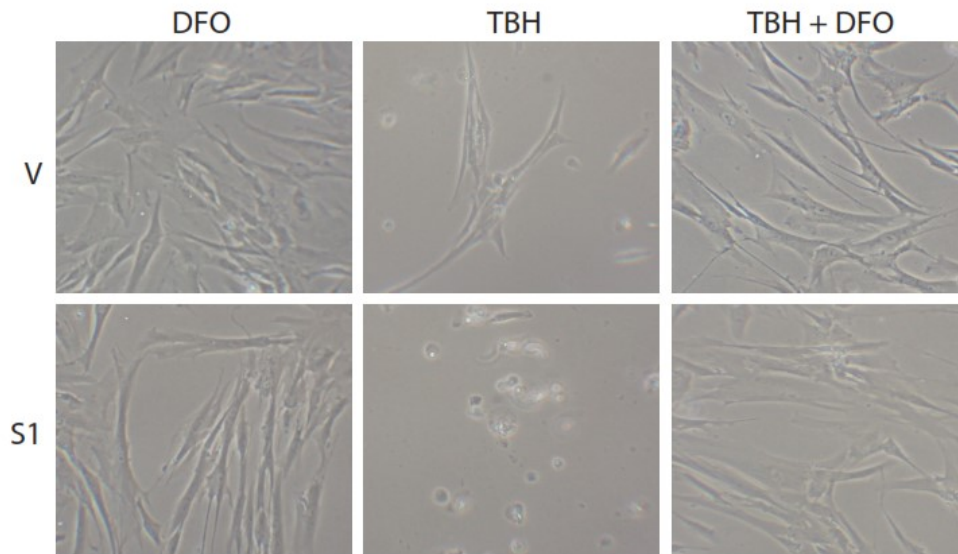


Supplementary figure 2.3 Correlation between SOCS1 and p53-target gene expression in hepatocellular carcinoma samples separated according to p53 status.

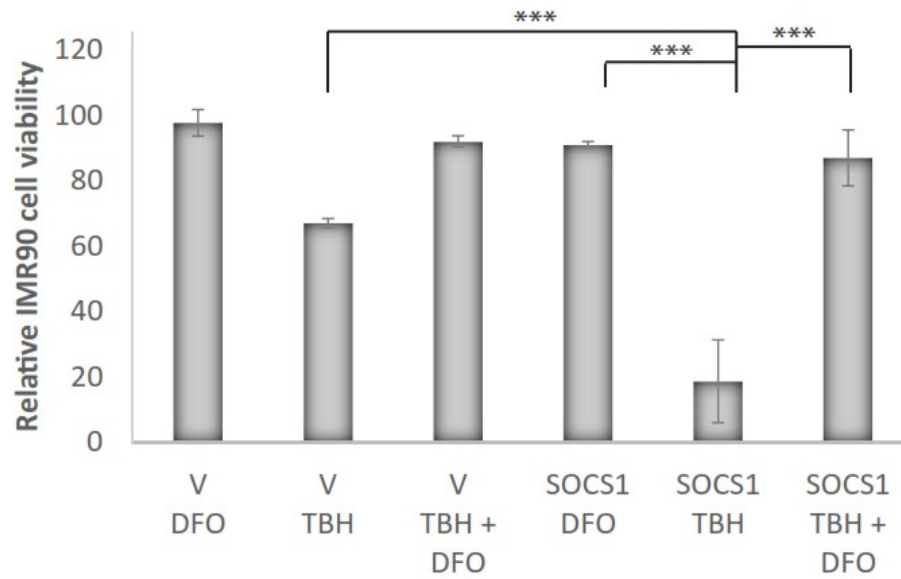


Supplementary figure 2.4 GSEA analysis identifies genes sets associated with p53, angiogenesis and lipid oxidation as differentially regulated by SOCS1 knockdown.

A



B



Supplementary figure 2.5 DFO rescues TBH-induced ferroptosis in IMR90 cells.

3. SRC-family kinases control the SOCS1-p53 axis by phosphorylating SOCS1 on tyrosine 80.

3.1 Présentation de l'article 2

Ce second article avait pour but de décortiquer le mécanisme moléculaire de l'interaction entre p53 et SOCS1 afin de mieux en comprendre la régulation. De nombreuses études d'interactions moléculaires, à la fois directes (GST-pulldown) et cellulaires (co-immunoprécipitation) furent réalisées pour permettre d'identifier les résidus W53 et F54 de p53 et les acides aminés Y80 et W81 de SOCS1 comme étant essentiels à l'interaction entre les deux protéines. L'identification d'une tyrosine a mené à la découverte de sa phosphorylation par la famille des SRC, ce qui a pour effet de moduler les rôles de suppression tumorale de SOCS1. Nous avons aussi pu découvrir que la phosphorylation semble causer une dimérisation de SOCS1. Enfin, nous avons pu montrer que SOCS1 phosphorylé en tyrosine 80 est dérégulé dans les lymphomes B diffus à grandes cellules, ce qui montre un rôle physiologique pour cette phosphorylation.

Cet article sera soumis sous peu à la revue *Molecular Cell*.

Ma contribution est la principale contribution de cet article. J'ai planifié les expériences et effectué la plupart de la culture cellulaire, des essais de colonies, des western blots, des clonages, des qPCRs, des co-immunoprécipitations et des GST pull-downs. J'ai effectué la préparation des protéines recombinantes pour les essais kinases, et réalisé plusieurs d'entre eux. J'ai aussi effectué l'analyse des TMA. J'ai effectué les tests de validation qui ont mené au développement de l'anticorps monoclonal contre SOCS1 phosphorylé en Y80. Lian Mignacca a participé à la culture cellulaire et à la réalisation de plusieurs qPCRs, courbes de croissance dans les IMR90, des co-immunoprécipitations entre SOCS1 et p73 et a effectué l'analyse des TMA en conjonction avec moi (2 comptes indépendants). Elle a aussi effectué l'expérience de dimérisation par co-immunoprécipitation. Frédéric Lessard a participé à la conception et la réalisation des expériences d'essais kinases et de dimérisation de SOCS1. Véronique Bourdeau a aidé à la réalisation des expériences avec les IMR90 dans lesquelles la contribution de p53 a été évaluée par shARN. Elle a réalisé la culture cellulaire, les courbes de croissances et la récolte d'extraits pour le premier réplicat. Elle a aussi effectué les expériences de combinaison de SOCS1 avec les inhibiteurs des SFK dans les IMR90, ce qui comprend la culture cellulaire, les essais de sénescence et les courbes de croissance. Les qPCRs et les Western blots pour ces expériences ont été majoritairement réalisés par moi. Viviane Calabrese a effectué les GST pull-

downs de la figure 1A et 1B, ainsi que la co-immunoprécipitation de la figure 1C et a effectué l'analyse bioinformatique menant au tableau de la figure S1 A. Mariana Acevedo a effectué le test de l'anticorps monoclonal contre SOCS1 phosphorylé sur les MEF en immunohistochimie. Geneviève Huot a aidé avec la culture cellulaire et a fait l'expérience de traitement à l'interféron β visant à mesurer les niveaux de STAT1 et pSTAT1 en réponse à SOCS1 par Western Blot. Marie-Camille Rowell a participé à la réalisation de l'expérience de spectrométrie de masse.

3.2 Article 2

SRC-family kinases control the SOCS1-p53 axis by phosphorylating SOCS1 on tyrosine 80.

Emmanuelle Saint-Germain¹, Lian Mignacca¹, Frédéric Lessard¹, Geneviève Huot, Mariana Acevedo, Viviane Calabrese, Véronique Bourdeau¹, Marie Camille Rowell¹, Subburaj Ilangumaran² and Gerardo Ferbeyre¹

1) Département de Biochimie et Médecine Moléculaire; Université de Montréal; C.P. 6128, Succ. Centre-Ville, Montréal, Québec, H3C 3J7; Canada.

2) Immunology Division, Department of Pediatrics; Faculty of Medicine, University of Sherbrooke, Sherbrooke, Canada

3.2.1 Abstract

Abstract

The tumor suppressor SOCS1 interacts with the transcriptional activation domain 2 of the tumor suppressor p53. The structural motif in SOCS1 that mediates the interaction with p53 is disabled by mutations found at low frequency in human lymphomas. Substitution of tyrosine (Y) 80 in this motif by a phosphomimetic residue inhibited p53-SOCS1 interaction and many of its functional consequences: stimulation of p53 transcriptional activity, growth arrest and cellular senescence. Mass spectrometry indicated that endogenous SOCS1 is phosphorylated *in vivo* at tyrosine 80 (Y80) and a monoclonal antibody specific for this modification stained wild type cells stimulated with growth factors but not Socs1 null cells under similar conditions. Screening of a tyrosine-kinase library led to the identification of the SRC family as Y80-SOCS1 kinases. SRC family kinase inhibitors potentiated the SOCS1-p53 pathway and reinforced SOCS1-induced senescence. The clinical relevance of these findings is demonstrated in samples from human lymphomas that displayed constitutive phosphorylation of SOCS1 on Y80, SOCS1 cytoplasmic localization and SRC family kinase activation.

3.2.2 Introduction

SOCS1 is a 211-amino acid protein composed of an N-terminal region of variable length, a central SH2 (SRC homology) domain, and a C-terminal motif called the SOCS box (Beaurivage et al., 2016). The SH2 domain of SOCS1 recognizes target proteins that are ubiquitinated and targeted to the proteasome by the E3 ligase complex bound to the SOCS box (Kamura et al., 1998). SOCS1 also binds to the tumor suppressor p53 but it does not stimulate its degradation (Bouamar et al., 2015; Calabrese et al., 2009; Shimada et al., 2013). The SH2 domain of SOCS1 interacts with the N-terminal transactivation domain of p53, while the C-terminal domain of SOCS1 containing the SOCS Box mediates interaction with the DNA damage regulated kinases ATM/ATR. SOCS1 thus serves as an adaptor for ATM/ATR-dependent phosphorylation of p53 and the activation of its tumor suppression functions (Calabrese et al., 2009; Cui et al., 2016; Mallette et al., 2010; Shimada et al., 2013).

SOCS1 expression is reduced in human cancers due to DNA methylation or miRNA-mediated silencing (Bouamar et al., 2015; Chevrier et al., 2017; Chim et al., 2004; Ekmekci et al., 2004; Hatirnaz et al., 2007; Jiang et al., 2010; Kobayashi et al., 2012; Liu et al., 2003; Merkel et al., 2015; Sutherland et al., 2004; Zardo et al., 2002; Zhao et al., 2013). In some patients with B cell lymphoma and many patients (61%) with Hodgkin lymphoma, SOCS1 is mutated (Lennerz et al., 2015; Mestre et al., 2005; Mottok et al., 2007; Reddy et al., 2017). Taken together, the data referred above suggest that SOCS1 is a tumor suppressor gene. On the other hand, SOCS1 can also exert oncogenic activities, showing increased levels in some tumors (Berzaghi et al., 2017; Reddy et al., 2012; Tobelaim et al., 2015). Enforced expression of SOCS1 in many different tumor cell types leads to a potent antiproliferative activity (Calabrese et al., 2009; Tagami-Nagata et al., 2015). Intriguingly, while overexpression of SOCS1 in melanoma inhibits tumor progression (Tagami-Nagata et al., 2015), most melanomas have increased levels of endogenous SOCS1 (Berzaghi et al., 2017). The molecular mechanisms explaining how SOCS1 displays contrasting activities in tumors remains to be identified.

One hallmark of tumor cells is their ability to sustain cell proliferation, typically by activating tyrosine kinase signaling pathways (Hanahan and Weinberg, 2011). Tyrosine kinases altered in cancers include receptor tyrosine kinases (RTKs) that initiate signal transduction pathways via both serine/threonine kinases and non-receptor tyrosine kinases (Parsons and

Parsons, 2004). The activation of multiple protein kinases provides tumors with a unique molecular context that may alter the function of proteins with tumor suppressor activities. Here, we report that SOCS1 interacts with p53 using a novel protein-protein interaction motif regulated by phosphorylation via the SRC family of non-receptor tyrosine kinases. SOCS1 phosphorylation at Y80 interferes with p53 binding and induction of senescence but this process can be reverted using SRC-family tyrosine kinase inhibitors. In human lymphomas, increase in SOCS1 phosphorylation at Y80 correlates with SOCS1 cytosolic localization, reduced nuclear staining and activation of SRC family kinases.

3.2.3 Results

SOCS1 interacts with the transcriptional activation domain 2 of p53

The SH2 domain of SOCS1 constitutes a protein-protein interaction domain allowing target recognition. Previous work concluded that the SH2 domain of SOCS1 (residues 79-170) mediates the interaction to the N-terminal domain of p53 (residues 1-72) (Calabrese et al., 2009). The N-terminus of p53 contains two tandem transcriptional activation domains known as TAD1 (residues 1-34) and TAD2 (residues 35-67). Using GST pull downs assays and 35S-labelled SOCS1 produced by in vitro translation, we found that p53 interacts with SOCS1 via the TAD2 (Figure 1A). The p53 TAD2 binds to the pleckstrin homology (PH) domain of the general transcription factor GTF2H1 (also named p62) using three hydrophobic residues (F54, W53 and I50) and two acidic residues (E51 and E56) (Di Lello et al., 2006). It also contains an important phosphorylation site (S46) that regulates p53-dependent gene expression and enhances binding to both p62 and Tfb1 (Di Lello et al., 2006). Mutations in S46 or S46 combined with E51 or E56 did not significantly alter the binding of the p53 TAD2 to SOCS1 in GST-pull down assays (Figure 1B). However, changing W53 to S or F54 to S strongly reduced the binding between the TAD2 and SOCS1 while changing residues 50-52 (I-E-N) to A did not inhibit the binding (Figure 1B).

The TAD2 of p53 shares a structural similarity to many other transcriptional activation domains (Supplementary figure 1A), suggesting that SOCS1 may also modulate other transcription factors containing this hydrophobic motif. SOCS1 was reported to bind NF- κ B (Strebovsky et al., 2011) and KAP1 (Saint-Germain et al., 2017) and we show here that it also

binds p73 (Supplementary figure 1B). The biological significance of SOCS1 binding to transcription factors may depend on context and suggests the presence of a specific domain in SOCS1 that binds transcriptional activation domains.

A novel interaction pocket in the SH2 domain of SOCS1 mediates interaction with p53

The interaction of SOCS1 with p53 required the SH2 domain of SOCS1 (Calabrese et al., 2009), which is known to recognize phosphotyrosine-containing motifs via its conserved arginine at position 105 (104 in human) (De Sepulveda et al., 1999). However, R105K SOCS1 mutant was still able to bind and activate p53 (Calabrese et al., 2009). In addition to R105, other positively charged residues of SOCS1 assist phosphotyrosine binding (Giordanetto and Kroemer, 2003). Still, the mutants R110A, R128A, K119A and K119E were able to bind p53 (Figure 1C). The SH2 domain of SOCS1 has an N-terminal extension of 24 residues that are also important for binding to JAK2 (Narazaki et al., 1998). Intriguingly, several point mutations and deletions towards the end of this region were found in diffuse large B-cell lymphoma and Hodgkin's disease including the substitutions F79C, Y80C and W81R (Supplementary figure 2A). We recreated these mutations and found that the mutants of SOCS1 Y80D, Y80S, W81R and the double mutant 79C/81R all lost their ability to interact with p53 (Figure 1D). SOCS1 also interacts with tyrosine phosphorylated JAK2 (Yasukawa et al., 1999), inhibiting JAK2-dependent STAT1 phosphorylation in response to interferon stimulation (Supplementary figure 3A-B). Quantification of the results shows that while SOCS1 reduces STAT1 phosphorylation, most of the mutants were defective indicating that the region around Y80 also control this event. We conclude that the SH2 domain of SOCS1 can establish non-canonical (tyrosine phosphorylation independent) interactions with p53.

We previously showed that SOCS1 reduced colony formation in p53 wild type U2OS cells but not in p53 null H1299 cells (Calabrese et al., 2009). Consistent with the p53 dependence of SOCS1 anti-proliferative effects in these cells, the mutants that cannot bind to p53 lost the ability to inhibit cell proliferation (Figure 1E). As expected, neither SOCS1 nor the mutants G78S, Y80D and W81R inhibited growth in p53 null H1299 cells (Supplementary figure 3C-D). In contrast, the phosphor-mutant SOCS1Y80F inhibited colony formation in

U2OS cells in a comparable manner to wild type SOCS1, while conserving its ability to bind to p53 (Supplementary figure 3E-F). Next, we studied the ability of SOCS1 to cooperate with the DNA damaging drug doxorubicin to activate a luciferase reporter with the p53 responsive p21 promoter. We found that the phosphomimetic SOCS1Y80D mutant was not able to cooperate with doxorubicin to stimulate transcription from this promoter (Figure 1F-G). Taken together, these results indicate that the region of SOCS1 containing amino acids Y80 and W81 mediate binding to p53 and its functional activation, and that phosphorylation of SOCS1 at Y80 inhibits this function.

Subsequently, we investigated whether mutations that inhibit p53 binding to SOCS1 also reduce its ability to induce p53-dependent senescence in normal human fibroblasts. As reported before, expression of SOCS1 in normal human fibroblasts IMR90 inhibited cell proliferation, induced p53 and p21 and resulted in the accumulation of cells positive for the senescence associated β -galactosidase. Knockdown of p53 with a specific shRNA totally prevented these effects (Figure 2A-C). The SOCS1 mutant Y80D was defective in inducing senescence (Figure 2A) and growth arrest (figure 2C), while the mutant SOCS1Y80F behaved as the wild type (Figure 2A-C). Quantification of the effects of SOCS1 on additional senescence markers show significant defects in the ability of SOCS1Y80D to induce the senescence biomarkers β -fucosidase (Fuca) (Hildebrand et al., 2013) and Serpin E1 (Kortlever et al., 2006), while SOCS1Y80F was even better than the wild type at stimulating these genes (Figure 2D-G). Consistent with previous work (Calabrese et al., 2009), the ability of wild type SOCS1 to induce senescence correlated with the stimulation of phosphorylation of p53 on serine 15. However, the mutant SOCS1Y80D lost this ability, while it was retained by the Y80F mutant (Figure 2H). In summary, the p53-dependent pro-senescent function of SOCS1 is inhibited by a phosphomimetic mutation of the p53 interacting pocket of SOCS1, suggesting that SOCS1 phosphorylation at Y80 is a crucial regulator of this function.

SOCS1 is phosphorylated at Y80 by SRC family kinases.

To investigate whether SOCS1 is phosphorylated at Y80 we incubated purified mouse SOCS1 with whole cell lysates from three different cell types (BV173, HepG2 and IMR90) and

then performed mass spectrometry on the SOCS1 protein band obtained after SDS-PAGE. The peptides analyzed included peptides phosphorylated on Y80 as indicated in Figure 3A with the mass spectra. The sequence of the identified phosphorylated peptide is shown in Figure 3B.

To identify candidate kinases that can phosphorylate SOCS1 and inhibit its interaction with p53, we used a bank of activated tyrosine kinases pooled in five groups of 4-5 kinases each. Kinases of group 1 reduced p53-SOCS1 interaction (Figure 3C) and were further analyzed. Among the kinases in this group, the SRC family kinase YES1 appreciably reduced p53-SOCS1 interaction (Figure 3D) and co-immunoprecipitated with SOCS1 in U2OS cells overexpressing SOCS1. The endogenous YES1 protein was immunoprecipitated for this experiment (Figure 3E). To further investigate SOCS1 phosphorylation at Y80 and the role of the SRC family kinases in the process we generated a monoclonal antibody capable of recognizing SOCS1 phosphorylated at Y80. To validate this antibody we first stimulated wild type or SOCS1 null MEFs with EGF and performed both immunoblots and immunohistochemistry. We could not detect any signal in immunoblots but a strong signal was observed in the immunohistochemistry of wild type MEFs stimulated by EGF but absent in SOCS1 null MEFs under similar conditions (Figure 3F). Next, we used purified SOCS1 and performed *in vitro* kinase assays with either YES1 or the related kinase SRC. The antibody recognized SOCS1 in immunoblots after incubation of SOCS1 with these kinases in the presence of ATP and the signal was decreased by the mutation of Y80F (Figure 3G). Interestingly, after the *in vitro* phosphorylation reactions, SOCS1 migrated at a molecular weight corresponding to a dimer. Heating the protein extracts in the presence of 8M urea allowed to visualize phospho-SOCS1 with a molecular weight corresponding to the monomeric protein of 24 kDa. Most of phosphorylated SOCS1 migrates as a dimer in SDS-PAGE gels (Figure 3H) suggesting that phospho-SOCS1 efficiently forms very stable dimers or that mainly SOCS1 dimers are phosphorylated by YES1. We confirmed that this dimeric form of SOCS1 exists in cells by doing a co-immunoprecipitation between a FLAG-tagged SOCS1 and a MYC-tagged SOCS1 (Figure 3I).

SRC family kinase inhibitors potentiate p53 activation and senescence in SOCS1 expressing cells.

SRC family kinase (SFK) inhibitors have been developed and are under clinical evaluation as cancer therapeutics (Dos Santos et al., 2013). These inhibitors could potentially reactivate the SOCS1-p53 pathway in tumors overexpressing SOCS1, triggering antitumor responses. First, we confirmed that SFK inhibitors could block the phosphorylation of SOCS1 by SRC in an in vitro kinase assay using purified SOCS1 incubated with SRC kinase and different concentrations of dasatinib, (0, 4 nM or 100 nM). SOCS1 was phosphorylated in the absence of dasatinib, but the drug totally blocked SOCS1 phosphorylation at a concentration of 100 nM (Figure 4A). To investigate whether SFK inhibitors can potentiate the SOCS1-p53 pathway, we first evaluated their effect on the p53-dependent-senescence response triggered by SOCS1 in normal human fibroblasts. Introduction of SOCS1 in IMR90 cells reduced cell growth and induced senescence in around 50% of the cells (Figure 4B). Combining SOCS1 with the SFK inhibitors dasatinib or saracatinib revealed a significant increase in the percent of senescent cells at doses of these drugs of 20 nM or higher (Figure 4B). This effect correlated with higher levels of serine 15 phosphorylation of p53 (Figure 4C). The reinforcement of SOCS1-induced senescence translated into an improvement of the growth arrest induced by SOCS1 in the cell population (Figure 4D). We also found that SFK inhibitors did not reinforce the growth arrest and senescence induced by a mutant of SOCS1 that cannot be phosphorylated at Y80 (Figure 4E). Hence, the cooperation of SOCS1 with SFK inhibitors depended on Y80.

SOCS1 is phosphorylated at Y80 in human cancers

The presence of SOCS1 mutations in some patients with DLBCL and Hodgkin disease strongly suggest a tumor suppressor role for SOCS1 in these cancers. However, gene expression analysis revealed an unexpected increase in SOCS1 expression in DLBCL, Burkitt lymphoma and follicular lymphoma (Figures 5A and B and Supplementary figure 4A). This is surprising because p53 mutations are not common in DLBCL (Supplementary figure 4B) and SOCS1 could activate p53 and halt tumor progression. In fact, SOCS1 and p53 mutations are mutually exclusive along several types of cancers suggesting that they act in a common pathway

(Supplementary figure 4C). We thus reasoned that for most cases of DLBCL that overexpress SOCS1, SOCS1 Y80 phosphorylation could avoid p53 activation. To investigate whether SOCS1 phosphorylation at Y80 is increased in DLBCL we performed IHC in tissue microarrays containing samples from several lymphoma patients (Supplementary figure 5A). We identified four degrees of staining (negative, mild, moderate and strong) (Figure 5C) in three different cellular compartments (nuclear, peri-nuclear and cytoplasmic) (Supplementary figure 5B). We found a high percentage of strong and moderate cytoplasmic and peri-nuclear staining in DLBCL and other lymphomas, while normal lymph nodes never stained strong and have a higher percentage of moderate nuclear staining (Figures 5D-E). These results are consistent with the idea that SOCS1 phosphorylation at Y80 acts as an oncogenic modification that avoids the tumor suppressor functions of SOCS1.

Next we studied the status of the SRC family kinase in the same tissue microarrays using an antibody that reacts with activated SRC family members. We found that in general, lymphomas stained strongly or moderately for these kinases while normal tissues were mostly negative or mildly stained (Figure 6A-B). In addition, there was a significant correlation between the staining for activated SRC family and for SOCS1 phosphorylation at Y80 (Figure 6C). Consistent with these results, the levels of YES1, another SRC family kinase are elevated in DLBCL (Supplementary figure 4D).

3.2.4 Discussion

Tumor suppressors are often disabled in cancer cells by mutations or expression silencing. However, cancer cells overexpress enzymes that catalyze protein post-translational modifications, some of which could also inactivate tumor suppressors (Sherr et al., 2016). Here, we report that the functions of the tumor suppressor SOCS1 are inhibited by phosphorylation on Y80 and that it is catalyzed by SRC family protein tyrosine kinases. We found that Y80 in SOCS1 is part of a motif that mediates interaction with p53. Mutations in this motif are found with low frequency in human cancers where paradoxically most patients display high levels of SOCS1 expression. Our analysis of samples from several cases of human lymphomas indicates

a frequent SOCS1 phosphorylation on Y80 suggesting a mechanism that explains why these tumors retain high levels of SOCS1.

The SH2 domain is a phosphotyrosine-binding module originally described in the SRC-family of tyrosine kinases (Kim et al., 2009). The motif that mediates the interaction between SOCS1 and p53 includes Y80 and W81 and is located at the beginning of the SH2 domain of SOCS1. This motif is conserved in other SOCS family proteins, including SOCS3, which also binds to p53 (Kong et al., 2012). The tertiary structure of the SH2 domain of SOCS3 shows that the extended SH2 subdomain forms an amphipathic helix, with the hydrophobic side binding the phospho-tyrosine binding loop of the SH2 domain (Babon et al., 2006). Y47 and W48 of SOCS3 (Y80 and W81 in SOCS1) lie to the C-terminal of the extended subdomain forming a loop exposed to the protein surface (Babon et al., 2006; Giordanetto and Kroemer, 2003). Additional structural work will be required to characterize this non-canonical binding mode of SOCS1 which does not require any phosphotyrosine and binds hydrophobic patches present in transcriptional activation domains, including the TAD2 of p53. Phosphorylation of Y80 in SOCS1 can interfere with protein-protein interactions directly by altering Y-mediated contacts with the interaction partner. It is also possible that phosphorylation on Y80 induces conformational changes in SOCS1 that disables its binding to other proteins. In particular, phospho-Y80 could bind the phosphotyrosine binding pocket of the same molecule of SOCS1 or bind to another SOCS1 molecule to form inactive dimers. Of note SOCS1 Y80D mutant was unable to bind p53 or inhibit STAT1 phosphorylation in response to interferon, suggesting that tyrosine phosphorylation of SOCS1 at Y80 is a general mechanism to control its activity (Figure 7).

Furthermore, previous studies have identified phosphorylation as a means of negative regulation of SOCS1. One group identified the fusion protein BCR-ABL, responsible for chronic myelogenous leukemia, as a SOCS1 kinase (Qiu et al., 2012). This publication identified Y155 and Y204 of SOCS1 as the main tyrosines phosphorylated by BCR-ABL. This study shows that phosphorylation of SOCS1 on these sites prevents the inhibition of the JAK/STAT pathway, and mutation of these two tyrosines to phenylalanine suppresses tumor growth (Qiu et al., 2012). Their results show that SOCS1 Y80F is also less phosphorylated in response to BCR-ABL, suggesting that this residue might be a target for this kinase. Our mass spectrometry results

have allowed us to obtain peptides for three out of the four tyrosine-residues in SOCS1, but Y155 and Y204 were not phosphorylated in the three cell lines we looked at, whereas Y80 was phosphorylated.

On the other hand, in the context of cancer cells, phosphorylation of SOCS1 on Y80 can effectively block its tumor suppression activity. In DLBCL, mutations of SOCS1 and p53 are mutually exclusive (Reddy et al., 2017) but most patients overexpress SOCS1 and have wild type p53 (Figure 5). We propose that the SOCS1-p53 axis is mostly disabled by Y80 phosphorylation of SOCS1 in DLBCL and other lymphomas. This suggestion is supported by our data showing high levels of Y80-phosphorylated SOCS1 in the cytosol of cells from patients with those lymphomas and its correlation with high levels of activated SRC-kinases. Of note, SOCS1 is also constitutively expressed and tyrosine phosphorylated in CML cells that express the Bcr-Abl oncogene. However, Bcr-Abl mainly phosphorylates SOCS1 on Y155 and Y204, two events that impair the ability of SOCS1 to target Jak1 and Jak2 for proteasome dependent degradation (Qiu et al., 2012). An important question is whether SRC-family kinase inhibitors can be used to reactivate the SOCS1-p53 axis in tumors with constitutive phosphorylation of SOCS1 on Y80. In cell culture, the induction of p53 and senescence by SOCS1 was potentiated by SRC family kinase inhibitors. Previous work found constitutively high SFK expression in B cell lymphoma cell lines conferring sensitivity to SFK inhibitors (Ke et al., 2009) and data from Oncomine show that DLBCL express high levels of YES1. We thus suggest that SFK inhibitors can be effective in B cell lymphomas and specifically in those patients that have high levels of Y80 phosphorylated SOCS1 and wild type p53.

Acknowledgements

We thank all members of the Ferbeyre laboratory for their useful comments. Proteomics analyses were performed by the Center for Advanced Proteomics Analyses, a Node of the Canadian Genomic Innovation Network that is supported by the Canadian Government through Genome Canada. IHC of TMAs was performed at the IRIC Histology Platform. This work was funded by a grant from the Canadian Institute of Health and Research (CIHR-MOP229774) to GF.

3.2.5 Materials and methods

Cell lines, reagents and retroviral gene transfer. U2OS human cancer cell line was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). Phoenix Ampho packaging cells were a kind gift from Dr. S.W. Lowe. 293T cells were purchased from ATCC and IMR90 cells were obtained from the Coriell Institute. The IMR90 cell line was cultured in DMEM medium (Wisent, cat # 319-015-CL) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Wisent) and 1% penicillin G/streptomycin (P/S, Wisent). The other cell lines were cultured in DMEM medium (Wisent 319-015-CL) supplemented with 5% Fetal Bovine Serum (FBS, Wisent) and 5% Newborn Calf Serum (Wisent) and 1% penicillinG/Streptomycin and 2mM L-Glutamine. Cells were trypsinized using 0.25X Trypsin-EDTA (Life Technologies, cat# 15090-046). Doxorubicin (Sigma) was used at a concentration of 300 ng/mL. Serum starvation experiments were performed by culturing the cells in medium without serum for 16 hours before treating with 100 ng/mL EGF (LifeTechnologies). Dasatinib (#S1021) and Saracatinib (#S1006) were purchased from Selleckhem and resuspended respectively in DMSO and Ethanol. Cells were treated with the selected compounds at doses ranging from 1 nM to 80 nM for long-term treatments, the drug being changed every two days. For signaling experiments, cells were treated with 100 nM dasatinib for 2 hours prior to cell collection. α -Interferon was a kind gift of Biogen, and was used at a final concentration of 1000 U/mL of medium.

Retroviral-mediated gene transfer was performed as previously described (Ferbeyre et al., 2000). Phoenix cells were plated at about 60% confluence for transfection with the Calcium Phosphate method with 20 μ g of each plasmid in 10 cm petri dishes. Culture mediums of transfected cells were changed after twenty four hours. The viral containing mediums were collected 48 to 72 hours post-transfection and added to target cells after being filtered using 0.45 μ m filters (Sarstedt). Viral soups were supplemented with 4 μ g/mL polybrene (Sigma Aldrich) and 10% fresh medium before being added to target cells. The target cells were passaged the day before being infected to insure they are in a proliferation phase during the retroviral infection phase. They were infected with two viral soups for 6-8 hours each.

Infected cell populations were selected with either puromycin (2.5 μ g/ml, 3 days) for simple infections or hygromycin (80 μ g/ml, 5 days) and puromycin (1.5 μ g/ml, 3 days) concomitantly for double selections of IMR90 cells infected with shp53 or shNTC in

combination with pLPC vectors. For U2OS cells infected with pWZLneo containing the kinases in combination with pLPC SOCS1, cells were selected as follows: G418 (600 µg/ml, 7 days) with puromycin (2 µg/ml, 3 days).

Plasmid constructions. The following retroviral vectors were used: pWZL and pWZL Ca-STAT5a was described in (Calabrese et al., 2009). Human SOCS1 gene was cloned in the pLPC vector between BamH1 and EcoR1 sites. All SOCS1 mutants were cloned by PCR amplification using Phusion High Fidelity Polymerase (NEB). GST-SOCS1 was a kind gift from C. Saucier, U. Sherbrooke. pGEX 5x3 GST-p53 was described in (Calabrese et al., 2009). p53 TAD-II (35-67) and mutants of it were generated by site directed mutagenesis in the pGEX 5x3 vector. pRS shGFP and pRS shp53 were described in (Moiseeva et al., 2009). The activated kinase library was a kind gift of Dr D. Bernard (Ferrand et al., 2015). The different kinases are all cloned in pWZL neo and constitutively activated (by addition of an N-terminal myristoylation sequence).

Colony Assays and growth curves. For Colony Assays, U2OS cells were transiently transfected using the Calcium Phosphate method with 20 µg of the different pLPC, pLPC SOCS1 wt or pLPC SOCS1 mutant vectors. Cells were selected with 1.5 µg/mL of puromycin for 3 days and then counted and plated (10 000 cells per well) in 6-well plates. Cells were fixed with 1% glutaraldehyde at Day 0 to account for plating and after 10 days of growth. Cells were colored using Crystal Violet. The dye was resuspended in 10% acetic acid and quantified using a spectrophotometer. For growth curves, IMR90 infected cells were counted and plated after selection (10 000 cells per well) in 12-well plates and fixed every 2-3 days for 10 days. Cells were fixed, stained and quantified as described for colony assays.

Senescence-Associated β-Galactosidase staining. Cells were fixed for 15 minutes at room temperature in 0.5% glutaraldehyde, washed with PBS 1mM MgCl₂ adjusted at pH 6.0. Cells were then incubated at 37°C with freshly prepared XGAL solution (1 mg/mL 5-bromo-4-chloro-3-indolyl P3-D-galactoside (X-Gal), 5 mM Potassium Ferrocyanide and 5 mM Potassium hexacyanoferrate in PBS 1mM MgCl₂ pH 6.0). Staining becomes evident after 2-6 hours. Blue cells were then counted under a white light microscope.

Western Blotting. Protein analysis was performed by lysing cells in Cell Lysis Buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 2.5 mM sodium

pyrophosphate, 1 mM β -glycerolphosphate supplemented with a cocktail of protease inhibitors (Complete and PhosStop, Roche). Quantification of protein content was performed with the Bradford method. Extracts were prepared with Laemmli buffer (1X final). For protein detection, 50 μ g of total cells extract was loaded on SDS polyacrylamide gels (10 or 12%). Western blots were performed as described previously (Calabrese et al., 2009). The following primary antibodies were used: anti-SOCS1, clone 4H1 MBL (cat #K0175-6) used at 1:1000 dilution overnight at 4°C. Anti-phospho-p53 (Serine15), NEB (cat #9284) used at 1:1000 dilution overnight at 4°C. Total p53 (DO1 clone), Santa Cruz biotechnology (cat# sc-126) used at 1:1000 overnight at 4°C. Anti-Flag (clone M2), Sigma (#F3165) was used at 1:2000 overnight at 4°C. Anti-pSOCS1 (22B8, mouse monoclonal generated by us) was used at 1:1000 overnight at 4°C. Anti-phospho SRC family (Y416), NEB (cat#2101) was used at 1:500 overnight at 4°C. Anti-p73, Santa Cruz biotechnology (sc-17823) was used at 1:1000 overnight at 4°C. Anti c-YES, Santa Cruz Biotechnology (sc46674) was used 1:1000 overnight at 4°C for the IP extracts. Anti-Alpha Tubulin antibody clone B-5-1-2, Sigma (cat # T6074) used at 1:20,000 one hour at Room Temperature and served as loading control. Signals were revealed by using secondary antibodies coupled to peroxidase (BioRad laboratories) and ECL (GE Healthcare, cat# RPN2106) or Clarity ECL (BioRad #cat 1705061).

Co-Immunoprecipitation : U2OS cells were collected in Cell Lysis Buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM β -glycerolphosphate and a cocktail of protease inhibitors (Roche) and protein concentration was measured using the Bradford method. 2 mg of cell extract from each condition was used for IP and 50 μ g was loaded as input (Whole Cell Lysate). Immunoprecipitation of either p53 (Cell Signaling #9282 Rabbit polyclonal), p73 (Bethyl, A300-126A Rabbit polyclonal), FLAG (FLAG-M2, Sigma) or c-YES (Santa Cruz Biotechnology #sc-14 Rabbit polyclonal) were performed at an antibody dilution of 1:200 overnight at 4°C. Anti-Cyclin A (Santa Cruz #SC-596 Rabbit polyclonal) 1:200 or Rabbit non stimulated IgG (NEB) was used as a control IP. Protein A Sepharose 4B fast flow beads (Sigma #P9424) were used to immunoprecipitate antibody-protein complexes for 1 hour at 4°C. Beads were then washed four times with Cell Lysis Buffer and complexes were eluted by adding

Laemmli 2X buffer directly to the beads. Samples were heated for 5 minutes at 100°C prior to loading on an SDS-PAGE gel for western blotting.

GST-Pulldown. BL21 E. coli strain harbouring each of the p53-GST-fusion vectors were grown at 37°C to an OD of 0.6 in 400 ml YTA 2X medium (16g/l tryptone, 10g/l yeast extract, 5g/l NaCl) and induced with 0.4 mM IPTG for 4 hr at 30°C. Cell pellets were resuspended in STE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl) supplemented with DTT (5mM) and a Protease Inhibitor Cocktail (Roche). Cells were lysed by adding 1mg/mL lysozyme and being incubated 45 minutes on ice prior to sonicating with a microtip five times for 10 s. Extracts were centrifuged (13,000 rpm 10 min) and supernatants were incubated for 2 hr at 4°C with glutathione Sepharose-4B (Amersham) and washed four times with NETN buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0.5% NP-40). Beads were resuspended in PBS after the last wash.

Briefly, 35[S] Flag-SOCS1 was produced by in vitro transcription/translation (Promega #L1170) and incubated with the different GST or GST-p53 purified fusion proteins bound to glutathione Sepharose-4B for 2 hr at 4°C. Equal amounts of GST fusion proteins were used as judged from SDS gel electrophoresis and Coomassie blue staining. Beads were washed 4 times with NETN buffer. Precipitates were eluted in 20 µl of SDS Sample Buffer and 10 µl of Bromophenol Blue and boiled for 5 minutes. Eluates (30 µl) were separated on SDS-PAGE gels, dried and exposed for autoradiography. In one case, radioactive detection was substituted for Western Blotting with the FLAG antibody (for SOCS1 construct detection).

Luciferase assays. Twenty-four hours before transfection, U2OS cells were seeded at 200 000 cells per well in a 12-well plate. The pGL3 promoter vector (1875 ng) or the pGL3 p21 promoter was transfected using Lipofectamine 2000 (LifeTechnologies) with a transfection reagent-reporter ratio of 2.5:1. Renilla luciferase vector under the control of the β-globin (2.5 ng) was used to control transfection levels. pLPC, pLPC SOCS1, pLPC SOCS1 Y80D or pLPC SOCS1 Y80F were co-transfected with the pGL3 reporters (625 ng). The medium was changed after 24 hours. Doxorubicin treatment (300 ng/mL) was added at the same time that the medium was changed and cells were incubated for a further 24 hours. Luciferase activity was assayed using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, Madison, WI, USA).

Real-Time Quantitative PCR (qPCR). Total RNA was isolated using Trizol (Invitrogen). Reverse transcription was performed using 5X All-In-One RT MasterMix (Abmgood) on 2 μ g of total RNA in 20 μ L final volume according to the kit's instructions. Reverse transcription products were diluted 10-fold in RNase free water before proceeding to qPCR. QPCR was performed using primers and probe sets from Roche Universal Probe Library (https://lifescience.roche.com/en_ca/brands/universal-probe-library.html?_ga=1.38905443.192324701.1470126343#overview). 96-well plate formats with SYBR-green technology was used as described previously (Bourdeau et al 2004). Relative target-gene quantification was obtained by using the $\Delta\Delta$ CT method in a light Cyclor 480 (Roche). The mRNA expressions were measured relative to the mRNAs of two housekeeping genes: HMBS and TBP. All forward and reverse primers are listed below.

Gene Symbol	Forward primer	Reverse Primer
CDKN1A	acccttgcctcgctcagg	gcgtttgagtgtagaaatctgt
FUCA1	tgtgcaccagcattgacaagt	tcccaaacttactgtctgaaccag
SERPINE1	cggcaagcaagtggacttttc	ggctccttccaagcaagt
GADD45a	ttcaatatgactttggaggaa	catccccaccttatccat
TBP	tcccccagactcccatgac	caaccaagattcactgtggatacaa
HMBS	ggcaatgcggctgcaa	gggtaccacgcgaatcac

Kinase Assays. Recombinant FLAG-SOCS1(WT) or (80F) were produced in HEK 293T cells transiently transfected using the calcium phosphate method with 20 μ g (10 cm) of pLPC FLAG-SOCS1(WT) or (80F) and then immunoprecipitated with anti-FLAG M2 Affinity Gel as previously described, washed twice in Cell Lysis Buffer and once in TBS 1X for 5 min, eluted for 1 hour at 4°C with 250 ng/ μ l of FLAG peptide (Sigma-Aldrich) in TBS1X and protein concentration was evaluated using a NanoDrop2000c spectrophotometer (A280). Purification was confirmed using separation on an SDS PAGE gel and Coomassie Blue Staining. Human active recombinant GST-YES1 (Cat#: A15557, Lot#: 1383140F, Life technologies, Carlsbad, CA) or human active recombinant SRC-His (Cat#: P3044, Lot#: 1718430D, Life technologies,

Carlsbad, CA) were incubated with or without human recombinant FLAG-SOCS (WT) or (80F) in kinase assay buffer I (Cat#: K01-09, SignalChem): 25 mM MOPS, pH 7.2, 12.5 mM β -glycerol-phosphate, 25 mM MgCl₂, 5 mM EGTA, 2 mM EDTA, 0.25 mM dithiothreitol (DTT) and 40 μ M ATP at 30°C for 30 minutes. After speed vacuum, proteins were resuspended in 20 μ L of fresh 8M Urea (10 mM Tris-Cl pH7.3, 100 mM NaH₂PO₄, 8M Urea) and samples were boiled at 98°C for 5 minutes. Then, 20 μ L of 2X Laemmli buffer was added to samples and boiled at 98°C for 5 minutes. Samples were separated by SDS PAGE and transferred to nitrocellulose membranes for Western blotting. Total proteins were visualized with Ponceau.

For dimer assessment, assays were performed exactly as described above but with the human recombinant SOCS1(WT)-Myc-FLAG (Origene Technologies, cat# TP320847, lot#11B849) no urea was used to resuspend samples. For Dasatinib treatment, DMSO was added to the kinase reactions in the conditions where no Dasatinib was used. Dasatinib was used at either 4nM or 100 nM final concentration in the assays.

Immunohistochemistry. Immunohistochemistry was performed on MEF wild type cells and MEF from SOCS1 knockout mice that were embedded in paraffin, as well as on a Tissue Microarray (US Biomax, #LY2086a). Immunohistochemical staining against pSOCS1 and pSRC was carried out on paraffin-embedded formalin-fixed samples using the automated Bond RX staining platform from Leica Biosystems, Australia. Sections were deparaffinised inside immunostainer. Antigen recovery was conducted using heat retrieval (Heat-Induced Epitope Retrieval) with ER1 (Leica Biosystems proprietary Epitope Retrieval using a low pH buffer) for 20 min. Sections were then incubated with 150 μ L of anti-pSOCS1 antibody (22B8 generated by GenScript 1:500) or pSRC family (Y416) antibody (Cell Signaling #2101 1:20) for 15 min at room temperature. Secondary antibody from Jackson Immunoresearch was diluted 1:100 and incubated 8 min prior to revelation. Detection of specific signal was acquired by using Bond Intense DAB kit (#DS9263, Leica Biosystems) for 20-30 min for pSOCS1 and pSRC according to provider's recommendations. Slides were counterstained automatically with Hematoxylin included in the kit.

Tissue Microarrays: Immunohistochemistry against pSOCS1 and pSRC was performed on a lymphoma human tissue microarray purchased from US Biomax (#LY2086a). This TMA contains 208 cases, 192 lymphoma samples and 16 normal lymph node samples. Two

independent scorers proceeded to counting and scoring the signal from the 208 samples. Each scorer made three separate counts of 100 cells for every tumor and for every type of staining. Three separate phenotypes were analysed: cytoplasmic staining, peri-nuclear staining and nuclear staining. The ImmunoReactive Score (IRS) was chosen to grade the samples. This score takes into account the number of stained cells and the intensity of staining, where the final score is comprised between 0 and 12. Statistics were performed by using the SPSS software (IBM). Spearman correlation between the two independent scorers is 0.935 and is statistically significant ($p < 0.0001$). Mann Whitney U test was used to show significant differences between conditions : cytoplasmic normal vs cytoplasmic lymphomas, $U=740$, $p < 0.0001$ (sig < 0.05 2-tailed), showing a statistically significant difference between both conditions; nuclear normal vs nuclear lymphomas, $U=1115.5$, $p < 0.009$ (sig < 0.05 2-tailed), showing a significant difference, and perinuclear normal vs perinuclear lymphomas $U=1291$ $p < 0.257$ (sig < 0.05 2-tailed), showing no significant difference for perinuclear staining. Correlations in expression between pSOCS1 staining and pSRC family staining were calculated using Pearson's correlation (Pearson's correlation = 0.557, $p < 0.0001$ (sig < 0.01 2-tailed)).

Mass Spectrometry. 20ug of proteins were separated on a 4%–12% precast NuPAGE gel (Invitrogen). The gel was Coomassie-stained with 0.1% Coomassie R250 (B7920, Sigma) in 40% methanol/10% acetic acid. Gel pieces were destained in ACN 50% and reswelled in 50 mM ammonium acetate (Sigma) and reduced with 5 mM tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) (Pierce). Alkylation was performed by adding chloroacetamide to a final concentration of 55 mM. 1 μ g of Asp-N was added and the digestion was performed for 4 hours. 1 μ g of trypsin was added and the digestion was carried out overnight. Peptide extraction was performed with 90% ACN. Samples were dried down in a Speed-Vac and reconstituted in 40 μ l of FA 0.2%.

Peptides were loaded on a C18 stem trap from New Objective and separated on a home-made C18 column (15 cm * 150 μ m id) at a flow rate of 600 nl/min with a gradient of 5-30% B (A: formic acid 0.2% in water, B: formic acid 0.2% in acetonitrile). The analytical column was coupled to a Q-Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific). The resolution was set at 70000 for the survey scan and 17500 for the tandem mass spectrum acquisition. A maximum of 12 precursors were sequenced for each duty cycle. AGC target values for MS and MS/MS scans were set to $3e6$ (max fill time 50 ms) and $2e4$ (max fill time 150 ms), respectively. The precursor

isolation window was set to m/z 1.6 with a high-energy dissociation normalized collision energy of 25. The dynamic exclusion window was set to 30 s. Tandem mass spectra were searched against the UniProt mouse database with carbamidomethylation (C) as fixed modifications, deamidation (NQ) oxidation (M) acetylation (N-term) and phosphorylation (STY) as variable modifications. Tolerance was set at 10 ppm on precursor mass and 0.01 Da on the fragments.

Monoclonal anti-pSOCS1 (Y80) Antibody generation (GenScript). Five mice were immunized with the peptide GF[pY]WGPLSVHGAHc and their respective polyclonal antibodies were tested by ELISA and Western blot. Monoclonal antibody production was initiated from the mouse with the best antibody. 10 clones were tested and the best was chosen to produce monoclonal antibody 22B8B8. The antibody 22B8B8 is a mouse monoclonal IgG2a that was purified with protein A sepharose and then affinity purified against the phosphorylated and non-phosphorylated peptides. The final product had a concentration of 2 mg/mL, with a 92% purity (determined by SDS-PAGE). A titer of 1:512000 was obtained by ELISA performed against either the phosphorylated or non-phosphorylated peptide (the titer is the highest dilution with Signal/Blank ≥ 2.1). Peptides were coated at a concentration of 1 $\mu\text{g/mL}$ in a volume of 100 μL per well. Secondary antibody used for ELISA detection was peroxidase conjugated anti-Mouse IgG (Heavy and Light) produced in Goat.

3.2.6 References

- Babon, J.J., McManus, E.J., Yao, S., DeSouza, D.P., Mielke, L.A., Sprigg, N.S., Willson, T.A., Hilton, D.J., Nicola, N.A., Baca, M., et al. (2006). The structure of SOCS3 reveals the basis of the extended SH2 domain function and identifies an unstructured insertion that regulates stability. *Mol Cell* 22, 205-216.
- Beaurivage, C., Champagne, A., Tobelaim, W.S., Pomerleau, V., Menendez, A., and Saucier, C. (2016). SOCS1 in cancer: An oncogene and a tumor suppressor. *Cytokine* 82, 87-94.
- Berzaghi, R., Maia, V.S., Pereira, F.V., Melo, F.M., Guedes, M.S., Origassa, C.S., Scutti, J.B., Matsuo, A.L., Camara, N.O., Rodrigues, E.G., et al. (2017). SOCS1 favors the epithelial-mesenchymal transition in melanoma, promotes tumor progression and prevents antitumor immunity by PD-L1 expression. *Sci Rep* 7, 40585.
- Bouamar, H., Jiang, D., Wang, L., Lin, A.P., Ortega, M., and Aguiar, R.C. (2015). MicroRNA 155 control of p53 activity is context dependent and mediated by Aicda and Socs1. *Mol Cell Biol* 35, 1329-1340.
- Calabrese, V., Mallette, F.A., Deschenes-Simard, X., Ramanathan, S., Gagnon, J., Moores, A., Ilangumaran, S., and Ferbeyre, G. (2009). SOCS1 links cytokine signaling to p53 and senescence. *Mol Cell* 36, 754-767.
- Chevrier, M., Bobbala, D., Villalobos-Hernandez, A., Khan, M.G., Ramanathan, S., Saucier, C., Ferbeyre, G., Geha, S., and Ilangumaran, S. (2017). Expression of SOCS1 and the downstream targets of its putative tumor suppressor functions in prostate cancer. *BMC cancer* 17, 157.
- Chim, C.S., Wong, K.Y., Loong, F., and Srivastava, G. (2004). SOCS1 and SHP1 hypermethylation in mantle cell lymphoma and follicular lymphoma: implications for epigenetic activation of the Jak/STAT pathway. *Leukemia* 18, 356-358.
- Cui, X., Shan, X., Qian, J., Ji, Q., Wang, L., Wang, X., Li, M., Ding, H., Liu, Q., Chen, L., et al. (2016). The suppressor of cytokine signaling SOCS1 promotes apoptosis of intestinal epithelial cells via p53 signaling in Crohn's disease. *Experimental and molecular pathology* 101, 1-11.

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.

Di Lello, P., Jenkins, L.M., Jones, T.N., Nguyen, B.D., Hara, T., Yamaguchi, H., Dikeakos, J.D., Appella, E., Legault, P., and Omichinski, J.G. (2006). Structure of the Tfb1/p53 complex: Insights into the interaction between the p62/Tfb1 subunit of TFIID and the activation domain of p53. *Mol Cell* 22, 731-740.

Dos Santos, C., McDonald, T., Ho, Y.W., Liu, H., Lin, A., Forman, S.J., Kuo, Y.H., and Bhatia, R. (2013). The SRC and c-Kit kinase inhibitor dasatinib enhances p53-mediated targeting of human acute myeloid leukemia stem cells by chemotherapeutic agents. *Blood* 122, 1900-1913.

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.

Ferbeyre, G., de Stanchina, E., Querido, E., Baptiste, N., Prives, C., and Lowe, S.W. (2000). PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence. *Genes Dev* 14, 2015-2027.

Ferrand, M., Kirsh, O., Griveau, A., Vindrieux, D., Martin, N., Defossez, P.A., and Bernard, D. (2015). Screening of a kinase library reveals novel pro-senescence kinases and their common NF-kappaB-dependent transcriptional program. *Aging (Albany NY)* 7, 986-1003.

Giordanetto, F., and Kroemer, R.T. (2003). A three-dimensional model of Suppressor Of Cytokine Signalling 1 (SOCS-1). *Protein Eng* 16, 115-124.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.

Hatirnaz, O., Ure, U., Ar, C., Akyerli, C., Soysal, T., Ferhanoglu, B., Ozelik, T., and Ozbek, U. (2007). The SOCS-1 gene methylation in chronic myeloid leukemia patients. *Am J Hematol* 82, 729-730.

Hildebrand, D.G., Lehle, S., Borst, A., Haferkamp, S., Essmann, F., and Schulze-Osthoff, K. (2013). alpha-Fucosidase as a novel convenient biomarker for cellular senescence. *Cell cycle* (Georgetown, Tex 12, 1922-1927).

Jiang, S., Zhang, H.W., Lu, M.H., He, X.H., Li, Y., Gu, H., Liu, M.F., and Wang, E.D. (2010). MicroRNA-155 functions as an OncomiR in breast cancer by targeting the suppressor of cytokine signaling 1 gene. *Cancer Res* 70, 3119-3127.

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.

Ke, J., Chelvarajan, R.L., Sindhava, V., Robertson, D.A., Lekakis, L., Jennings, C.D., and Bondada, S. (2009). Anomalous constitutive SRC kinase activity promotes B lymphoma survival and growth. *Molecular cancer* 8, 132.

Kim, L.C., Song, L., and Haura, E.B. (2009). SRC kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 6, 587-595.

Kobayashi, N., Uemura, H., Nagahama, K., Okudela, K., Furuya, M., Ino, Y., Ito, Y., Hirano, H., Inayama, Y., Aoki, I., et al. (2012). Identification of miR-30d as a novel prognostic maker of prostate cancer. *Oncotarget* 3, 1455-1471.

Kong, X., Feng, D., Wang, H., Hong, F., Bertola, A., Wang, F.S., and Gao, B. (2012). Interleukin-22 induces hepatic stellate cell senescence and restricts liver fibrosis in mice. *Hepatology* 56, 1150-1159.

Kortlever, R.M., Higgins, P.J., and Bernards, R. (2006). Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence. *Nat Cell Biol* 8, 877-884.

Lennerz, J.K., Hoffmann, K., Bubolz, A.M., Lessel, D., Welke, C., Ruther, N., Viardot, A., and Moller, P. (2015). Suppressor of cytokine signaling 1 gene mutation status as a prognostic biomarker in classical Hodgkin lymphoma. *Oncotarget* 6, 29097-29110.

Liu, T.C., Lin, S.F., Chang, J.G., Yang, M.Y., Hung, S.Y., and Chang, C.S. (2003). Epigenetic alteration of the SOCS1 gene in chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 123, 654-661.

Malette, F.A., Calabrese, V., Ilangumaran, S., and Ferbeyre, G. (2010). SOCS1, a novel interaction partner of p53 controlling oncogene-induced senescence. *Aging (Albany NY)* 2, 445-452.

Merkel, O., Hamacher, F., Griessl, R., Grabner, L., Schiefer, A.I., Prutsch, N., Baer, C., Egger, G., Schleiderer, M., Krenn, P.W., et al. (2015). Oncogenic role of miR-155 in anaplastic large cell lymphoma lacking the t(2;5) translocation. *J Pathol* 236, 445-456.

Mestre, C., Rubio-Moscardo, F., Rosenwald, A., Climent, J., Dyer, M.J., Staudt, L., Pinkel, D., Siebert, R., and Martinez-Climent, J.A. (2005). Homozygous deletion of SOCS1 in primary mediastinal B-cell lymphoma detected by CGH to BAC microarrays. *Leukemia* 19, 1082-1084.

Moiseeva, O., Bourdeau, V., Roux, A., Deschenes-Simard, X., and Ferbeyre, G. (2009). Mitochondrial dysfunction contributes to oncogene-induced senescence. *Mol Cell Biol* 29, 4495-4507.

Mottok, A., Renne, C., Willenbrock, K., Hansmann, M.L., and Brauninger, A. (2007). Somatic hypermutation of SOCS1 in lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma is accompanied by high JAK2 expression and activation of STAT6. *Blood* 110, 3387-3390.

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.

Parsons, S.J., and Parsons, J.T. (2004). SRC family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene* 23, 7906-7909.

Qiu, X., Guo, G., Chen, K., Kashiwada, M., Druker, B.J., Rothman, P.B., and Chen, J.L. (2012). A requirement for SOCS-1 and SOCS-3 phosphorylation in Bcr-Abl-induced tumorigenesis. *Neoplasia* 14, 547-558.

Reddy, A., Zhang, J., Davis, N.S., Moffitt, A.B., Love, C.L., Waldrop, A., Leppa, S., Pasanen, A., Meriranta, L., Karjalainen-Lindsberg, M.L., et al. (2017). Genetic and Functional Drivers of Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Cell* 171, 481-494 e415.

Reddy, P.N., Sargin, B., Choudhary, C., Stein, S., Grez, M., Muller-Tidow, C., Berdel, W.E., Serve, H., Brandts, C.H., and Study Alliance, L. (2012). SOCS1 cooperates with FLT3-ITD in the development of myeloproliferative disease by promoting the escape from external cytokine control. *Blood* 120, 1691-1702.

Saint-Germain, E., Mignacca, L., Vernier, M., Bobbala, D., Ilangumaran, S., and Ferbeyre, G. (2017). SOCS1 regulates senescence and ferroptosis by modulating the expression of p53 target genes. *Aging (Albany NY)* 9, 2137-2162.

Schif, B., Lennerz, J.K., Kohler, C.W., Bentink, S., Kreuz, M., Melzner, I., Ritz, O., Trumper, L., Loeffler, M., Spang, R., et al. (2013). SOCS1 mutation subtypes predict divergent outcomes in diffuse large B-Cell lymphoma (DLBCL) patients. *Oncotarget* 4, 35-47.

Sherr, C.J., Beach, D., and Shapiro, G.I. (2016). Targeting CDK4 and CDK6: From Discovery to Therapy. *Cancer Discov* 6, 353-367.

Shimada, K., Serada, S., Fujimoto, M., Nomura, S., Nakatsuka, R., Harada, E., Iwahori, K., Tachibana, I., Takahashi, T., Kumanogoh, A., et al. (2013). Molecular mechanism underlying the antiproliferative effect of suppressor of cytokine signaling-1 in non-small-cell lung cancer cells. *Cancer Sci* 104, 1483-1491.

Strebovsky, J., Walker, P., Lang, R., and Dalpke, A.H. (2011). Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) limits NFkappaB signaling by decreasing p65 stability within the cell nucleus. *FASEB J* 25, 863-874.

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.

Tagami-Nagata, N., Serada, S., Fujimoto, M., Tanemura, A., Nakatsuka, R., Ohkawara, T., Murota, H., Kishimoto, T., Katayama, I., and Naka, T. (2015). Suppressor of cytokine

signalling-1 induces significant preclinical antitumor effect in malignant melanoma cells. *Exp Dermatol* 24, 864-871.

Tobelaim, W.S., Beaurivage, C., Champagne, A., Pomerleau, V., Simoneau, A., Chababi, W., Yeganeh, M., Thibault, P., Klinck, R., Carrier, J.C., et al. (2015). Tumour-promoting role of SOCS1 in colorectal cancer cells. *Sci Rep* 5, 14301.

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

Zardo, G., Tiirikainen, M.I., Hong, C., Misra, A., Feuerstein, B.G., Volik, S., Collins, C.C., Lamborn, K.R., Bollen, A., Pinkel, D., et al. (2002). Integrated genomic and epigenomic analyses pinpoint biallelic gene inactivation in tumors. *Nat Genet* 32, 453-458.

Zhao, X.D., Zhang, W., Liang, H.J., and Ji, W.Y. (2013). Overexpression of miR -155 promotes proliferation and invasion of human laryngeal squamous cell carcinoma via targeting SOCS1 and STAT3. *PloS one* 8, e56395.

3.2.7 Legends

Figure 3.1. Identification of a novel interaction mechanism between SOCS1 and p53. Each panel shows a schematic representation of the GST-p53 fusion proteins and the resulting in vitro interaction with SOCS1 obtained by in vitro transcription and translation in GST-pulldown assays. Mutations are indicated by a * followed by the corresponding amino acid change. A. Interaction of SOCS1 with GST-p53 TAD, GST-p53 TAD-I and GST-p53 TAD-II. B. Interaction of SOCS1 with GST-p53 TADII mutants of hydrophobic residues. C. SOCS1 does not interact with p53 via the same amino acids with which it interacts with JAKs. Schematic representations of SOCS1 (S1) constructs are shown with mutated residues annotated by a *. Co-immunoprecipitations of p53 or control IP (anti-Cyclin A (CA)) were performed in U2OS cells transiently transfected with the mutants and treated with doxorubicin (300 ng/mL) for a 16-hour period. Immunoblots were performed to assess interaction with SOCS1. WCL (Whole Cell Lysates). D. SOCS1-p53 interaction is decreased when SOCS1 is mutated on Y80 or W81. Schematic representation of SOCS1 mutants based on the mutations found in cancer patients are shown (referenced in Figure S2). Co-immunoprecipitations were performed in U2OS as described in (A). E. SOCS1 mutated on Y80 or W81 loses its ability to arrest growth of cancer cells. Colony assays were performed in U2OS cells transiently transfected with the various constructs described in (B). F. Western blots showing the levels of p53 and SOCS1 in U2OS cells used for performing luciferase assays shown in (E). Cells were transfected with either empty vector, SOCS1 wt or SOCS1 Y80D and either untreated or treated with 300 ng/mL doxorubicin for 24 hours. G. Luciferase assays were performed in cells as described in (D). Cells were co-transfected with pGL3-promoter control vector or pGL3 p21-promoter vector in combination with empty vector,

Figure 3.2. SOCS1 phosphomimetic and unphosphorylatable mutants impact cellular senescence in normal human fibroblasts. A. SOCS1 Y80D induces less senescent cells than SOCS1 wild type as shown in a Senescence-Associated β -galactosidase assay. Cells were stably infected with empty vector, wild type SOCS1, SOCS1 Y80D or SOCS1 Y80F in combination with either a non-targeting shRNA (shNTC) or a shRNA against p53 (shp53). The number of positive and negative cells was counted under a white light microscope. B. Western blots of

cells described in (A) to measure the levels of p53 and SOCS1. Tubulin served as a loading control. C. Growth curves of IMR90 cells show mutant SOCS1 Y80D doesn't inhibit growth as well as the wild type SOCS1. Cells were obtained as described in A and then counted and plated for growth curves. D. QPCR of senescence marker p21 in IMR90 cells as described in A. E. QPCR of senescence marker FUCA in IMR90 cells as described in A. F. QPCR of senescence marker SerpinE1 in IMR90 cells as described in A. G. QPCR of senescence marker GADD45a in IMR90 cells as described in A. H. Immunoblots of the indicated proteins show mutation of Y80 affects p53 phosphorylation. IMR90 cells were infected with empty vector or derivatives expressing wild type SOCS1, SOCS1 Y80D or SOCS1 Y80F. All experiments were performed three times, error bars indicate the standard deviation of triplicates, * = $p < 0.05$, using the Student's t test, **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.005$.

Figure 3.3. SOCS1 is phosphorylated on Y80 by SRC family kinase members SRC and YES1. A. Mass spectra obtained for a typical peptide showing phosphorylation of Y80. Whole cell lysates from three cell lines (IMR90, HepG2 and BV173) were each incubated with in vitro purified GST-SOCS1 to test whether phosphorylation occurs in different cell types. Extracts were then loaded onto an SDS-PAGE gel and the band corresponding to SOCS1 was analysed by mass-spectrometry. B. Sequence of the phosphorylated peptide identified by mass spectrometry. C. Tyrosine kinase screening: immunoblots showing co-immunoprecipitation of SOCS1 with p53 in cells expressing pools of activated tyrosine kinases (gr1-gr5). Group 1 was composed of: Axl, BMX, SYK and YES1, Group 2 was composed of TEC, LCK, TYK2, BTK, Group 3 was composed of FGFR1, HCK, TNK2 and EphA4 and Group 4 was composed of: BLK, FRK, Tie1 and FGR. D. YES1 kinase overexpression decreases the interaction between p53 and SOCS1. Immunoblots showing co-immunoprecipitation of SOCS1 with p53 in cells expressing the kinases of Group 1. E. YES1 and SOCS1 interact together. Immunoblots for SOCS1 and YES1 of whole cell lysates and immunoprecipitates with anti-YES in U2OS cells overexpressing SOCS1. F. Validation in SOCS1 KO MEFs of a phospho-specific SOCS1 antibody against Y80. Cells were pelleted, fixed and embedded in paraffin. The antibody was validated by immunohistochemistry in wild type MEF cells or in SOCS1 knock out MEF cells either untreated or stimulated with EGF following serum starvation. G. Kinase Assay shows

that GST-YES and SRC-His phosphorylate SOCS1. Active GST-YES1 and SRC-His, were incubated with purified FLAG-SOCS1 wild type (S1) or FLAG-SOCS1 Y80F in vitro. After denaturation in 8M Urea, phosphorylation was assessed by Western Blot with the monoclonal antibody specific to phosphorylated SOCS1 at Y80. H. Without denaturation in 8M Urea, the majority of phosphorylated SOCS1-Myc-FLAG is found as a dimer. Immunoblots of GST-YES1, SOCS1-Myc-Flag and phospho-SOCS1 of in vitro kinase assays using purified SOCS1-Myc-FLAG and increasing concentrations of purified GST-YES1 in absence of Urea. I. SOCS1 dimerizes inside cells. U2OS cells were transfected with empty vector (V), MYC-SOCS1 and FLAG SOCS1 (M/F), MYC SOCS1 alone (MYC) or FLAG SOCS1 alone (FLAG). Co-immunoprecipitations were performed using the FLAG antibody and Western Blots against MYC, FLAG and SOCS1 were done to assess the interaction.

Figure 3.4. Inhibiting SRC-family activity enhances SOCS1 tumor suppressor activity. A. Dasatinib inhibits SOCS1 phosphorylation in in vitro kinase assays. Kinase assay was performed as previously described using purified proteins, but by adding the SRC Inhibitor Dasatinib to the reaction at either 0nM, 4nM or 100nM. B. SRC-family inhibitor Dasatinib cooperates with SOCS1 to induce a stronger senescence. IMR90 cells retrovirally infected with an empty vector or SOCS1 were treated with increasing doses of Dasatinib or Saracatinib, ranging from 1 nM to 80 nM for one week. Senescence-Associated- β -galactosidase staining was then performed to quantify the number of senescent cells. C. Immunoblots for the indicated proteins of cell lysates from IMR90 cells infected with empty vector, wild type SOCS1, SOCS1 Y80D or SOCS1 Y80F and treated or not with 100 nM Dasatinib for 24 hours. D. IMR90 cells retrovirally infected with an empty vector or SOCS1 were treated with 20nM Dasatinib, the dose showing the most effect in panel A, for one week before being counted and plated for a growth curve. E. SOCS1 mutant Y80F, that cannot be phosphorylated, shows resistance to Dasatinib and Saracatinib treatment (20 nM) compared to wild type SOCS1 or F79C mutant as measured by SA- β -Galactosidase staining. All experiments were performed three times, error bars indicate the standard deviation of triplicates, * = $p < 0.05$, using the Student's t test, **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.005$.

Figure 3.5. Phosphorylated SOCS1 at Y80 is deregulated in human Diffuse-Large-B-Cell lymphomas (DLBCLs). A. SOCS1 expression levels (RNA-seq data from CBioportal) in two types of hematopoietic cancers: AML and DLBCL, show higher SOCS1 expression in DLBCL cancers. B. Oncomine analysis of SOCS1 expression levels in different types of lymphomas shows DLBCL lymphomas has among the highest expression levels of SOCS1. C. Scale of staining intensity calculated with the IRS scoring method, of phosphorylated SOCS1 (Y80) in Immunohistochemistry of TMAs of human DLBCL patients (LY2086a USBiomax). D. pSOCS1 staining is increased in the cytoplasm of lymphoma tissues from all 192 patients compared to normal lymph nodes of 16 patients. Analysis of pSOCS1 (Y80) staining in human DLBCL samples from the TMA (LY2086a). Upper panel: lymphoma tissues; Lower panel: normal lymph nodes. Nuclear, Peri-Nuclear and Cytoplasmic staining were analysed and quantified for each of the 208 cases. Results are shown in graphics comparing the percentage of cells stained in each category and intensity of staining. E. Images of the most representative phenotypes obtained in DLBCL patients (upper panels) and normal lymph nodes (lower panels) for pSOCS1 (Y80).

Figure 3.6. Phosphorylated SRC Family staining is increased in lymphomas vs normal lymph nodes and correlates with pSOCS1 staining. A. Example of the 4 different categories of staining defined for pSRC (Y416) family: Negative, Mild, Moderate and Strong. Number of samples staining for each category is indicated. B. Comparison of relative number of patients staining in each category is shown for lymphoma samples versus normal lymph nodes. Lymphomas stain more strongly for pSRC staining. C. Correlation analysis shows positive correlation between pSOCS1 Y80 staining and pSRC Y416 family staining. Pearson correlation was calculated using the SPSS program.

Figure 3.7. Model showing the role of mutations and phosphorylation on the tumor suppressor role of SOCS1 in the p53 pathway.

3.2.8 Figures

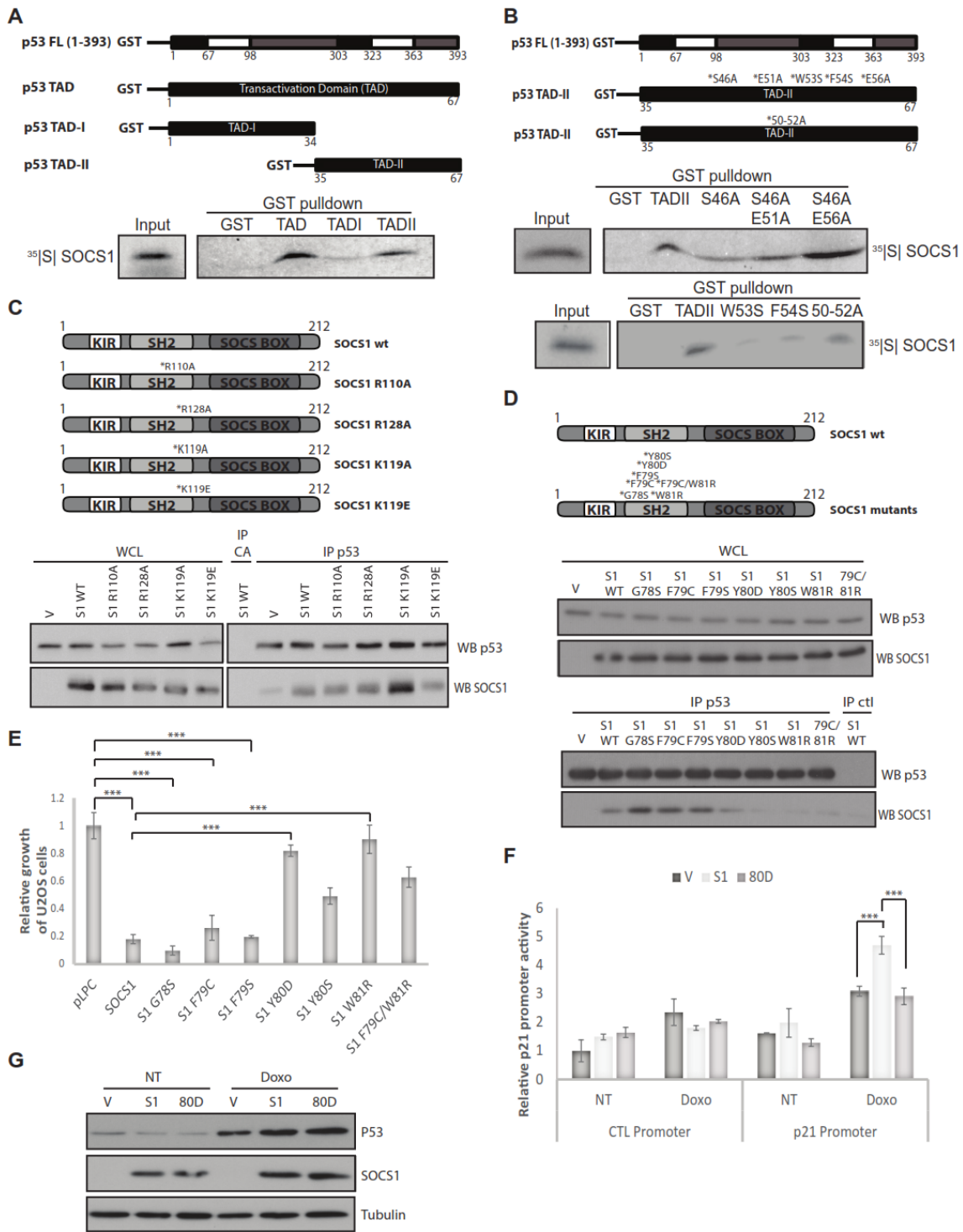


Figure 3.1 Identification of a novel interaction mechanism between SOCS1 and p53

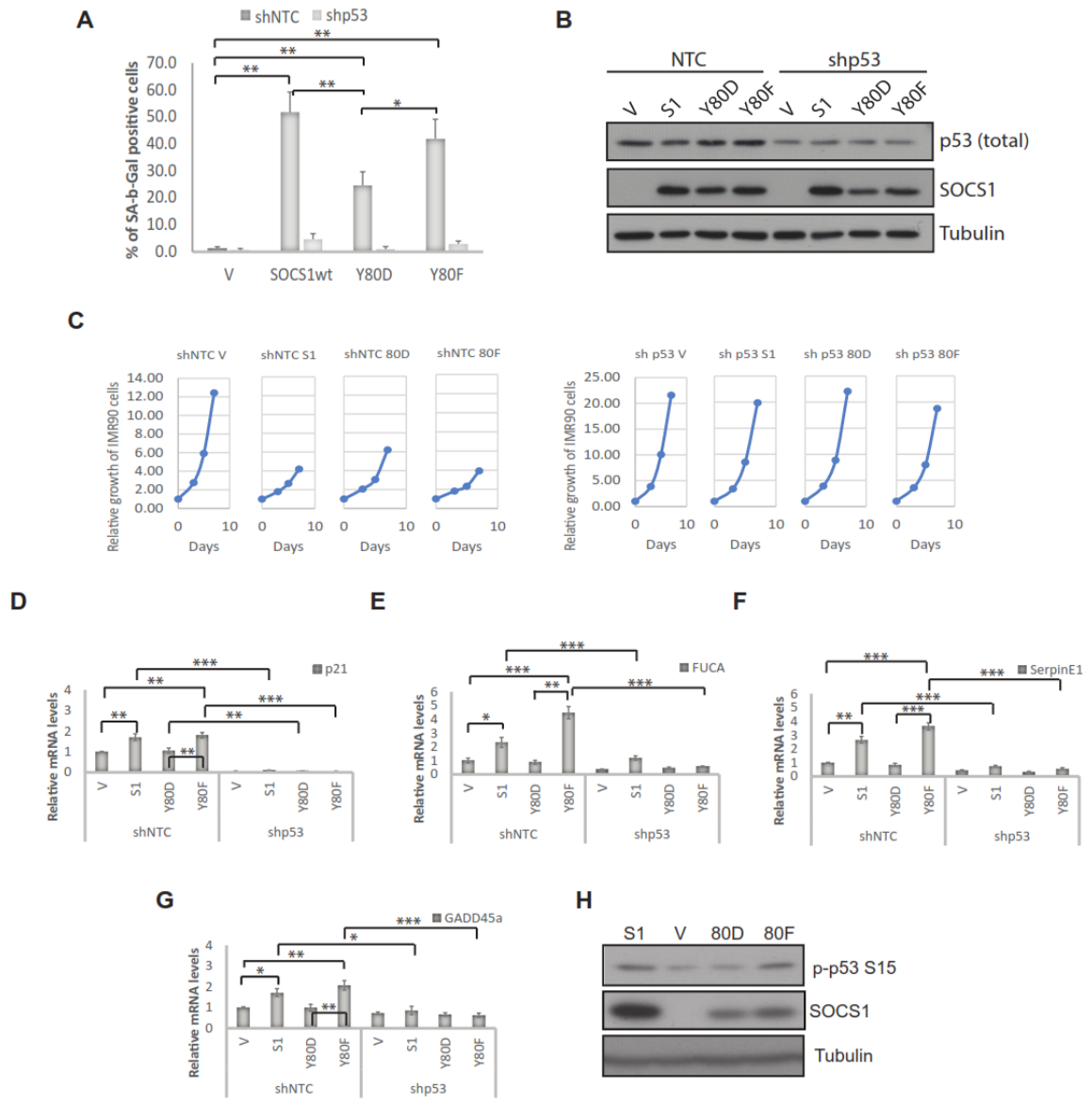


Figure 3.2 SOCS1 phosphomimetic and unphosphorylatable mutants impact cellular senescence in normal human fibroblasts

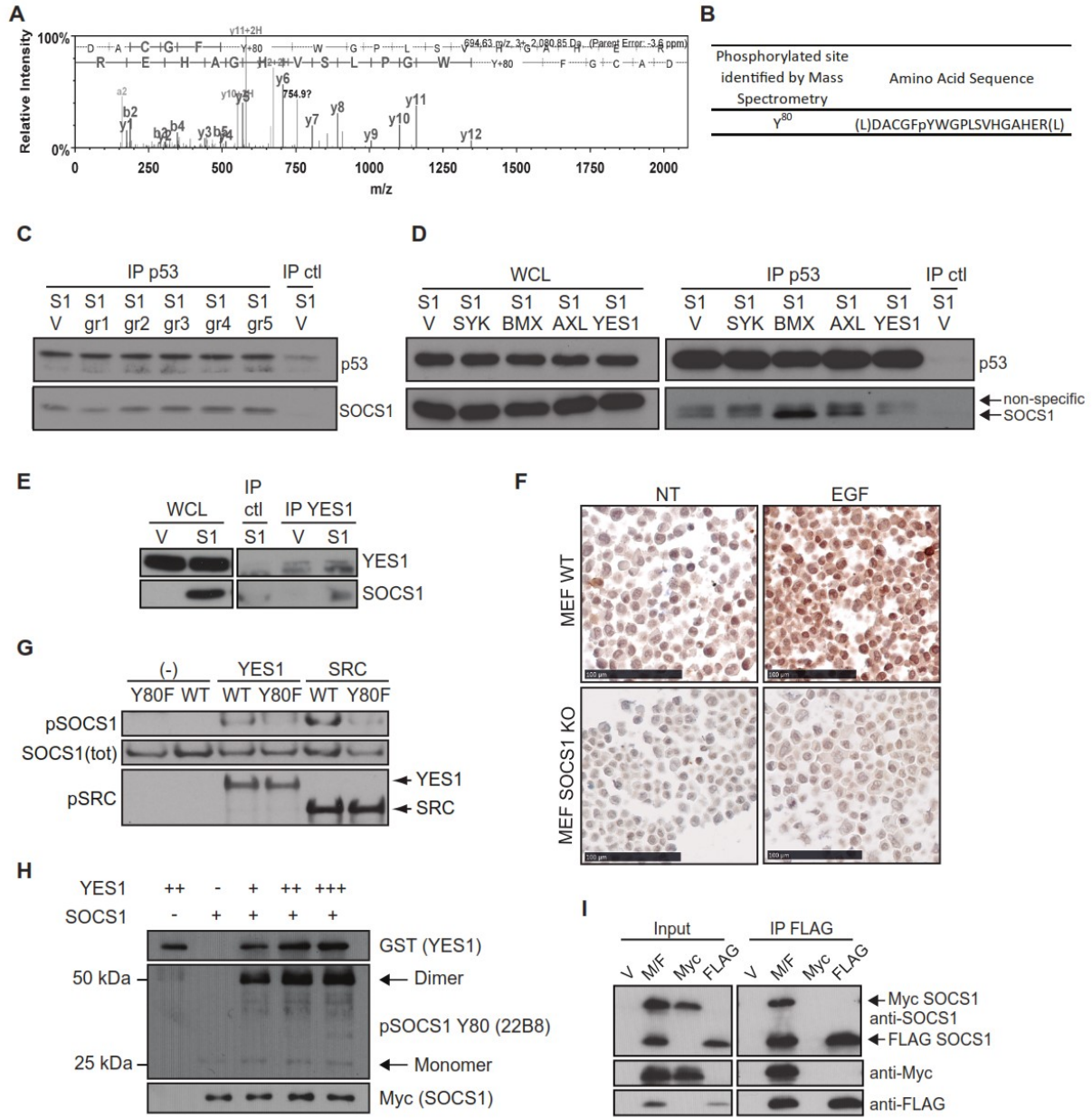


Figure 3.3 SOCS1 is phosphorylated on Y80 by SRC family kinase members SRC and YES1

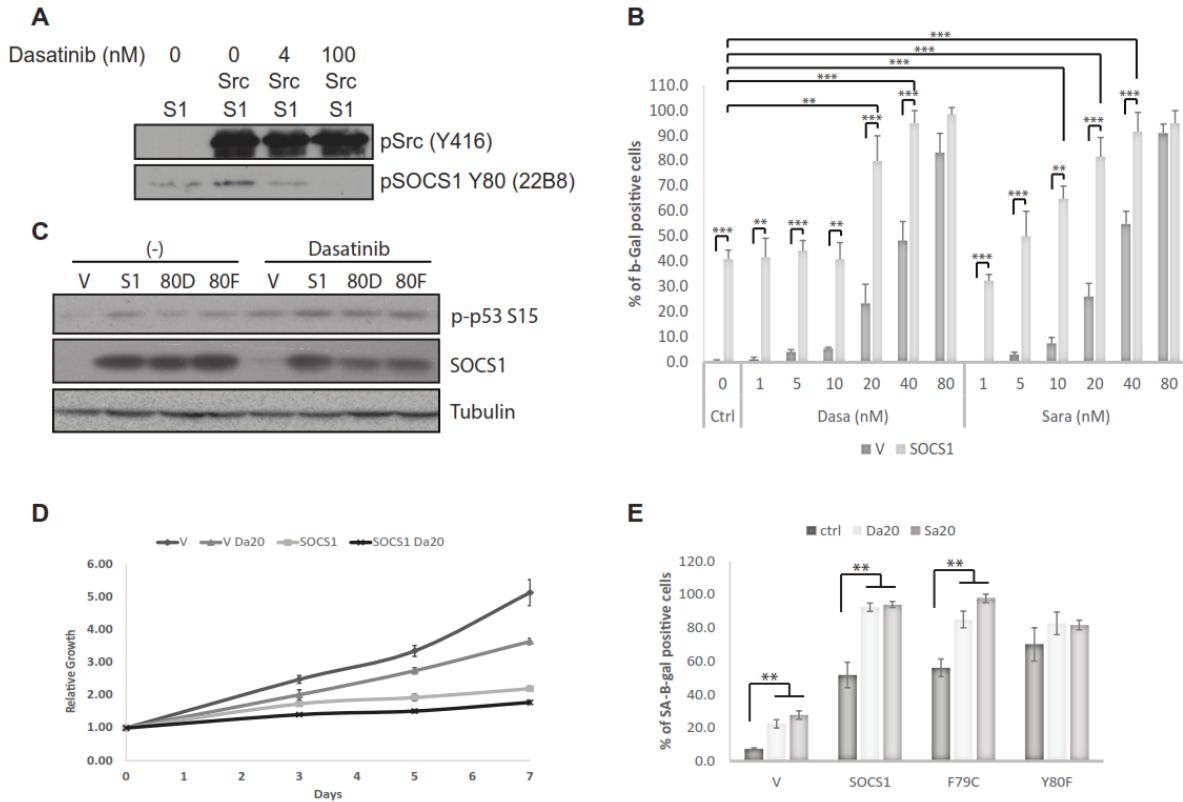


Figure 3.4 Inhibiting SRC-family activity enhances SOCS1 tumor suppressor activity

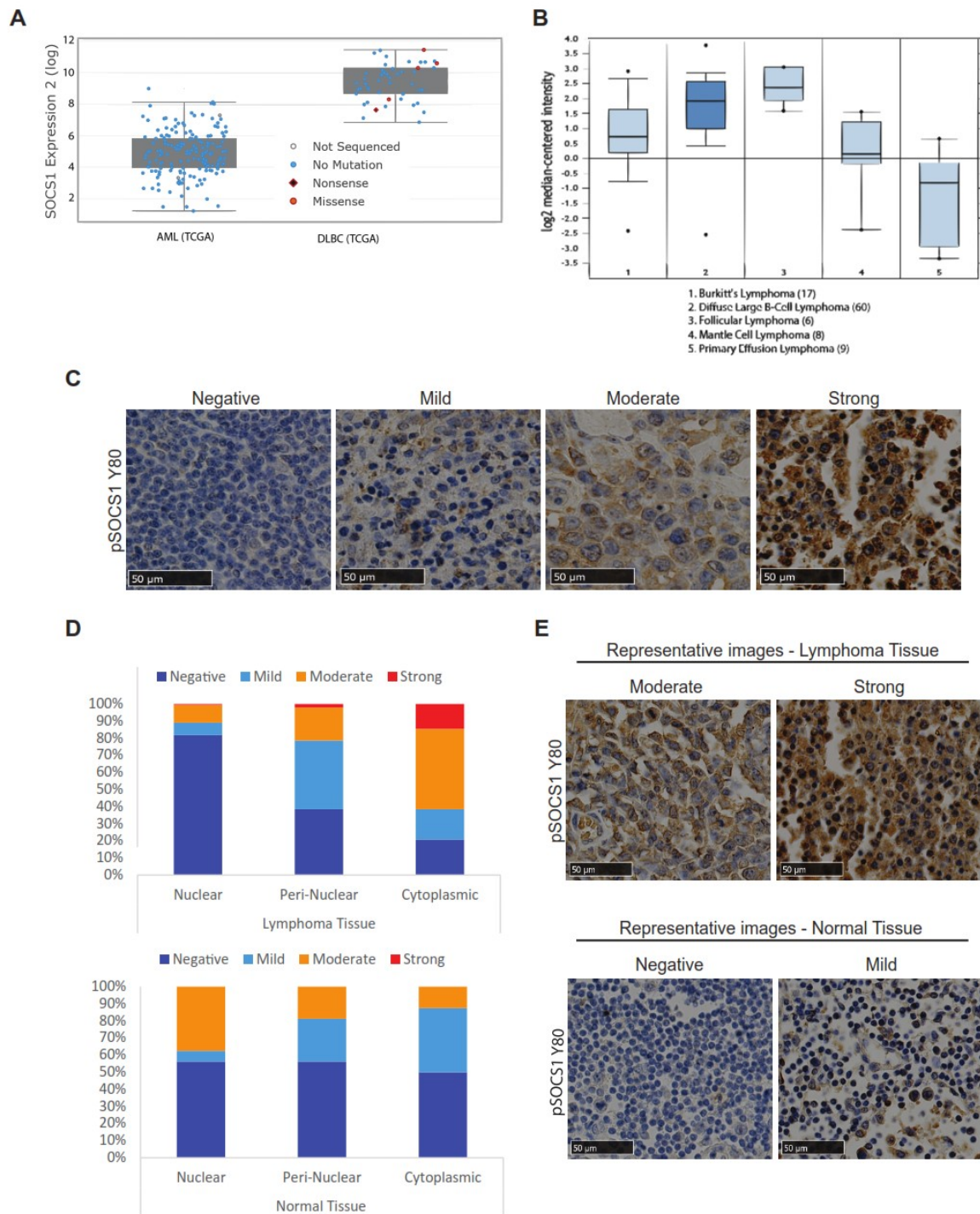


Figure 3.5 Phosphorylated SOCS1 at Y80 is deregulated in human Diffuse-Large-B-Cell lymphomas (DLBCLs)

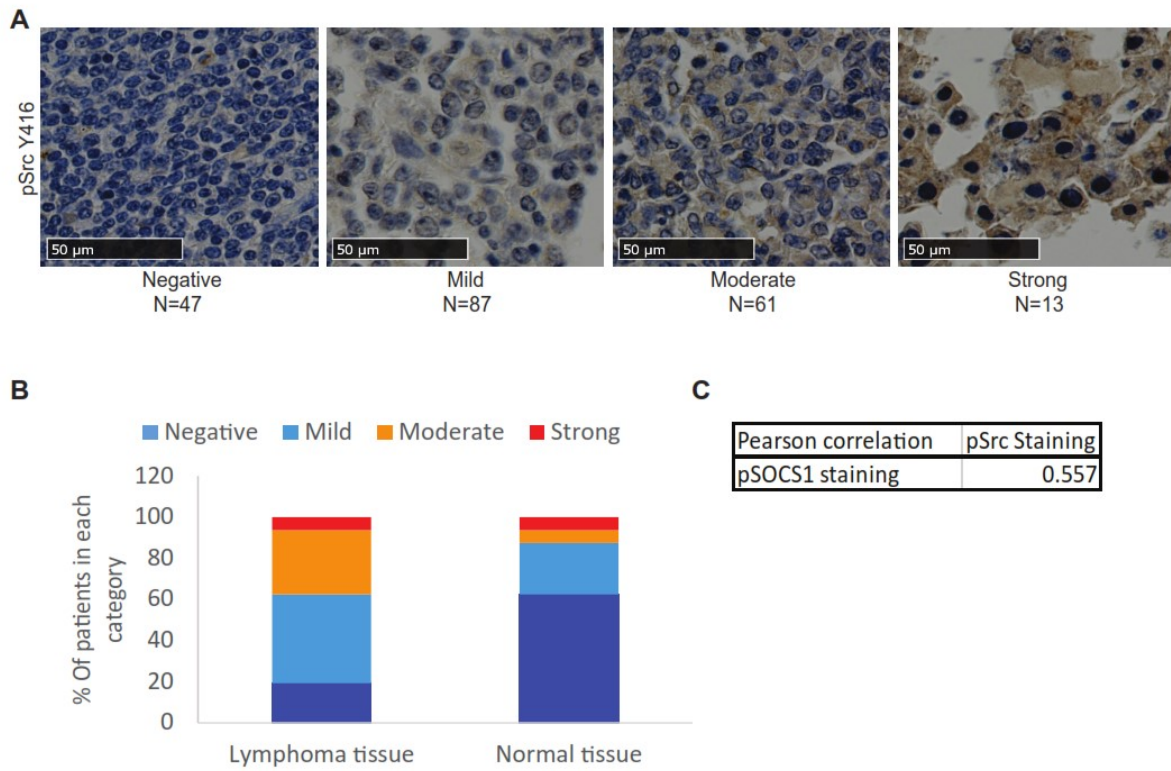


Figure 3.6 Phosphorylated SRC Family staining is increased in lymphomas vs normal lymph nodes and correlates with pSOCS1 staining

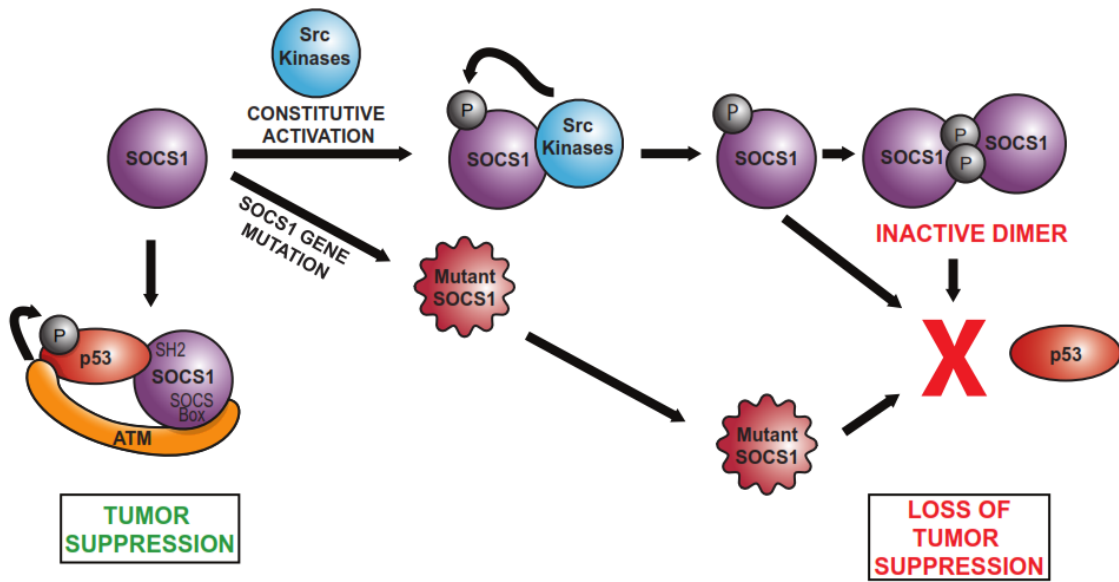


Figure 3.7 Model showing the role of mutations and phosphorylation on the tumor suppressor role of SOCS1 in the p53 pathway

3.2.9 Supplementary legends

Supplementary figure 1. The hydrophobic motif contained in p53 is conserved among many transcription factors. A. Table showing transcription factors containing the same SOCS1-interacting motif as found in p53. B, C. SOCS1 interacts with p73. U2OS cells were transfected with empty vector (V) or SOCS1 and immunoprecipitated with an antibody against p73 . Western blotting was performed to monitor the interaction with SOCS1.

Supplementary figure 2. List of SOCS1 mutations found in hematopoietic cancers. Mutations located in the N-terminal part of the SH2 domain are shown. Data was taken from the COSMIC database and (Schif et al., 2013).

Supplementary figure 3. SOCS1 and SOCS1 mutants' phenotypes are dependent on p53. A. SOCS1 mutants' ability to inhibit the JAK/STAT pathway do not correlate with their ability to arrest growth. Empty vector (V), SOCS1 wt or mutants of SOCS1 were retrovirally infected in U2OS cells. Their ability to regulate the JAK/STAT pathway was evaluated by stimulating the cells with β -interferon (1000 U/mL) and looking at evaluating phosphorylated STAT1 levels by western blot. B. Quantification of Western blots shown in A for pSTAT1 and STAT1 levels shows relative STAT1 activation. C. SOCS1 wt and mutant SOCS1 overexpression have no effect in p53 null cells. H1299 cancer cells were transfected with empty vector (V), SOCS1 wt, SOCS1 G78S, SOCS1 Y80D or SOCS1 Y80F, selected, counted and plated for colony assays to assess growth. D. Western blot shows expression levels of the different SOCS1 constructs. E. SOCS1 mutant Y80F induces growth arrest in U2OS cells. Cells were transiently transfected with empty vector, SOCS1 wt or SOCS1 Y80F, and cell growth was measure by colony formation assay. F. SOCS1 Y80F interacts with p53 as shown by co-immunoprecipitation in U2OS cells.

Supplementary figure 4. SOCS1, p53, and YES1 expression levels in DLBCL. A. SOCS1 is highly expressed in DLBCL cancers in comparison to other types of cancers. Data compiled

from the TCGA database. B. TP53 is highly expressed in DLBCL compared to other types of cancers, and is infrequently mutated. Relative RNAseq TCGA data showing expression levels of TP53 in different types of human cancers. C. Mutual exclusivity analysis shows alterations in SOCS1 and TP53 tend to be mutually exclusive in all cancers indicated in (A-B). Data from cBioPortal. D. YES1 expression levels in DLBCL are higher than in different types of normal B lymphocytes. Data compiled from Oncomine.

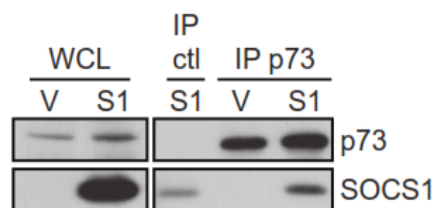
Supplementary figure 5. Examples of pSOCS1 phenotypes of staining in lymphomas and normal lymph nodes. A. Description of patients by cancer subtype B. Three different phenotypes of pSOCS1 staining were quantified: nuclear, cytoplasmic and peri-nuclear. An example of each phenotype is shown.

3.2.10 Supplementary figures

A

Transcription factor	Sequence	Position
CEBPZ	ALDT F KELLITD	285-296
E2F1	EGEGIRDL F D	417-428
FOXM1	FGE G FSP L L L PVQ	446-457
KAP1	SIIGLQR F FETR	784-795
MYST3	FLID F SYLLSKR	661-672
p65	ADM D F S ALLSQI	538-549
p53	SPDDIEQ W F T ED	46-57
p63	SPEV F QHI W DFL	51-62
p73	GGT T F E HL W SSL	11-22
STAT1	ATIR F HDLLSQL	53-64
STAT2	AEMI F N L L L EEK	105-116
STAT3	ATLV F H N L L GEI	53-64
STAT6	CSAL F KN L L L LKK	356-367
Tax	SF H N L H L L F E E Y	301-312
TAF2	MLQ V F N KL L SLA	469-480

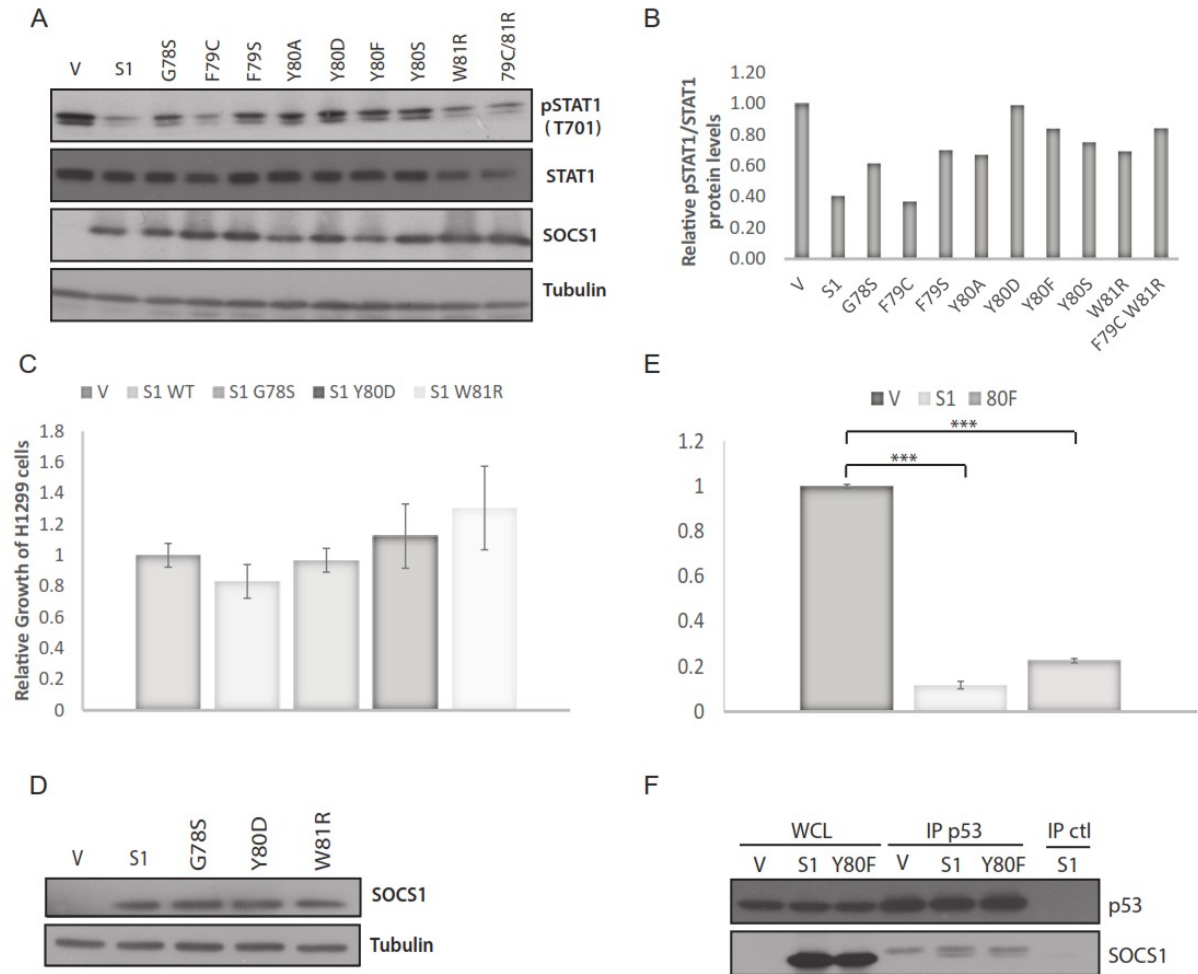
B



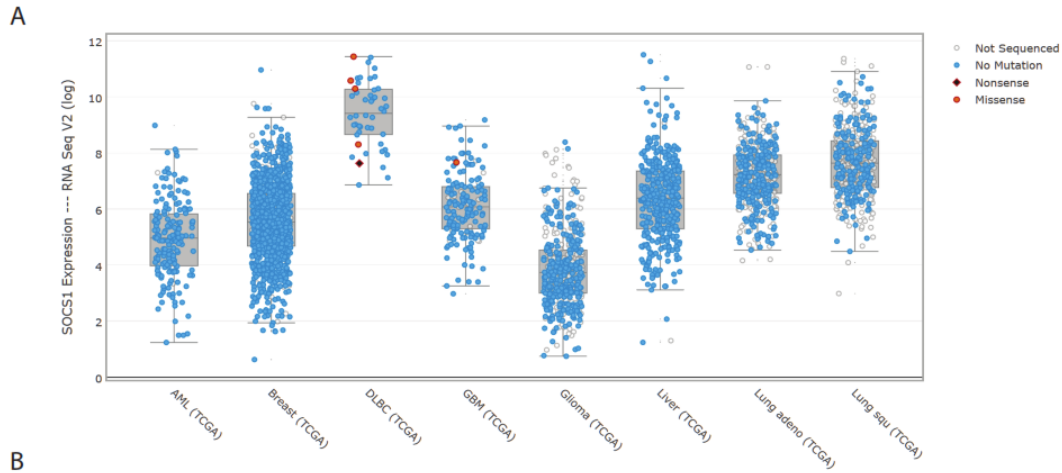
Supplementary figure 3.1 The hydrophobic motif contained in p53 is conserved among many transcription factors.

Mutation	Cancer type	Amino acid change	Mutation type
c.236T>G	Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL)	F79C	Substitution - missense
c.240C>G	DLBCL and Hodgkin's	Y80*	Substitution - nonsense
c.236_237ins39	DLBCL	p.F79_Y80ins13	Insertion - In frame
c.241T>A	DLBCL	W81R	Substitution - Missense
c.190_200del11	DLBCL	p.Y64fs*49	Deletion - frameshift
c.165del1	Hodgkin's	p.F55fs*29	Deletion - frameshift
c.242 G>A	Hodgkin's	p.W81*	Deletion - frameshift
c.239 A>G	Hodgkin's	p.Y80C	Substitution - Missense
c.239A>C	DLBCL	Y80S	nsSNV
c.237C>G	DLBCL	F79L	nsSNV
c.232G>A	DLBCL	G78R	nsSNV
c.233G>T	DLBCL	G78V	nsSNV
c.243G>A	DLBCL	W81X	nsSNV
c.235T>G	DLBCL	F79V	nsSNV

Supplementary figure 3.2 List of SOCS1 mutations found in hematopoietic cancers.

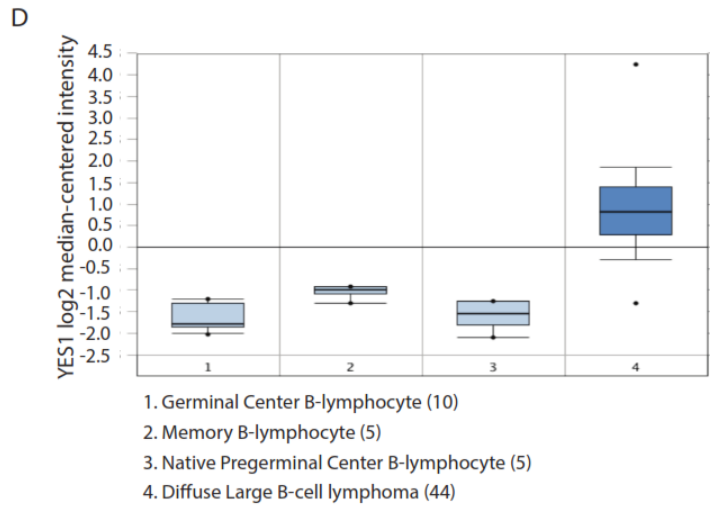


Supplementary figure 3.3 SOCS1 and SOCS1 mutants' phenotypes are dependent on p53.



C

Gene A	TP53
Gene B	SOCS1
p Value	<0.001
Log Odds Ratio	-0.681
Association	Tendency towards mutual exclusivity

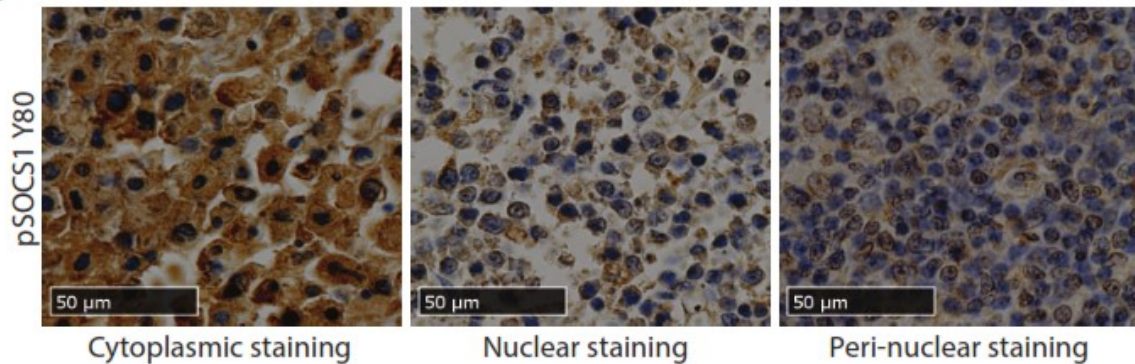


Supplementary figure 3.4 SOCS1, p53, and YES1 expression levels in DLBCL

A

Lymphoma Subtype	# patients
Diffuse Large B Cell Lymphoma (DLBCL)	126
Diffuse Small B Cell Lymphoma	3
Nodular B cell Lymphoma	2
Diffuse Large Cleaved Cell Lymphoma	1
Burkitt Like Lymphoma	3
T Cell Lymphoma	21
Lymphoplasmacytoid Lymphoma	4
Mantle Cell Lymphoma	1
Angioimmunoblastic Lymphoma	5
Anaplastic Large Cell Lymphoma	7
Hodgkin's Lymphoma	12
Follicular B Cell Lymphoma	5
Other	2

B



Supplementary figure 3.5 Examples of pSOCS1 phenotypes of staining in lymphomas and normal lymph nodes

4. Discussion

4.1 Discussion du chapitre 2

Les résultats présentés dans le chapitre deux ont permis de démontrer par une méthode non biaisée que SOCS1 régule p53 et d'identifier les gènes cibles de p53 contrôlés par SOCS1. Parmi ces gènes, l'on ne retrouve que très peu des cibles classiques de p53 : seuls *SerpineE1* et *NOXA* étant régulés par SOCS1. Les autres gènes identifiés sont des cibles moins classiques ou nouvelles. Une analyse Oncomine des différentes cibles de p53 contrôlées par SOCS1 fut effectuée et celle-ci démontre que la plupart de ces gènes sont sous-exprimés dans les tumeurs humaines. Plusieurs de ces gènes sont peu ou pas étudiés, ce qui pourrait ouvrir des avenues intéressantes de recherche.

Enfin, des analyses GSEA en combinaison avec la liste de gènes régulés révèle que plusieurs processus impliqués dans la ferroptose étaient dérégulés dans les cellules lorsque SOCS1 était absent. L'expression du gène *SLC7A11*, qui a été identifié comme un régulateur clé de ce processus et qui est une cible transcriptionnelle de p53, est augmenté par la diminution de SOCS1. Cela relie donc SOCS1 à un tout nouveau mécanisme de suppression tumorale.

Pour terminer, puisque la surexpression de SOCS1 induit la sénescence, nous avons voulu explorer si le fait d'induire la sénescence sensibilise les cellules à la ferroptose. Nous avons donc utilisé trois modèles acceptés de sénescence cellulaire : celle induite par l'oncogène RASV12, celle par induite par l'oncogène STAT5 et celle induite par le suppresseur tumoral PML. Les résultats obtenus montrent que les cellules RAS et STAT5 étaient légèrement plus sensibles à la mort cellulaire par ferroptose alors que les cellules PML y étaient totalement résistantes. Il ne semble donc pas que la sénescence soit un facteur commun à la sensibilité des cellules.

4.1.1 SOCS1 active un programme transcriptionnel spécifique

Plusieurs facteurs contrôlent la réponse activée par p53 dans les cellules, et bien que l'on ne sache pas encore prédire quels gènes seront induits et quels gènes sont importants pour la suppression tumorale, certains facteurs modulant la réponse activée par p53 ont été analysés.

Ainsi, un groupe de recherche a démontré en 2012 que la cinétique d'activation de p53 jouait un rôle important dans le type de réponse qui sera produite³⁹¹. Il est connu que certaines propriétés dynamiques d'activation, comme la fréquence oscillatoire ou la durée du signal, peuvent modifier l'expression génique³⁹²⁻³⁹⁵. Il a aussi été montré que des stress précis induisent des patrons dynamiques d'activation de p53 qui sont différents³⁹⁶. Par exemple, les cassures de l'ADN double-brin causées par l'irradiation γ provoquent une activation de p53 qui se caractérise par des pulsations³⁹⁷⁻³⁹⁹, donc une augmentation rapide suivie par une diminution rapide du niveau de la protéine et ce, en cycles. Au contraire, l'irradiation aux rayons ultraviolets provoque une activation soutenue des niveaux protéiques de p53³⁹⁶.

Les auteurs ont pu montrer que le dynamisme d'activation s'accompagnait de l'induction de différents gènes cibles et que ceux-ci suivaient le patron d'activation protéique de p53³⁹¹. De plus, seule une activation soutenue peut induire des gènes impliqués dans l'induction de la sénescence et ceux-ci sont induits plus tardivement. Finalement, il a été montré qu'une plus grande quantité de p53 s'accumule dans les cellules soumises à une activation continue, mais les auteurs ont montré que, pour un niveau protéique identique de p53, une activation persistante causait une plus grande augmentation des niveaux de ses gènes cibles qu'une activation pulsée et que le choix du destin cellulaire était donc régulé par la dynamique d'activation et non par la quantité de p53 accumulée³⁹¹.

Nous avons mesuré les niveaux de p53 induits par SOCS1 en combinaison avec des traitements à la doxorubicine, une drogue causant des dommages à l'ADN et provoquant l'activation de p53. Nous avons pu montrer que SOCS1 permettait une plus grande stabilisation des niveaux totaux de p53 sans affecter sa phosphorylation en sérine 15 en réponse à cette drogue. Notre laboratoire a déjà publié que SOCS1 stimule la phosphorylation de p53 sur la sérine 15³⁰², mais il est probable que la doxorubicine active déjà p53 de façon maximale et que dans ce contexte SOCS1 ne fasse pas de différence. De plus, cette activation montre une dynamique soutenue et non oscillatoire. Il serait intéressant d'effectuer une expérience avec un vecteur inductible pour SOCS1, permettant de voir le dynamisme de l'activation de p53 uniquement en réponse à l'induction de SOCS1.

Il est très intéressant de savoir que SOCS1 a la capacité de stabiliser les niveaux de p53 en plus de permettre son activation. En effet, selon les résultats du dynamisme oscillatoire de

p53, c'est l'activation soutenue qui permet l'induction de gènes impliqués dans l'induction de la sénescence, et donc qui permet un phénotype durable, contrairement à un arrêt transitoire du cycle cellulaire. Cela va donc de pair avec le fait que la surexpression de SOCS1 dans des cellules normales provoque leur entrée en sénescence. Il est possible qu'en se liant à p53, SOCS1 compétitionne avec MDM2, leurs sites de liaison étant proches l'un de l'autre. Nous avons aussi découvert que SOCS1 peut se lier à KAP1 et que cela affecte la stabilité de p53. Ce point sera discuté ultérieurement. Il serait de ce fait intéressant d'observer les niveaux protéiques de p53 au cours du temps dans l'expérience de contournement de la sénescence induite par STAT5a combinée avec l'inhibition de SOCS1. Il serait alors possible de voir si l'oscillation de p53 est modifiée lors du contournement de la sénescence en plus de son niveau de phosphorylation. Enfin, le choix de regarder la phosphorylation en sérine 15 est biaisé et il est possible que SOCS1 affecte la modification post-traductionnelle de d'autres acides aminés de p53. Il serait judicieux d'en étudier davantage.

Parmi les cibles non conventionnelles de p53 que nous avons identifiées, quelques-unes méritent notre attention. En effet, selon l'analyse Oncomine, *ABCA8*, *ATF3*, *PPP1R3C*, *NTN4* et *SVEP1* sont sous-exprimés dans presque tous les types de cancers. *ABCA8* est un gène très peu étudié jusqu'ici. Il fait partie de la famille des transporteurs transmembranaires ABC et permet le transport de cholestérol et de diverses drogues⁴⁰⁰. Sa diminution d'expression corrèle avec différents aspects clinico-pathologiques de plusieurs cancers⁴⁰¹. ATF3 est un facteur de transcription qui est classé comme ayant des rôles à la fois de suppresseur tumoral et d'oncogène. C'est un facteur de régulation des réponses immunitaires qui peut antagoniser la transcription par NFkB et AP-1⁴⁰². NTN4 (*Netrin4*) a été démontré être un régulateur de l'angiogenèse et son expression affecte la prolifération des cellules cancéreuses. Toutefois, certaines études montrent qu'il joue un rôle pro-angiogenèse et favorisant la croissance⁴⁰³ tandis que d'autres études montrent le contraire⁴⁰⁴. C'est aussi une protéine peu étudiée et dont le rôle sera à préciser. PPP1R3C est une protéine qui lie la phosphatase PP1 (*Protein Phosphatase 1*) et qui semble impliquée dans le métabolisme du glycogène. Sa surexpression cause une augmentation des niveaux de glycogène en conditions basales et en réponse à l'insuline⁴⁰⁵. Cette protéine a été très peu étudiée dans un contexte tumoral, mais dans une lignée de carcinome hépatocellulaire, PPP1R3C protège les cellules contre le stress oxydatif dû à la pénurie de

glucose⁴⁰⁶. Sa diminution provoque la mort cellulaire⁴⁰⁶. Toutefois, le promoteur de ce gène est fréquemment méthylé dans les cancers. SVEP1 est aussi une protéine nouvellement caractérisée et peu étudiée. Son rôle premier semble être l'adhésion cellulaire⁴⁰⁷ et son rôle dans les cancers n'a pas été étudié. Le point commun de toutes ces protéines est qu'elles sont nouvellement identifiées et peu étudiées, mais sont impliquées dans des processus fréquemment dérégulés lors de la transformation et la progression tumorales. Il sera donc intéressant de se pencher sur leurs rôles de potentiels suppresseurs tumoraux.

4.1.2 SOCS1, p53 et la régulation de l'immunité

Les rôles de SOCS1 dans l'immunité sont bien connus et ont été décrits dans l'introduction de cette thèse. La capacité à contrôler l'immunité virale, l'immunité antitumorale et l'autoimmunité semble être un autre point commun que partagent p53 et SOCS1. P53 peut être induit par une réponse à l'interféron α et β et sa présence lors d'une infection virale permet d'augmenter la réponse antivirale en induisant l'apoptose par exemple⁴⁰⁸. De plus, il est connu que p53 transactive certains gènes directement impliqués dans la réponse immunitaire tels que *CCL2*, *IRF5*, *IRF9*, *ISG15*, *TLR3* et *PKR*⁴⁰⁸. D'ailleurs, plusieurs virus ont développé des systèmes permettant l'inactivation de p53⁴⁰⁸. Il est à noter que *CCL2* était l'un des gènes dérégulés en absence de SOCS1 dans notre expérience de micropuces à ADN.

Il semble aussi que des dysfonctions de p53 occasionnent le développement de maladies auto-immunes, comme c'est le cas pour SOCS1, ce qui suggère que normalement, la protéine agit afin d'empêcher ce processus en inhibant les cytokines pro-inflammatoires⁴⁰⁸. Des mutations de p53 ont été associées à de nombreuses maladies autoimmunes. Au niveau moléculaire, p53 est capable d'inhiber l'induction d'*IL6* en se liant à son promoteur ainsi que de contrôler la signalisation par NF κ B aux promoteurs de ses gènes cibles⁴⁰⁸. SOCS1 quant à lui est capable de directement inhiber la signalisation par NF κ B en causant sa dégradation protéique. Puisque SOCS1 permet l'activation de p53 il est possible que, selon le contexte, SOCS1 favorise aussi la transcription de gènes cibles de p53 liés à l'immunité. Les deux protéines semblent avoir des rôles qui vont dans la même direction. Il serait intéressant de voir si l'absence de SOCS1 dans le cadre d'une infection virale empêche l'induction des gènes cibles

de p53 importants pour la réponse antivirale et donc si SOCS1 est requis dans ce contexte pour l'activation de p53.

4.1.3 SOCS1, un nouveau régulateur de ferroptose

Nous avons montré que SOCS1 est apte à sensibiliser les cellules à la ferroptose par des traitements au tert-butyl-hydroperoxyde. En effet, l'observation de l'augmentation des niveaux du gène *SLC7A11* lorsque l'expression de SOCS1 est diminuée suggérait une implication de ce dernier dans cette mort cellulaire. *SLC7A11* est un des constituants du système X_c^- , un contre-transporteur de cystine-glutamate.

Jiang et al. ont analysé les gènes cibles affectés par l'expression du mutant p53^{3KR}, ce mutant qui perd la capacité d'induire l'apoptose et la sénescence mais qui conserve les fonctions de suppression tumorale, par rapport aux cellules contrôles¹⁴⁴. Parmi les gènes différemment régulés, l'expression de *SLC7A11*, un régulateur de ferroptose, était diminuée par l'expression de p53. Les auteurs ont par la suite montré que l'expression de *SLC7A11* était diminuée lors de l'activation de p53 par traitement à la nutline3a et par traitement causant des dommages à l'ADN. Bien que nous n'ayons pas publié ce résultat, nous avons testé la répression de *SLC7A11* par qPCR en réponse à la nutline3a et à la doxorubicine dans les mêmes cellules que celles utilisées dans cet article et bien que la doxorubicine diminue l'expression de *SLC7A11*, la nutline3a l'augmentait grandement (Figure A1.A, Annexe). Toutefois, Jiang et al ont regardé les niveaux protéiques de *SLC7A11* pour cette expérience, alors que nous avons mesuré les niveaux d'ARN messager. Il est d'ailleurs étonnant qu'ils n'aient pas mesuré les niveaux du transcrit puisqu'ils l'ont fait dans les autres expériences sans traitement à la nutline3a et qu'ils proposent que p53 contrôle la transcription de ce gène en liant son promoteur, tel que démontré par ChIP. Mais cela semble indiquer que la régulation de *SLC7A11* par p53 n'est peut-être pas aussi directe que ce qu'il y paraît au premier abord. De plus, bien que les auteurs aient montré que la diminution de p53 empêche la diminution de *SLC7A11* en réponse à la nutline3a (au niveau protéique), nos résultats montrent que SOCS1 est capable de diminuer les niveaux de *SLC7A11* même en absence de p53. Il est possible que l'effet de p53 soit indirect, des études ayant démontré assez clairement que p53 est uniquement un activateur transcriptionnel⁴⁰⁹. Toutefois, l'effet de p53^{3KR} sur la diminution de tumeurs *in vivo* est très convaincant et les

auteurs ont clairement démontré que c'était dépendant de SLC7A11. La régulation de ce gène semble donc essentielle à l'induction de ferroptose médiée par p53, mais le mécanisme mériterait d'être déterminé rigoureusement. Les auteurs ont ensuite évalué la contribution de la signalisation par les ROS dans l'induction de la ferroptose par p53. Ils ont pu montrer que la combinaison d'un traitement de ROS avec l'activation de p53^{3KR} induisait un très haut taux de mort cellulaire qu'ils ont caractérisée comme étant de la ferroptose, alors que chaque élément séparément n'avait que peu d'effet. C'est ce que nous avons pu constater avec la surexpression de SOCS1. Lorsque SOCS1 est surexprimé seul, il y a peu de mort cellulaire, mais la présence de ROS permet à SOCS1 d'activer le programme de ferroptose, ce qui s'accompagne d'une diminution des niveaux de glutathion. Il serait intéressant de surexprimer SOCS1 avec un shp53 et d'évaluer si la présence de ROS est tout de même en mesure de causer l'induction de ferroptose.

Il a par la suite été montré par d'autres études que p53 est en mesure de contrôler d'autres aspects de la ferroptose. En effet, d'autres gènes cibles de p53, *GLS2* et *SAT1*, semblent aussi nécessaires à l'induction de la ferroptose. La glutaminolyse, via GLS2, joue un rôle essentiel dans l'induction de ferroptose. Un variant polymorphique africain, p53 P47S, permet l'activation des programmes de sénescence et d'apoptose mais a perdu ses fonctions de suppression tumorale. Ce variant n'est pas en mesure de réguler les niveaux de *SLC7A11* et de *GLS2*¹⁴⁶. Enfin, une étude a montré que *SAT1* est une cible transcriptionnelle directe de p53 et qu'elle permet l'augmentation d'ALOX15, une enzyme liant le fer et permettant l'oxydation des PUFA⁴¹⁰. Cela relie donc aussi p53 à l'accumulation de lipides peroxydés, qui est essentielle à la ferroptose.

Nous avons trouvé par analyse informatique, que les niveaux de SAT1 semblent corrélés avec les niveaux de SOCS1 dans le cancer. SAT1 était l'un des gènes dérégulés lorsque SOCS1 est inhibé, selon nos travaux. Toutefois, la surexpression de SOCS1 seule dans les cellules U2OS et les IMR90 n'est pas suffisante pour induire SAT1 (Figure A1.B, Annexe). Il est possible qu'il manque un contexte cellulaire spécifique nécessaire à l'induction de ce gène lorsque seul SOCS1 est surexprimé. Il est aussi intéressant de noter que les auteurs Ou et al ont montré que ni p53 ni SAT1 seuls ne peuvent induire la ferroptose. Toutefois, alors que la surexpression de SAT1 seul dans les cellules en culture n'avait aucun impact sur leur

prolifération, sa surexpression *in vivo* dans des tumeurs causait une régression de ces tumeurs. Il a été postulé que c'était possiblement le rôle d'ALOX15 dans l'inflammation et l'immunité qui pouvait causer cette régression⁴¹¹.

Ces résultats ouvrent la porte à bien des questions et à de nombreuses futures expériences. Parmi les voies de signalisation affectées par SOCS1, l'analyse GSEA (*Gene Set enrichment Analysis*) nous a permis d'identifier la réponse aux phospholipides oxydés. Il sera donc très pertinent d'évaluer si la surexpression ou la diminution de SOCS1 affectent l'oxydation des lipides. Des études de base peuvent servir à déterminer s'il y a un changement global de niveaux de lipides oxydés, comme décrit dans l'introduction de cette thèse avec le C-11-lipid BODIPY et le liperfluor. Des études de spectrométrie de masse pourraient ensuite permettre de déterminer les lipides spécifiquement modifiés. Il sera aussi très intéressant de voir si SOCS1 sensibilise les cellules à l'induction de ferroptose par d'autres agents inducteurs que l'apport exogène de ROS. Par exemple, combiner SOCS1 et l'érastrine ou encore SOCS1 et des inhibiteurs de GPX4 pourrait permettre de mieux comprendre comment SOCS1 contrôle cette mort cellulaire. Il serait aussi pertinent de mesurer l'activité enzymatique de GPX4 en absence de SOCS1 et lorsque ce dernier est surexprimé, afin de voir si SOCS1 peut affecter cette enzyme clé.

Des critères ont été proposés afin de déterminer si une mort cellulaire peut être catégorisée de mort par ferroptose, mais nous n'avons pas évalué chacun de ces critères. Nous avons montré l'inhibition du système X_c^- et la baisse des niveaux de glutathion, ainsi que le contournement de la mort cellulaire avec un chélateur de fer. Toutefois, l'inhibition de la mort cellulaire avec un antioxydant lipophile et avec le β -mercaptoéthanol ainsi que la mesure de l'accumulation de lipides peroxydés seraient nécessaires afin de rigoureusement définir cette mort cellulaire comme de la ferroptose.

Les niveaux de NADPH des cellules cancéreuses sont associés à leur sensibilité à la ferroptose¹⁹⁵. Il pourrait être intéressant d'obtenir un panel de lignées avec de hauts ou de bas niveaux de NADPH afin de tester si la surexpression de SOCS1 permet l'induction de mort cellulaire par ferroptose spécifiquement dans les lignées possédant des hauts niveaux de NADPH.

Finalement, nous avons voulu évaluer si la sénescence cellulaire était un mécanisme qui affecte la sensibilité des cellules à l'induction de ferroptose. Nos résultats montrent que divers types de sénescence provoquent des sensibilités différentes à la mort cellulaire. La sénescence ne semble donc pas un mécanisme universel de contrôle de ferroptose. Il est par contre très intéressant de noter que certains types de sénescence, comme la sénescence induite par PML, provoquent une très grande résistance à l'induction de ferroptose. La découverte du mécanisme causant cette résistance pourrait mener à une meilleure compréhension du mécanisme de ferroptose et possiblement à des traitements pour des maladies dégénératives qui sont causées par la mort cellulaire par ferroptose¹⁸¹. Un screen de shARN ou de petits guides de CRISPR-Cas9 pourrait permettre de trouver les gènes synthétiques-létaux pour PML en présence d'un traitement au tert-butyl-hydroperoxyde. Il est intéressant de noter que la sénescence par PML dépend peu de la voie de p53, ce qui pourrait donner une piste quant à leur résistance.

4.1.4 SOCS1 et la régulation par KAP1

Notre laboratoire avait identifié la protéine KAP1, ou TRIM28, comme un partenaire potentiel d'interaction de SOCS1 dans une expérience de spectrométrie de masse⁴¹². Nous avons pu confirmer cette interaction par co-immunoprécipitation dans des cellules et montrer qu'elle est directe par la méthode de GST-pulldown *in vitro*. Deux groupes ont montré que KAP1 lie la protéine MDM2 en complexe avec p53^{413,414}. Il est proposé que la liaison de KAP1 à MDM2 favorise l'ubiquitination de p53 et sa dégradation. La diminution de KAP1 sensibilise les cellules à l'activation de p53 suite à des dommages à l'ADN. Les auteurs ont montré que KAP1 interagit avec MDM2 via son domaine CC (*Coiled Coil*) et forme un complexe ternaire avec p53. Ils montrent également que cela permet au domaine PHD/Bromo de recruter des complexes d'histone désacétylases permettant la désacétylation de p53. Étant donné que les groupements acétyl et l'ubiquitine sont ajoutés sur les mêmes résidus, ceci pourrait permettre l'ubiquitination et la dégradation subséquente de p53. Les auteurs ont par la suite montré que KAP1 coopère avec MDM2 en induisant de plus hauts niveaux d'ubiquitination de p53 que lorsque seul MDM2 est présent.⁴¹⁴

Ainsi, KAP1 semble être un régulateur négatif de p53 causant sa déstabilisation. Il est donc très intéressant que SOCS1 interagisse avec KAP1. Cette interaction pourrait empêcher la

formation du complexe p53-MDM2-KAP1. SOCS1 pourrait donc séquestrer KAP1 pour l'empêcher d'inactiver p53. Toutefois, ce mécanisme semble peu plausible puisque l'on sait que SOCS1 est aussi impliqué dans un complexe ternaire avec p53 et ATM afin de faciliter la phosphorylation et l'activation de p53. Il doit effectivement exister une compétition entre la liaison de p53 à SOCS1 et celle de KAP1 à SOCS1, étant donné que nos résultats (non publiés) semblent indiquer une liaison au même site sur SOCS1 pour les deux protéines. Or, KAP1 est aussi une cible d'ATM, qui le phosphoryle sur la S824, ce qui semble inhiber ses fonctions : il en résulte une dé-répression de p21 et GADD45 α , deux gènes cibles de p53⁴¹⁵. Il est donc possible que SOCS1 joue un double rôle : il pourrait être lié plus fortement avec les kinases ATM ou ATR qu'avec ses substrats, permettant ainsi à la fois la phosphorylation de KAP1, la dissociation du complexe MDM2-p53 et la stabilisation des niveaux de p53, ainsi que sa phosphorylation subséquente par le complexe ATM/SOCS1. En bref, l'interaction de SOCS1 et KAP1 permet d'expliquer comment SOCS1 stabilise les niveaux totaux de p53. Il serait intéressant de refaire l'expérience dans laquelle SOCS1 est combiné à un traitement à la doxorubicine dans des cellules où KAP1 est absent. Cela permettrait de confirmer que le mécanisme est bel et bien KAP1-dépendant.

4.2 Discussion du chapitre 3

Les résultats présentés au chapitre 3 ont permis d'identifier le mécanisme par lequel SOCS1 interagit avec p53, en plus de découvrir un nouveau site de modification de SOCS1, la phosphorylation en tyrosine 80, par la famille SFK. Nous avons en outre découvert que SOCS1 peut dimériser, ce qui représente un tout nouveau mode de régulation pour les SOCS, cela n'ayant jusqu'ici jamais été démontré. Ces nouveaux modes de régulation ouvrent la porte à une nouvelle biologie pour les SOCS.

Finalement, SOCS1 est un suppresseur tumoral dont l'expression est diminuée dans de nombreux cancers. Toutefois, son expression est augmentée dans certains cancers, ce qui peut suggérer que son activité est inhibée par une modification post-traductionnelle. Nous avons donc identifié que l'expression de SOCS1 est augmentée dans les lymphomes de type DLBCL et que l'expression des SFK y est aussi augmentée. Des immunohistochimies de tissus de patients atteints de DLBCL ont été effectuées avec l'anticorps monoclonal reconnaissant SOCS1

phosphorylé en tyrosine 80, ainsi qu'avec un anticorps reconnaissant les SFK sous forme active. Les résultats ont montré que pSOCS1 est dérégulé dans ces lymphomes et que sa présence corrèle avec le marquage de SRC activé.

4.2.1 SOCS1, un régulateur transcriptionnel?

Il est important de mentionner que la liaison du domaine SH2 de SOCS1 au TAD2 de p53 est un résultat qui impliquait très assurément un mécanisme d'interaction non-canonique des SOCS avec les JAKs. En effet, le TAD2 de p53 ne possède pas de résidu tyrosine, alors que les domaines SH2 sont connus comme des domaines d'interaction avec les tyrosines phosphorylées.

Une analyse informatique a permis de déterminer si le motif hydrophobe présent dans le TAD2 de p53 et responsable de l'interaction avec SOCS1 était présent au sein de d'autres protéines. Nous avons ainsi trouvé que de nombreux facteurs de transcription possèdent ce type de motif. Cela pourrait donc suggérer que SOCS1 serait en mesure de lier de nombreux autres facteurs de transcription et d'agir en tant que régulateur transcriptionnel. Au sein de cette liste d'interactants potentiels de SOCS1, on peut noter KAP1, Tax et NFκB. Nous avons précédemment démontré que KAP1 et SOCS1 interagissent ensemble et il a été publié que SOCS1 lie et inactive NFκB³⁰³. Un groupe a aussi publié que l'oncoprotéine virale Tax interagit avec SOCS1 afin d'inhiber la signalisation antivirale dans le cadre de l'infection par le virus HTLV-1 (*Human T cell Leukemia Virus type 1*)⁴¹⁶. On retrouve aussi dans cette liste les autres membres de la famille p53 : p73 et p63. Nous avons réussi à démontrer que SOCS1 interagit avec p73. Nous avons aussi des résultats préliminaires qui indiquent l'interaction de SOCS1 avec p63 et avec E2F1 (résultats non publiés).

Un des deux isoformes les plus représentatifs de p73, TATP73, possède des fonctions de suppression tumorale semblables à celles de p53⁴¹⁷. TATP73 est capable d'induire l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose et de réguler la stabilité génomique. Les souris nulles pour TATP73 développent spontanément des cancers dans 70% des cas, particulièrement des tumeurs du poumon⁴¹⁷. MDM2 ne mène pas à l'ubiquitination et la dégradation de p73, mais il lie son TAD et empêche la transactivation de ses gènes cibles. TATP73 peut contrôler certaines des mêmes cibles que p53, mais semble aussi capable d'avoir des activités spécifiques⁴¹⁷. De plus, p73 ne

semble pas phosphorylé par ATM ou ATR. Avec l'existence de très nombreux isoformes, p73 a des fonctions de suppresseur tumoral mais aussi d'oncogène. Il pourrait être intéressant d'étudier à quels isoformes SOCS1 est capable de se lier et si SOCS1 provoque la phosphorylation ou l'ubiquitination de p73.

4.2.2 Modifications post-traductionnelles de SOCS1

Quelques études ont démontré que SOCS1 était phosphorylé sur des résidus tyrosine et sur des résidus sérine. Ces modifications étaient généralement synonymes de perte d'activité de suppression tumorale par SOCS1. En effet, sa phosphorylation indirecte par v-Abl cause une perte d'interaction avec le complexe E3-ubiquitine ligase et déstabilise la protéine SOCS1. Cette dernière n'est alors plus en mesure de contrôler la voie JAK/STAT. La phosphorylation sur des tyrosines par BCR-ABL semble aussi inactiver SOCS1. L'injection de cellules K562 qui surexpriment SOCS1 sauvage dans des souris résulte en la formation de tumeurs, sans grande différences avec les cellules contrôles. Toutefois, la surexpression de SOCS1 contenant la mutation des tyrosines Y204 ou Y155 en phénylalanine, soit des formes de SOCS1 qui ne peuvent être phosphorylées par BCR-ABL, arrête la croissance des tumeurs dans ce même modèle de xénogreffes. Par contre, l'étude sur la phosphorylation de SOCS1 par BCR-ABL n'a pas montré directement la phosphorylation des résidus de SOCS1. L'utilisation du mutant Y80F démontrait aussi une diminution de phosphorylation par BCR-ABL lors d'une IP SOCS1 et d'un immunobuvardage contre les tyrosines phosphorylées²⁶⁰. Toutefois, ce mutant n'a pas été utilisé pour le reste de l'étude. Il est donc possible que BCR-ABL puisse également phosphoryler SOCS1 sur la tyrosine 80. Nous avons tenté d'explorer cette hypothèse sans obtenir de résultats suggérant que BCR-ABL phosphoryle ce résidu (résultats non publiés).

Nous nous sommes penchés sur le rôle de la tyrosine 80 dans le cadre de son interaction avec p53. Toutefois, les résultats que nous avons obtenus par rapport à la capacité de SOCS1 et de ses mutants à inhiber l'activation de STAT1 montrent un défaut de rétro-inhibition de STAT1 par le mutant Y80D. Cela pourrait donc signifier que cette phosphorylation affecte ces deux mécanismes : l'inhibition de la voie JAK/STAT et la régulation de p53, et qu'elle inhibe différentes facettes de la suppression tumorale médiée par SOCS1. Il sera donc intéressant dans

le futur de tester si le mutant Y80D est en mesure d'interagir avec JAK2 et les récepteurs des cytokines.

Enfin, il serait intéressant d'évaluer si la phosphorylation de SOCS1 peut entraîner d'autres modifications post-traductionnelles. Étant donné la faible demi-vie de la protéine, il a déjà été proposé que SOCS1 puisse être la cible d'ubiquitination et de dégradation via le protéasome. Il a été montré que SOCS2 cause la dégradation de SOCS3 via le protéasome⁴¹⁸. Dans notre spectrométrie de masse ayant permis l'identification de la phosphorylation en tyrosine 80, deux autres tyrosines n'étaient pas phosphorylées : Y155 et Y204. La quatrième tyrosine de SOCS1 était dans un peptide non détecté par l'expérience. SOCS1 contient également une seule lysine, ce qui limite l'abondance d'autres modifications post-traductionnelles. Cette lysine n'était pas modifiée dans notre expérience dans trois lignées cellulaires différentes (BV173, HepG2 et IMR90). SOCS1 avait toutefois été incubé avec les lysats cellulaires de ces trois lignées sans autre stimulation. Il est donc possible que d'autres modifications surviennent lors d'un stimulus approprié. Il pourrait être intéressant de reproduire cette expérience de spectrométrie de masse en soumettant les cellules à divers stress, afin d'avoir un portrait plus précis des modifications post-traductionnelles de SOCS1.

4.2.3 Un mécanisme généralisé?

Nous avons procédé à l'alignement des séquences des différentes protéines de la famille des SOCS afin de voir si la tyrosine 80 et le tryptophane 81 que nous avons identifiés comme importants pour l'interaction avec p53 étaient conservés à travers cette famille. Le résultat est présenté en annexe (Figure A2) et permet de constater que ces deux acides aminés sont conservés à travers toute la famille. Cela est très intéressant car ce fait pourrait suggérer que la phosphorylation de cette tyrosine est un mécanisme universel de régulation des SOCS. Cela peut aussi suggérer que tous les membres de la famille pourraient interagir avec p53 ou des protéines possédant un motif hydrophobe. Nous avons testé cette hypothèse par un essai d'interaction GST-pulldown *in vitro* et avons pu valider que les domaines SH2 de tous les SOCS sont en mesure d'interagir avec p53 (Figure A2.B, Annexe).

Il a été publié par un autre groupe que SOCS3 interagit avec p53, ce qui constitue une première confirmation de notre résultat⁴¹⁹. Nous avons confirmé ce résultat par co-

immunoprécipitation dans les U2OS, ainsi que l'interaction de p53 avec SOCS7 (résultats non montrés).

Le rôle des autres SOCS est moins bien étudié que celui de SOCS1. SOCS2 et CIS ne lient pas les JAKs et ne sont pas en mesure d'inhiber leur activité. Toutefois, SOCS2 régule d'autres récepteurs et semble réguler d'autres membres de la famille SOCS, comme SOCS1 et SOCS3. En effet, SOCS2 peut causer la dégradation via le protéasome de SOCS3⁴¹⁸. Un rôle similaire a aussi été démontré pour SOCS2, SOCS6 et SOCS7, qui peuvent interagir avec les SOCS-box de tous les SOCS avec des affinités variables⁴²⁰. En contrôle, CIS était incapable de lier le SOCS box d'un autre membre de la famille. Il semblerait donc que certains membres de la famille SOCS agissent en tant que régulateurs négatifs, bloquant l'inhibition médiée par d'autres membres de la famille et stimulant la réponse aux cytokines⁴²⁰. SOCS6 semble aussi jouer des rôles dans le noyau.

Si tous les SOCS sont susceptibles d'être phosphorylés sur l'équivalent de la tyrosine 80 de SOCS1, il sera très intéressant d'étudier l'impact de cette modification pour chacun des membres de la famille. Il est très possible que les fonctions affectées varient d'un membre à l'autre. Il en va de même pour l'interaction avec p53. Alors que SOCS1 permet l'activation du gardien du génome, ainsi que SOCS3, il est possible que d'autres membres de la famille causent plutôt sa dégradation, ou son activation dans un contexte différent de celui de dommages à l'ADN et de l'activation oncogénique de STAT5, comme c'est le cas pour SOCS1.

4.2.4 Régulation de SOCS1 par phosphorylation et dimérisation

Nous avons découvert que la protéine SOCS1 dimérise lorsqu'elle est phosphorylée et nous avons réussi à confirmer que cette dimérisation se produit également au sein des cellules. En effet, en co-exprimant la protéine avec soit une étiquette FLAG, soit une étiquette MYC, nous avons été en mesure de montrer que FLAG SOCS1 interagit avec MYC SOCS1 par immunoprécipitation. La dimérisation de SOCS1 représente un tout nouveau mode de régulation de cette protéine, mais aussi possiblement de toute la famille SOCS, qui possède le motif conservé de la tyrosine.

La structure protéique de SOCS1 n'a jamais été résolue étant donné la difficulté que représente sa purification. Toutefois, des structures de SOCS3 ont été obtenues, ainsi qu'une

prédiction de structure de SOCS1^{421,422}. Ces structures apportent des informations importantes quant au mécanisme d'action de ces protéines. Les structures à la fois de SOCS3 et SOCS1 ont montré que la tyrosine 80 de SOCS1 et son équivalent, la tyrosine 47 de SOCS3, sont situées dans une boucle où les résidus sont accessibles. Cette tyrosine est aussi située à l'interface d'interaction entre une section du domaine SH2, le domaine d'inhibition des kinases et le domaine SH2 étendu (KIR-ESS). Il est possible que cette tyrosine soit importante afin de favoriser une conformation stable de la protéine et que sa phosphorylation puisse causer des changements dans les interactions intramoléculaires. En effet, le groupement hydroxyle de la tyrosine 80 forme un pont-hydrogène avec l'acide glutamique 106, qui est dans la boucle de liaison des tyrosines phosphorylées. La présence d'un groupement phosphate à cet endroit risque de déstabiliser cette interaction, mais pourrait créer un site de liaison pour une autre molécule de SOCS1.

Quelles sont les fonctions de cette dimérisation? Il est évident que des études plus poussées seront nécessaires pour répondre à cette question. Toutefois, *in vitro*, c'est la forme phosphorylée qui semble principalement dimériser. Puisque nous proposons que la phosphorylation en tyrosine 80 inhibe les rôles de suppression tumorale de SOCS1, il serait logique de supposer que la dimérisation inhibe les fonctions de SOCS1. Il sera aussi intéressant de savoir si c'est la phosphorylation qui cause la dimérisation ou si c'est la forme dimérique qui est phosphorylée. Une meilleure caractérisation du dimère dans un contexte endogène devrait aider à comprendre sa fonction. Bien qu'aucune structure de SOCS1 n'ait encore été réalisée, un groupe a publié récemment une méthode pour purifier la protéine⁴²³. Il serait donc extrêmement pertinent de déterminer la structure de SOCS1 sous forme monomérique et dimérique, par exemple en phosphorylant la protéine *in vitro* avant d'en déterminer la structure. Il est aussi possible que des hétérodimères de protéines SOCS se forment. Cela ouvrirait les portes à une toute nouvelle biologie et l'idée est loin d'être farfelue lorsqu'on sait que certains SOCS sont en mesure de lier le SOCS box de tous les membres de la famille, tel que vu précédemment⁴²⁰.

De plus, SOCS1 semble jouer le rôle d'un oncogène dans certains contextes et sa diminution dans ces contextes peut favoriser l'arrêt de prolifération ou la mort des cellules cancéreuses⁴²⁴. Cela pourrait signifier que SOCS1 est capable d'acquérir des fonctions

oncogéniques avantageuses pour une cellule cancéreuse, et que sa modification pourrait donc non seulement inhiber ses fonctions normales mais aussi lui apporter de nouvelles fonctions. Réaliser des études de protéomique pour connaître l'interactome de SOCS1 et ses modifications post-traductionnelles dans des modèles dans lesquels il agit à titre d'oncogène serait très pertinent. En effet, il est possible que la dimérisation et/ou la phosphorylation permettent à SOCS1 d'interagir avec de nouveaux partenaires, par exemple d'autres membres de la famille SOCS1, et inhibent leur fonction. Mettre au point la détection du dimère par gel non-dénaturant pourrait aussi permettre de déterminer si la dimérisation de la protéine est plus abondante lorsqu'elle agit comme un oncogène.

Une autre question intéressante concerne la localisation de SOCS1. SOCS1 a été considéré comme une protéine cytoplasmique pendant très longtemps, à cause de ses rôles dans la régulation de la voie JAK/STAT. Toutefois, SOCS1 possède un signal de localisation nucléaire⁴²⁵ et sa surexpression au sein de cellules en culture résulte en un signal majoritairement nucléaire³⁰². Nous avons aussi montré que dans le contexte de la sénescence, SOCS1 est localisé aux foci de dommages à l'ADN^{302,390}.

Il a été difficile de montrer que la surexpression de SOCS1 et des SFK causait une augmentation de phosphorylation dans les cellules et donc d'avoir un modèle d'étude où SOCS1 est abondamment phosphorylé. Entre autres, la surexpression de SOCS1 empêche la surexpression de YES1 dans les cellules, et la surexpression de YES1 cause une diminution des niveaux protéiques de SOCS1, ce qui rend ce système compliqué à utiliser (résultat non montré). De plus, SOCS1 est majoritairement localisé dans le noyau lorsqu'il est surexprimé, alors que les SFK sont des protéines majoritairement cytoplasmiques, ce qui ne favorise probablement pas leur interaction et la phosphorylation de SOCS1. Cela laisse aussi présager que la formation du dimère pourrait avoir lieu autant dans le noyau que dans le cytoplasme, puisque les deux protéines peuvent être localisées dans les deux compartiments. Il serait pertinent de savoir où est localisé le dimère de SOCS1 car il pourrait séquestrer la protéine dans un compartiment ou encore lui attribuer de nouvelles fonctions dans ce compartiment. Par exemple, le passage de SOCS1 de son rôle d'inhibiteur de la voie JAK/STAT à celui d'activateur de p53 n'est pas encore compris. Nous ne savons pas si l'un se fait au détriment de l'autre ou si les deux fonctions peuvent avoir lieu simultanément. Une technique qui serait pertinente pour étudier la

localisation du dimère est le PLA (*Proximity Ligation Assay*), qui permet grâce à l'utilisation de deux anticorps couplés à des oligonucléotides, de détecter un signal uniquement si les deux anticorps sont à une faible distance l'un de l'autre.

4.2.5 Régulation des SOCS par les SFK

Quelques études ont lié l'activité des SOCS à celle des SRC. Une étude a montré que SOCS1 peut réguler l'ubiquitination et la dégradation protéasomique de LYN, un membre de la famille SRC, via son recrutement par une autre protéine, CBP. Cela suggère donc que SOCS1 est en mesure d'interagir avec LYN.⁴²⁶ Une autre étude a démontré que SOCS3 est phosphorylé en réponse à l'IL2 et l'IL6 et que cette phosphorylation est dépendante de l'activité des SRC. Les auteurs de cette étude ne montrent pas directement que SRC phosphoryle SOCS3, mais leur étude suggère cette idée⁴²⁷. Nous avons réussi à démontrer que SOCS1 interagit avec YES1 par co-immunoprécipitation. Sachant que SRC phosphoryle SOCS1 *in vitro*, il serait attendu que ces deux protéines puissent également interagir au sein des cellules. Il sera donc intéressant de tester l'interaction de SOCS1 avec les autres membres de la famille SRC. Bien que nous ne nous soyons pas penchés sur cet aspect dans la présente étude, il semble aussi très probable que la voie de signalisation SRC-SOCS1 comporte une boucle de rétroaction. En effet, selon nos résultats et ceux de la littérature, il semble très probable que les SFK affectent les fonctions de SOCS1 par phosphorylation mais que SOCS1 contrôle aussi l'abondance des SFK.

Selon l'étude de spécificité de phosphorylation de substrats par les membres de la famille SRC, les kinases YES, LCK et BLK sont les plus semblables³⁶⁰. Toutefois, LYN, bien que dans le second groupe de kinases, est la plus proche du groupe de SRC, parmi les quatre membres de ce groupe. Étant donné que plusieurs substrats sont phosphorylés par tous les membres de la famille et que nous avons montré, minimalement, qu'à la fois YES et SRC phosphorylent SOCS1, il est possible que d'autres membres de la famille SRC puissent également accomplir ce rôle. Il sera important de tester les capacités des différents membres de la famille SRC à phosphoryler SOCS1 *in vitro*. Cela pourrait donner des indices sur les modèles dans lesquels l'étude de la phosphorylation de SOCS1 est pertinente, puisque certains membres de la famille SRC sont localisés spécifiquement dans certains tissus. Étant donné que nous proposons que SOCS1 joue un rôle dans les cellules B, il serait important de tester si les kinases BLK, LYN et

FYN peuvent phosphoryler SOCS1, puisque ce sont les plus importantes dans ce type de cellules⁴²⁸.

4.2.6 SOCS1, p53 et les SFK dans les cancers hématopoïétiques

Les lymphomes diffus à larges cellules (DLBCL) sont le type le plus fréquent de lymphome non-hodgkinien, représentant 30 à 40% des cas⁴²⁹. La thérapie de première ligne s'appelle « R-CHOP » et consiste en un traitement de rituximab avec cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine et prednisolone, pour 6 à 8 cycles. Toutefois, 10 à 15% des patients y sont réfractaires dès le départ et 20 à 30% des patients feront une rechute⁴³⁰. Les pronostics de survie pour ces cas sont très faibles. La mutation et la surexpression de TP53 représente un facteur de mauvais pronostic de survie⁴³¹. Il existe deux principaux sous-types de DLBCL, l'un provenant des centres germinaux (GCB) et l'autre provenant de cellules B activées (ABC, *Activated B Cells*). Le sous-type ABC répond moins bien à la thérapie R-CHOP, ce sous-type montrant un taux de 40% de survie sans progression en 3 ans versus 75% pour le sous-type GCB⁴³².

Une étude sur 201 patients atteints de DLBCL a montré que 33% d'entre eux étaient p53-positifs⁴³³. Le groupe p53 positif avait une survie générale plus faible que le groupe p53 négatif⁴³³. Bien que p53 soit muté dans ce type de cancer et que cela corrèle avec un mauvais pronostic et bien que l'expression augmentée de p53 soit fréquemment liée au fait qu'il soit muté, plusieurs études ont montré que p53 était muté dans 13 à 22% des DLBCL^{431,434,435} alors que son expression est augmentée dans 20 à 50% des cas⁴³⁶⁻⁴³⁹. Cela semble donc suggérer que même l'augmentation des niveaux de la protéine sauvage peut contribuer au mauvais pronostic. Toutefois, le développement de nouvelles molécules ou peptides permettant la réactivation de p53 muté progresse rapidement et il sera peut être possible de cibler les tumeurs possédant un p53 muté dans un futur proche.

Nous avons aussi effectué une analyse bioinformatique grâce à TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) qui montre que les niveaux d'expression de p53 dans les lymphomes de type DLBCL sont élevés par rapport aux autres types de cancer et que la protéine est peu fréquemment mutée comparativement aux autres tumeurs. Étant donné que nous avons observé une dérégulation de SOCS1 phosphorylé en Y80 dans ce type de cancer, nous pensons qu'il

existe une fenêtre thérapeutique dans laquelle les tumeurs positives pour p53, et dans lesquelles pSOCS1 est élevé pourraient répondre à des inhibiteurs de SFK comme le dasatinib. Cela pourrait permettre une réactivation de p53 dans ces tumeurs en inhibant la phosphorylation de SOCS1. De plus, il a été montré que SRC est constitutivement actif dans des lignées humaines de lymphomes de cellules B et particulièrement de DLBCL^{440,441}. Particulièrement, il a été montré que la kinase LYN était majoritairement phosphorylée⁴⁴⁰. Une autre étude a évalué l'activation des SFK dans des tissus humains de patients atteints de DLBCL et a conclu que 38% des échantillons de DLBCL démontraient une activation des SFK⁴⁴². Cette expression de SFK phosphorylé corrèle d'autant plus avec des marqueurs de mauvais pronostic (Ki67 et Mum1)⁴⁴². Le traitement de plusieurs lignées cellulaires de DLBCL avec le dasatinib résulte en une baisse de phosphorylation des SFK et une diminution de la prolifération cellulaire. Les résultats suggèrent que le mécanisme d'action du dasatinib dans ce type de lymphome est dépendant des SFK et non d'ABL (le dasatinib étant un inhibiteur à double spécificité ABL-SRC), car les cellules ne répondent pas à l'imatinib, un inhibiteur d'ABL^{441,442}.

Par contre, une étude a démontré que l'interaction entre les deux drogues rituximab et dasatinib était mauvaise : le dasatinib empêche l'expression d'anticorps anti-CD20 et affecte aussi l'efficacité du rituximab (qui est un anticorps monoclonal anti-CD20 ciblant les cellules B malignes) *in vivo* chez la souris⁴⁴³. L'utilisation de cette combinaison est donc possiblement à proscrire, ou à mieux étudier.

Un groupe a montré que dans les cancers du sein HER+, l'inhibition de SRC permettait d'inhiber la croissance de lignées cellulaires et de xénogreffes et que le mécanisme d'action impliquait p53. En effet, seule l'inhibition de SRC dans un contexte où p53 sauvage est présent permettait une régression des tumeurs. SRC semble permettre l'expression de MYC en inhibant p53⁴⁴⁴. Plusieurs cancers du sein HER+ conservent un p53 intact et les tumeurs avec une haute activité de SRC ont un mauvais pronostic. Bien que les essais cliniques avec les inhibiteurs de SRC dans le cancer du sein n'aient pas été très concluants, quelques patientes montraient une bonne réponse et les auteurs proposent que ce puissent être celles qui possèdent un p53 intact, bien que cela reste à vérifier⁴⁴⁴. Une autre étude a démontré que, dans les cancers du sein HER2+, l'activation de pSRC corrèle avec une surexpression de p53⁴⁴⁵. La co-expression de p53 et pSRC dans les néoplasmes thymiques représente également un mauvais pronostic de

survie globale⁴⁴⁶. Cela permet de montrer la pertinence du mécanisme que nous proposons, en plus de suggérer qu'il y a possiblement d'autres cancers où la phosphorylation de SOCS1 pourrait être pertinente.

En bref, il serait très intéressant de pouvoir tester la combinaison de chimiothérapie combinée à des inhibiteurs de SRC sur des patients atteints de DLBCL et de cancer du sein démontrant des niveaux élevés de pSRC/pSOCS1 et p53 positifs et donc de personnaliser le traitement pour ces patients. Étant donné les échecs de la monothérapie des inhibiteurs de SRC, il serait plus pertinent d'utiliser une combinaison que l'inhibiteur seul. Il serait aussi pertinent de vérifier les niveaux de pSOCS1 dans des échantillons de cancers du sein où l'expression de pSRC et p53 est élevée. Finalement, nos résultats ont été obtenus avec des échantillons de patients achetés commercialement et dont les données cliniques ne sont pas accessibles. Il n'a donc pas été possible d'effectuer des analyses selon le type précis de DLBCL ni selon le stade et la progression de la maladie. Nous avons regroupé tous les patients disponibles dans notre analyse. Ce type d'analyses est très important et il serait utile d'avoir accès à une cohorte de patients dont les données cliniques sont accessibles, ou au minimum de faire certains marquages sur les TMA que nous avons utilisés afin de préciser le type moléculaire GCB ou ACB de nos échantillons. Enfin, l'étude de SOCS1 dans des lignées de lymphome diffus à large cellule serait très importante. Des données préliminaires avaient été générées dans des SU-DHL4 où la surexpression de SOCS1 tuait les cellules, qui ne parvenaient pas à récupérer des infections rétrovirales, ne permettant pas de faire des études moléculaires. Il faudrait surexprimer SOCS1 dans diverses lignées de DLBCL afin d'étudier son effet dans celles-ci, possiblement en utilisant un système d'expression inductible.

4.3 Conclusion

Les résultats présentés dans cette thèse ont permis, dans un premier temps, de confirmer de façon non biaisée l'implication de SOCS1 dans la régulation de la voie de p53 et de caractériser les cibles transcriptionnelles de p53 qui sont régulées par SOCS1. Cela nous a permis de découvrir que SOCS1 contrôlait des gènes impliqués dans la mort cellulaire programmée nommée ferroptose. Nous avons par la suite pu confirmer que SOCS1 pouvait même sensibiliser les cellules à l'induction de ferroptose. Ce résultat est particulièrement

intéressant car bien que SOCS1 soit généralement considéré comme un suppresseur tumoral, les mécanismes par lesquels il accomplit ce rôle ne sont pas bien définis. De plus, cette mort cellulaire semble être l'un des mécanismes par lesquels p53 agit en tant que suppresseur tumoral, alors que la sénescence et l'apoptose ont été écartés des mécanismes qui permettent à p53 d'accomplir cette fonction. Nous avons également observé que SOCS1 est en mesure de contrôler l'un des gènes importants pour la ferroptose même en l'absence de p53. Peu de choses sont encore connues au sujet de la ferroptose, ce qui ouvre la porte à bien des découvertes, et à l'approfondissement du rôle de SOCS1 dans ce mécanisme.

Cette thèse a ensuite permis de découvrir un nouveau mécanisme de régulation de SOCS1 et de son interaction avec p53. En effet, nous avons découvert la tyrosine 80 de SOCS1 comme étant un site phosphorylé de façon directe par deux membres de la famille SFK, soit SRC et YES. Nous avons aussi découvert que SOCS1 peut dimériser et que cette dimérisation semble être causée par la forme phosphorylée de la protéine. Enfin, nous avons montré que la phosphorylation de SOCS1 affecte ses fonctions de suppresseur tumoral.

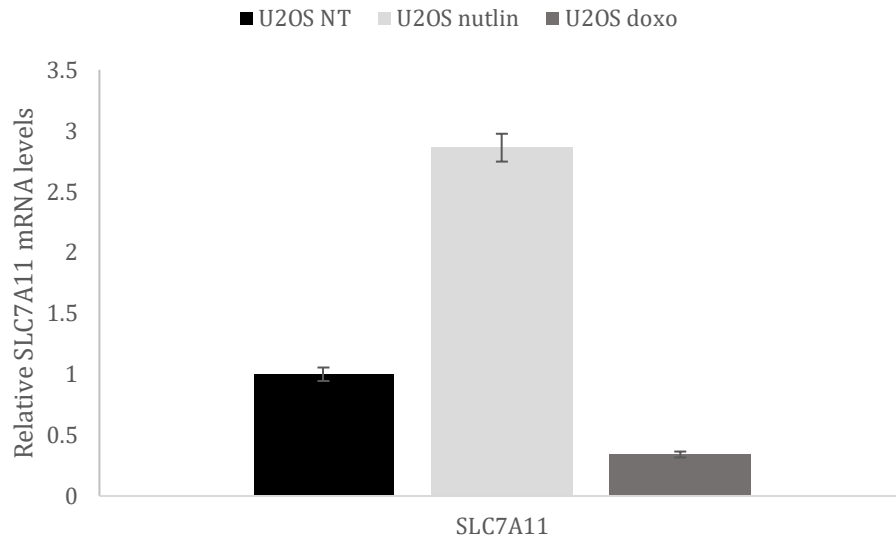
Il sera intéressant et important d'évaluer si la phosphorylation de la tyrosine 80 de SOCS1 affecte ses rôles d'induction de ferroptose. Les mutants Y80D et Y80F seraient des bons outils afin de regarder la sensibilité des cellules à l'induction de cette mort cellulaire. Enfin, il serait intéressant de faire une expérience de séquençage d'ARN dans des cellules surexprimant SOCS1 sauvage, SOCS1 Y80D ou SOCS1 Y80F afin de voir si les cibles transcriptionnelles de p53, ou encore d'autres facteurs de transcription, sont affectées. Un modèle pertinent à développer pour toutes ces études serait une lignée cellulaire où le gène de SOCS1 est muté en Y80 par CRISPR-Cas9.

Ce travail ouvre la porte à de nombreux futurs projets de recherche car il découvre une nouvelle biologie de SOCS1, mais probablement de toute la famille SOCS, puisque celle-ci possède le motif de la tyrosine et du tryptophane conservés. Tous les membres de la famille pourraient donc être sujets à la phosphorylation régulatrice et à la dimérisation. Finalement, l'interaction de SOCS1 avec d'autres facteurs de transcription et leurs fonctions pourront aussi être investiguées. Par exemple, SOCS1 semble pouvoir interagir avec p73 et p63, deux autres membres de la famille p53. Il serait bien de déterminer quelles cibles transcriptionnelles de ces deux facteurs de transcription sont régulées par SOCS1.

Sur un plan plus appliqué, la dérégulation de la phosphorylation de SOCS1 dans les lymphomes montre une pertinence physiologique pour cette régulation. Elle offre aussi de nouvelles possibilités de sélection de patients qui risquent de répondre à des inhibiteurs des SFK. L'existence d'autres cancers, comme certains cancers du sein qui ont des caractéristiques moléculaires similaires, pourrait fournir d'autres modèles pertinents pour l'évaluation de la phosphorylation de SOCS1 et pour le traitement avec des inhibiteurs de SFK.

Annexe

A



B

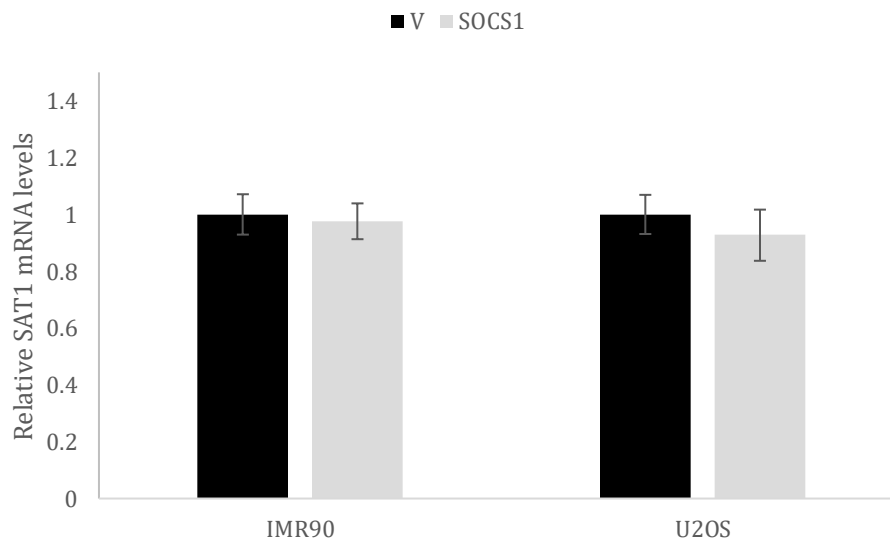


Figure A1. Niveaux d'ARN messager de SL7A11 et SAT1 en réponse à l'activation de p53 ou de SOCS1, respectivement.

A. La doxorubicine inhibe l'expression de *SLC7A11* alors que la nutline3a l'augmente. Les cellules U2OS ont été traitées avec deux drogues activatrices de p53, soit la nutline3a ou la doxorubicine, ou non traité. Les niveaux d'ARN messager de *SL7A11* ont été mesurés par

qPCR. **B.** SOCS1 ne régule pas l'expression de *SATI*. Les cellules U2OS et IMR90 ont été infectées avec un vecteur vide (V) ou exprimant SOCS1. Les cellules ont été récoltées 7 jours après l'infection et les niveaux d'ARN messager de *SATI* ont été mesurés par qPCR dans les deux lignées.

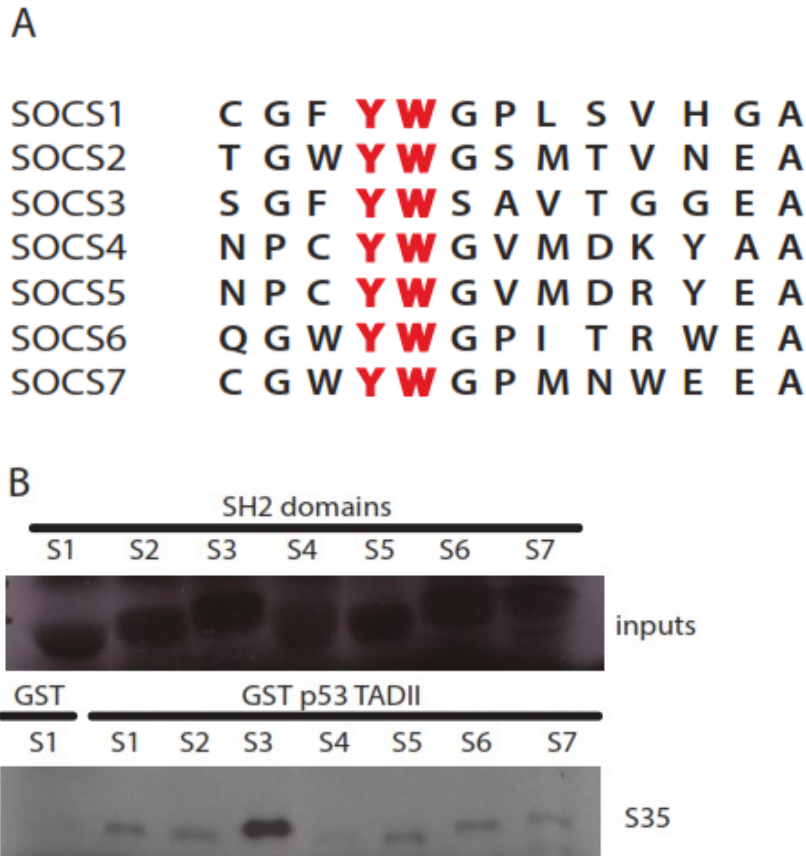


Figure A2. Tous les membres de la famille SOCS interagissent avec p53.

A. Alignement de séquence des membres de la famille SOCS montrant le motif de SOCS1 contenant la tyrosine 80 phosphorylée. Ce motif est conservé dans toute la famille. **B.** Les domaines SH2 des SOCS interagissent tous avec p53. GST pull-down effectué avec le TADII de p53 purifié par GST puis incubé avec les domaines SH2 des divers SOCS produits par transcription/traduction *in vitro* et incorporation de méthionine ³⁵S. Les deux protéines ont ensuite été incubées ensemble et l'interaction évaluée par autoradiographie du gel SDS-PAGE.

Bibliographie

- 1 Hahn, W. C. & Weinberg, R. A. Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med* **347**, 1593-1603, doi:10.1056/NEJMra021902 (2002).
- 2 Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013 (2011).
- 3 Lowe, S. W., Cepero, E. & Evan, G. Intrinsic tumour suppression. *Nature* **432**, 307-315, doi:10.1038/nature03098 (2004).
- 4 Hayflick, L. & Moorhead, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* **25**, 585-621 (1961).
- 5 Hayflick, L. The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res* **37**, 614-636 (1965).
- 6 He, S. & Sharpless, N. E. Senescence in Health and Disease. *Cell* **169**, 1000-1011, doi:10.1016/j.cell.2017.05.015 (2017).
- 7 Campisi, J. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol* **75**, 685-705, doi:10.1146/annurev-physiol-030212-183653 (2013).
- 8 Dimri, G. P. *et al.* A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 9363-9367 (1995).
- 9 Kurz, D. J., Decary, S., Hong, Y. & Erusalimsky, J. D. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci* **113 (Pt 20)**, 3613-3622 (2000).
- 10 Itahana, K., Dimri, G. & Campisi, J. Regulation of cellular senescence by p53. *Eur J Biochem* **268**, 2784-2791 (2001).
- 11 Collins, C. J. & Sedivy, J. M. Involvement of the INK4a/Arf gene locus in senescence. *Aging Cell* **2**, 145-150 (2003).
- 12 Ohtani, N., Yamakoshi, K., Takahashi, A. & Hara, E. The p16INK4a-RB pathway: molecular link between cellular senescence and tumor suppression. *J Med Invest* **51**, 146-153 (2004).
- 13 Krishnamurthy, J. *et al.* Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J Clin Invest* **114**, 1299-1307, doi:10.1172/JCI22475 (2004).
- 14 Liu, Y. *et al.* Expression of p16(INK4a) in peripheral blood T-cells is a biomarker of human aging. *Aging Cell* **8**, 439-448, doi:10.1111/j.1474-9726.2009.00489.x (2009).
- 15 Campisi, J. & d'Adda di Fagagna, F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 729-740, doi:10.1038/nrm2233 (2007).
- 16 Vernier, M. *et al.* Regulation of E2Fs and senescence by PML nuclear bodies. *Genes Dev* **25**, 41-50, doi:10.1101/gad.1975111 (2011).
- 17 Zuckerman, V., Wolynec, K., Sionov, R. V., Haupt, S. & Haupt, Y. Tumour suppression by p53: the importance of apoptosis and cellular senescence. *J Pathol* **219**, 3-15, doi:10.1002/path.2584 (2009).
- 18 Jin, S. *et al.* The GADD45 inhibition of Cdc2 kinase correlates with GADD45-mediated growth suppression. *J Biol Chem* **275**, 16602-16608, doi:10.1074/jbc.M000284200 (2000).

- 19 Zhan, Q. *et al.* Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45. *Oncogene* **18**, 2892-2900, doi:10.1038/sj.onc.1202667 (1999).
- 20 Chan, T. A., Hermeking, H., Lengauer, C., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. 14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature* **401**, 616-620, doi:10.1038/44188 (1999).
- 21 Peng, C. Y. *et al.* Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science* **277**, 1501-1505 (1997).
- 22 de Stanchina, E. *et al.* PML is a direct p53 target that modulates p53 effector functions. *Mol Cell* **13**, 523-535 (2004).
- 23 Shetty, S. *et al.* Regulation of plasminogen activator inhibitor-1 expression by tumor suppressor protein p53. *J Biol Chem* **283**, 19570-19580, doi:10.1074/jbc.M710268200 (2008).
- 24 Burton, D. G. & Krizhanovsky, V. Physiological and pathological consequences of cellular senescence. *Cell Mol Life Sci* **71**, 4373-4386, doi:10.1007/s00018-014-1691-3 (2014).
- 25 Rodier, F. *et al.* DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion. *J Cell Sci* **124**, 68-81, doi:10.1242/jcs.071340 (2011).
- 26 Narita, M. *et al.* Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* **113**, 703-716 (2003).
- 27 Kosar, M. *et al.* Senescence-associated heterochromatin foci are dispensable for cellular senescence, occur in a cell type- and insult-dependent manner and follow expression of p16(ink4a). *Cell Cycle* **10**, 457-468, doi:10.4161/cc.10.3.14707 (2011).
- 28 Freund, A., Laberge, R. M., Demaria, M. & Campisi, J. Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker. *Mol Biol Cell* **23**, 2066-2075, doi:10.1091/mbc.E11-10-0884 (2012).
- 29 Shimi, T. *et al.* The role of nuclear lamin B1 in cell proliferation and senescence. *Genes Dev* **25**, 2579-2593, doi:10.1101/gad.179515.111 (2011).
- 30 Deschenes-Simard, X. *et al.* Tumor suppressor activity of the ERK/MAPK pathway by promoting selective protein degradation. *Genes Dev* **27**, 900-915, doi:10.1101/gad.203984.112 (2013).
- 31 Coppe, J. P. *et al.* Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol* **6**, 2853-2868, doi:10.1371/journal.pbio.0060301 (2008).
- 32 Coppe, J. P., Desprez, P. Y., Krtolica, A. & Campisi, J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol* **5**, 99-118, doi:10.1146/annurev-pathol-121808-102144 (2010).
- 33 Coppe, J. P. *et al.* A human-like senescence-associated secretory phenotype is conserved in mouse cells dependent on physiological oxygen. *PLoS One* **5**, e9188, doi:10.1371/journal.pone.0009188 (2010).
- 34 Yang, G. *et al.* The chemokine growth-regulated oncogene 1 (Gro-1) links RAS signaling to the senescence of stromal fibroblasts and ovarian tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 16472-16477, doi:10.1073/pnas.0605752103 (2006).

- 35 Bavik, C. *et al.* The gene expression program of prostate fibroblast senescence modulates neoplastic epithelial cell proliferation through paracrine mechanisms. *Cancer Res* **66**, 794-802, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1716 (2006).
- 36 Coppe, J. P., Kauser, K., Campisi, J. & Beausejour, C. M. Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *J Biol Chem* **281**, 29568-29574, doi:10.1074/jbc.M603307200 (2006).
- 37 Kang, T. W. *et al.* Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature* **479**, 547-551, doi:10.1038/nature10599 (2011).
- 38 Xue, W. *et al.* Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* **445**, 656-660, doi:10.1038/nature05529 (2007).
- 39 Chien, Y. *et al.* Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF-kappaB promotes senescence and enhances chemosensitivity. *Genes Dev* **25**, 2125-2136, doi:10.1101/gad.17276711 (2011).
- 40 Demaria, M. *et al.* An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev Cell* **31**, 722-733, doi:10.1016/j.devcel.2014.11.012 (2014).
- 41 Jun, J. I. & Lau, L. F. The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing. *Nat Cell Biol* **12**, 676-685, doi:10.1038/ncb2070 (2010).
- 42 Baker, D. J. *et al.* Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature* **530**, 184-189, doi:10.1038/nature16932 (2016).
- 43 Munoz-Espin, D. *et al.* Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell* **155**, 1104-1118, doi:10.1016/j.cell.2013.10.019 (2013).
- 44 Storer, M. *et al.* Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell* **155**, 1119-1130, doi:10.1016/j.cell.2013.10.041 (2013).
- 45 Coppe, J. P. *et al.* Tumor suppressor and aging biomarker p16(INK4a) induces cellular senescence without the associated inflammatory secretory phenotype. *J Biol Chem* **286**, 36396-36403, doi:10.1074/jbc.M111.257071 (2011).
- 46 Rodier, F. *et al.* Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol* **11**, 973-979, doi:10.1038/ncb1909 (2009).
- 47 Takahashi, A. *et al.* Downregulation of cytoplasmic DNases is implicated in cytoplasmic DNA accumulation and SASP in senescent cells. *Nat Commun* **9**, 1249, doi:10.1038/s41467-018-03555-8 (2018).
- 48 Gluck, S. *et al.* Innate immune sensing of cytosolic chromatin fragments through cGAS promotes senescence. *Nat Cell Biol* **19**, 1061-1070, doi:10.1038/ncb3586 (2017).
- 49 Freund, A., Patil, C. K. & Campisi, J. p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. *EMBO J* **30**, 1536-1548, doi:10.1038/emboj.2011.69 (2011).
- 50 Pazolli, E. *et al.* Chromatin remodeling underlies the senescence-associated secretory phenotype of tumor stromal fibroblasts that supports cancer progression. *Cancer Res* **72**, 2251-2261, doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3386 (2012).
- 51 Acosta, J. C. *et al.* Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell* **133**, 1006-1018, doi:10.1016/j.cell.2008.03.038 (2008).

- 52 Kuilman, T. *et al.* Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell* **133**, 1019-1031, doi:10.1016/j.cell.2008.03.039 (2008).
- 53 Di Mitri, D. & Alimonti, A. Non-Cell-Autonomous Regulation of Cellular Senescence in Cancer. *Trends Cell Biol* **26**, 215-226, doi:10.1016/j.tcb.2015.10.005 (2016).
- 54 Baker, D. J. *et al.* Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* **479**, 232-236, doi:10.1038/nature10600 (2011).
- 55 Chang, J. *et al.* Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nat Med* **22**, 78-83, doi:10.1038/nm.4010 (2016).
- 56 Kirkland, J. L., Tchkonja, T., Zhu, Y., Niedernhofer, L. J. & Robbins, P. D. The Clinical Potential of Senolytic Drugs. *J Am Geriatr Soc* **65**, 2297-2301, doi:10.1111/jgs.14969 (2017).
- 57 Lane, D. P. & Crawford, L. V. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* **278**, 261-263 (1979).
- 58 Linzer, D. I. & Levine, A. J. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* **17**, 43-52 (1979).
- 59 Eliyahu, D., Raz, A., Gruss, P., Givol, D. & Oren, M. Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells. *Nature* **312**, 646-649 (1984).
- 60 Jenkins, J. R., Rudge, K. & Currie, G. A. Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation-associated phosphoprotein p53. *Nature* **312**, 651-654 (1984).
- 61 Parada, L. F., Land, H., Weinberg, R. A., Wolf, D. & Rotter, V. Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and ras in cellular transformation. *Nature* **312**, 649-651 (1984).
- 62 Eliyahu, D. *et al.* Meth A fibrosarcoma cells express two transforming mutant p53 species. *Oncogene* **3**, 313-321 (1988).
- 63 Finlay, C. A. *et al.* Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life. *Mol Cell Biol* **8**, 531-539 (1988).
- 64 Halevy, O., Rodel, J., Peled, A. & Oren, M. Frequent p53 mutations in chemically induced murine fibrosarcoma. *Oncogene* **6**, 1593-1600 (1991).
- 65 Eliyahu, D., Michalovitz, D., Eliyahu, S., Pinhasi-Kimhi, O. & Oren, M. Wild-type p53 can inhibit oncogene-mediated focus formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 8763-8767 (1989).
- 66 Finlay, C. A., Hinds, P. W. & Levine, A. J. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* **57**, 1083-1093 (1989).
- 67 Baker, S. J. *et al.* Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* **244**, 217-221 (1989).
- 68 Malkin, D. *et al.* Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* **250**, 1233-1238 (1990).
- 69 Srivastava, S., Zou, Z. Q., Pirolo, K., Blattner, W. & Chang, E. H. Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome. *Nature* **348**, 747-749, doi:10.1038/348747a0 (1990).

- 70 Donehower, L. A. *et al.* Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* **356**, 215-221, doi:10.1038/356215a0 (1992).
- 71 Pietenpol, J. A. *et al.* Sequence-specific transcriptional activation is essential for growth suppression by p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 1998-2002 (1994).
- 72 Ko, L. J. & Prives, C. p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev* **10**, 1054-1072 (1996).
- 73 Unger, T., Nau, M. M., Segal, S. & Minna, J. D. p53: a transdominant regulator of transcription whose function is ablated by mutations occurring in human cancer. *EMBO J* **11**, 1383-1390 (1992).
- 74 Zhu, J., Zhou, W., Jiang, J. & Chen, X. Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for mediating apoptosis. *J Biol Chem* **273**, 13030-13036 (1998).
- 75 Candau, R. *et al.* Two tandem and independent sub-activation domains in the amino terminus of p53 require the adaptor complex for activity. *Oncogene* **15**, 807-816, doi:10.1038/sj.onc.1201244 (1997).
- 76 Chang, J., Kim, D. H., Lee, S. W., Choi, K. Y. & Sung, Y. C. Transactivation ability of p53 transcriptional activation domain is directly related to the binding affinity to TATA-binding protein. *J Biol Chem* **270**, 25014-25019 (1995).
- 77 Raj, N. & Attardi, L. D. The Transactivation Domains of the p53 Protein. *Cold Spring Harb Perspect Med* **7**, doi:10.1101/cshperspect.a026047 (2017).
- 78 Piskacek, M., Havelka, M., Rezacova, M. & Knight, A. The 9aaTAD Transactivation Domains: From Gal4 to p53. *PLoS One* **11**, e0162842, doi:10.1371/journal.pone.0162842 (2016).
- 79 Kaustov, L. *et al.* p53 transcriptional activation domain: a molecular chameleon? *Cell Cycle* **5**, 489-494, doi:10.4161/cc.5.5.2489 (2006).
- 80 Chao, C. *et al.* p53 transcriptional activity is essential for p53-dependent apoptosis following DNA damage. *EMBO J* **19**, 4967-4975, doi:10.1093/emboj/19.18.4967 (2000).
- 81 Attardi, L. D., Lowe, S. W., Brugarolas, J. & Jacks, T. Transcriptional activation by p53, but not induction of the p21 gene, is essential for oncogene-mediated apoptosis. *EMBO J* **15**, 3693-3701 (1996).
- 82 Sabbatini, P., Lin, J., Levine, A. J. & White, E. Essential role for p53-mediated transcription in E1A-induced apoptosis. *Genes Dev* **9**, 2184-2192 (1995).
- 83 Zhu, J., Zhang, S., Jiang, J. & Chen, X. Definition of the p53 functional domains necessary for inducing apoptosis. *J Biol Chem* **275**, 39927-39934, doi:10.1074/jbc.M005676200 (2000).
- 84 Venot, C., Maratrat, M., Sierra, V., Conseiller, E. & Debussche, L. Definition of a p53 transactivation function-deficient mutant and characterization of two independent p53 transactivation subdomains. *Oncogene* **18**, 2405-2410 (1999).
- 85 Brady, C. A. *et al.* Distinct p53 transcriptional programs dictate acute DNA-damage responses and tumor suppression. *Cell* **145**, 571-583, doi:10.1016/j.cell.2011.03.035 (2011).
- 86 Johnson, T. M., Hammond, E. M., Giaccia, A. & Attardi, L. D. The p53QS transactivation-deficient mutant shows stress-specific apoptotic activity and induces embryonic lethality. *Nat Genet* **37**, 145-152, doi:10.1038/ng1498 (2005).

- 87 Jiang, D. *et al.* Full p53 transcriptional activation potential is dispensable for tumor suppression in diverse lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 17123-17128, doi:10.1073/pnas.1111245108 (2011).
- 88 Momand, J., Zambetti, G. P., Olson, D. C., George, D. & Levine, A. J. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* **69**, 1237-1245 (1992).
- 89 Oliner, J. D., Kinzler, K. W., Meltzer, P. S., George, D. L. & Vogelstein, B. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* **358**, 80-83, doi:10.1038/358080a0 (1992).
- 90 Thut, C. J., Chen, J. L., Klemm, R. & Tjian, R. p53 transcriptional activation mediated by coactivators TAFII40 and TAFII60. *Science* **267**, 100-104 (1995).
- 91 Lu, H. & Levine, A. J. Human TAFII31 protein is a transcriptional coactivator of the p53 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 5154-5158 (1995).
- 92 Di Lello, P. *et al.* Structure of the Tfb1/p53 complex: Insights into the interaction between the p62/Tfb1 subunit of TFIIH and the activation domain of p53. *Mol Cell* **22**, 731-740, doi:10.1016/j.molcel.2006.05.007 (2006).
- 93 Gamper, A. M. & Roeder, R. G. Multivalent binding of p53 to the STAGA complex mediates coactivator recruitment after UV damage. *Mol Cell Biol* **28**, 2517-2527, doi:10.1128/MCB.01461-07 (2008).
- 94 Li, M., Luo, J., Brooks, C. L. & Gu, W. Acetylation of p53 inhibits its ubiquitination by Mdm2. *J Biol Chem* **277**, 50607-50611, doi:10.1074/jbc.C200578200 (2002).
- 95 Rodriguez, M. S., Desterro, J. M., Lain, S., Lane, D. P. & Hay, R. T. Multiple C-terminal lysine residues target p53 for ubiquitin-proteasome-mediated degradation. *Mol Cell Biol* **20**, 8458-8467 (2000).
- 96 Bargonetti, J., Manfredi, J. J., Chen, X., Marshak, D. R. & Prives, C. A proteolytic fragment from the central region of p53 has marked sequence-specific DNA-binding activity when generated from wild-type but not from oncogenic mutant p53 protein. *Genes Dev* **7**, 2565-2574 (1993).
- 97 Pavletich, N. P., Chambers, K. A. & Pabo, C. O. The DNA-binding domain of p53 contains the four conserved regions and the major mutation hot spots. *Genes Dev* **7**, 2556-2564 (1993).
- 98 Wang, Y. *et al.* p53 domains: identification and characterization of two autonomous DNA-binding regions. *Genes Dev* **7**, 2575-2586 (1993).
- 99 Hollstein, M. *et al.* Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res* **22**, 3551-3555 (1994).
- 100 Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P. D. & Pavletich, N. P. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* **265**, 346-355 (1994).
- 101 Riley, T., Sontag, E., Chen, P. & Levine, A. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 402-412, doi:10.1038/nrm2395 (2008).
- 102 Lee, W. *et al.* Solution structure of the tetrameric minimum transforming domain of p53. *Nat Struct Biol* **1**, 877-890 (1994).
- 103 Jeffrey, P. D., Gorina, S. & Pavletich, N. P. Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms. *Science* **267**, 1498-1502 (1995).

- 104 Walker, K. K. & Levine, A. J. Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 15335-15340 (1996).
- 105 Yu, H. *et al.* Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains. *Cell* **76**, 933-945 (1994).
- 106 Kusano, K., Kagawa, N., Sakaguchi, M., Omura, T. & Waterman, M. R. Importance of a proline-rich sequence in the amino-terminal region for correct folding of mitochondrial and soluble microbial p450s. *J Biochem* **129**, 271-277 (2001).
- 107 Lee, S., Elenbaas, B., Levine, A. & Griffith, J. p53 and its 14 kDa C-terminal domain recognize primary DNA damage in the form of insertion/deletion mismatches. *Cell* **81**, 1013-1020 (1995).
- 108 Hupp, T. R., Sparks, A. & Lane, D. P. Small peptides activate the latent sequence-specific DNA binding function of p53. *Cell* **83**, 237-245 (1995).
- 109 Jayaraman, J. & Prives, C. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by short single strands of DNA requires the p53 C-terminus. *Cell* **81**, 1021-1029 (1995).
- 110 Levine, A. J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **88**, 323-331 (1997).
- 111 Meek, D. W. & Anderson, C. W. Posttranslational modification of p53: cooperative integrators of function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**, a000950, doi:10.1101/cshperspect.a000950 (2009).
- 112 Vogelstein, B., Lane, D. & Levine, A. J. Surfing the p53 network. *Nature* **408**, 307-310, doi:10.1038/35042675 (2000).
- 113 Mallette, F. A., Gaumont-Leclerc, M. F. & Ferbeyre, G. The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence. *Genes Dev* **21**, 43-48, doi:10.1101/gad.1487307 (2007).
- 114 Dumaz, N. & Meek, D. W. Serine15 phosphorylation stimulates p53 transactivation but does not directly influence interaction with HDM2. *EMBO J* **18**, 7002-7010, doi:10.1093/emboj/18.24.7002 (1999).
- 115 Chehab, N. H., Malikzay, A., Stavridi, E. S. & Halazonetis, T. D. Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13777-13782 (1999).
- 116 Unger, T. *et al.* Critical role for Ser20 of human p53 in the negative regulation of p53 by Mdm2. *EMBO J* **18**, 1805-1814, doi:10.1093/emboj/18.7.1805 (1999).
- 117 Hirao, A. *et al.* DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science* **287**, 1824-1827 (2000).
- 118 Shieh, S. Y., Ahn, J., Tamai, K., Taya, Y. & Prives, C. The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev* **14**, 289-300 (2000).
- 119 Khosravi, R. *et al.* Rapid ATM-dependent phosphorylation of MDM2 precedes p53 accumulation in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14973-14977 (1999).
- 120 Taira, N., Nihira, K., Yamaguchi, T., Miki, Y. & Yoshida, K. DYRK2 is targeted to the nucleus and controls p53 via Ser46 phosphorylation in the apoptotic response to DNA damage. *Mol Cell* **25**, 725-738, doi:10.1016/j.molcel.2007.02.007 (2007).

- 121 Waterman, M. J., Stavridi, E. S., Waterman, J. L. & Halazonetis, T. D. ATM-dependent activation of p53 involves dephosphorylation and association with 14-3-3 proteins. *Nat Genet* **19**, 175-178, doi:10.1038/542 (1998).
- 122 Sakaguchi, K. *et al.* DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev* **12**, 2831-2841 (1998).
- 123 Caspari, T. How to activate p53. *Curr Biol* **10**, R315-317 (2000).
- 124 Espinosa, J. M. & Emerson, B. M. Transcriptional regulation by p53 through intrinsic DNA/chromatin binding and site-directed cofactor recruitment. *Mol Cell* **8**, 57-69 (2001).
- 125 Kaeser, M. D. & Iggo, R. D. Chromatin immunoprecipitation analysis fails to support the latency model for regulation of p53 DNA binding activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci US A* **99**, 95-100, doi:10.1073/pnas.012283399 (2002).
- 126 McKinney, K. & Prives, C. Efficient specific DNA binding by p53 requires both its central and C-terminal domains as revealed by studies with high-mobility group 1 protein. *Mol Cell Biol* **22**, 6797-6808 (2002).
- 127 Kim, H. *et al.* p53 requires an intact C-terminal domain for DNA binding and transactivation. *J Mol Biol* **415**, 843-854, doi:10.1016/j.jmb.2011.12.001 (2012).
- 128 Sullivan, K. D., Galbraith, M. D., Andrysiak, Z. & Espinosa, J. M. Mechanisms of transcriptional regulation by p53. *Cell Death Differ* **25**, 133-143, doi:10.1038/cdd.2017.174 (2018).
- 129 Dai, C. & Gu, W. p53 post-translational modification: deregulated in tumorigenesis. *Trends Mol Med* **16**, 528-536, doi:10.1016/j.molmed.2010.09.002 (2010).
- 130 Kasthuber, E. R. & Lowe, S. W. Putting p53 in Context. *Cell* **170**, 1062-1078, doi:10.1016/j.cell.2017.08.028 (2017).
- 131 Fischer, M. Census and evaluation of p53 target genes. *Oncogene* **36**, 3943-3956, doi:10.1038/onc.2016.502 (2017).
- 132 Allen, M. A. *et al.* Global analysis of p53-regulated transcription identifies its direct targets and unexpected regulatory mechanisms. *eLife* **3**, e02200, doi:10.7554/eLife.02200 (2014).
- 133 Verfaillie, A. *et al.* Multiplex enhancer-reporter assays uncover unsophisticated TP53 enhancer logic. *Genome Res* **26**, 882-895, doi:10.1101/gr.204149.116 (2016).
- 134 Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K. & Elledge, S. J. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**, 805-816 (1993).
- 135 el-Deiry, W. S. *et al.* WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75**, 817-825 (1993).
- 136 Benson, E. K. *et al.* p53-dependent gene repression through p21 is mediated by recruitment of E2F4 repression complexes. *Oncogene* **33**, 3959-3969, doi:10.1038/onc.2013.378 (2014).
- 137 Carvajal, L. A., Hamard, P. J., Tonnessen, C. & Manfredi, J. J. E2F7, a novel target, is up-regulated by p53 and mediates DNA damage-dependent transcriptional repression. *Genes Dev* **26**, 1533-1545, doi:10.1101/gad.184911.111 (2012).
- 138 Li, T. *et al.* Tumor suppression in the absence of p53-mediated cell-cycle arrest, apoptosis, and senescence. *Cell* **149**, 1269-1283, doi:10.1016/j.cell.2012.04.026 (2012).

- 139 Mello, S. S. & Attardi, L. D. Deciphering p53 signaling in tumor suppression. *Curr Opin Cell Biol* **51**, 65-72, doi:10.1016/j.ceb.2017.11.005 (2017).
- 140 Chen, X., Ko, L. J., Jayaraman, L. & Prives, C. p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells. *Genes Dev* **10**, 2438-2451 (1996).
- 141 Zhao, R. *et al.* Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays. *Genes Dev* **14**, 981-993 (2000).
- 142 Ward, P. S. & Thompson, C. B. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer Cell* **21**, 297-308, doi:10.1016/j.ccr.2012.02.014 (2012).
- 143 Kruiswijk, F., Labuschagne, C. F. & Vousden, K. H. p53 in survival, death and metabolic health: a lifeguard with a licence to kill. *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**, 393-405, doi:10.1038/nrm4007 (2015).
- 144 Jiang, L. *et al.* Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression. *Nature* **520**, 57-62, doi:10.1038/nature14344 (2015).
- 145 Wang, S. J. *et al.* Acetylation Is Crucial for p53-Mediated Ferroptosis and Tumor Suppression. *Cell Rep* **17**, 366-373, doi:10.1016/j.celrep.2016.09.022 (2016).
- 146 Jennis, M. *et al.* An African-specific polymorphism in the TP53 gene impairs p53 tumor suppressor function in a mouse model. *Genes Dev* **30**, 918-930, doi:10.1101/gad.275891.115 (2016).
- 147 Friedmann-Morvinski, D. *et al.* Dedifferentiation of neurons and astrocytes by oncogenes can induce gliomas in mice. *Science* **338**, 1080-1084, doi:10.1126/science.1226929 (2012).
- 148 Tosoni, D. *et al.* The Numb/p53 circuitry couples replicative self-renewal and tumor suppression in mammary epithelial cells. *J Cell Biol* **211**, 845-862, doi:10.1083/jcb.201505037 (2015).
- 149 Tschaharganeh, D. F. *et al.* p53-dependent Nestin regulation links tumor suppression to cellular plasticity in liver cancer. *Cell* **158**, 579-592, doi:10.1016/j.cell.2014.05.051 (2014).
- 150 Zhao, Z. *et al.* p53 loss promotes acute myeloid leukemia by enabling aberrant self-renewal. *Genes Dev* **24**, 1389-1402, doi:10.1101/gad.1940710 (2010).
- 151 McConnell, A. M. *et al.* p53 Regulates Progenitor Cell Quiescence and Differentiation in the Airway. *Cell Rep* **17**, 2173-2182, doi:10.1016/j.celrep.2016.11.007 (2016).
- 152 Mizuno, H., Spike, B. T., Wahl, G. M. & Levine, A. J. Inactivation of p53 in breast cancers correlates with stem cell transcriptional signatures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 22745-22750, doi:10.1073/pnas.1017001108 (2010).
- 153 Olivos, D. J. & Mayo, L. D. Emerging Non-Canonical Functions and Regulation by p53: p53 and Stemness. *Int J Mol Sci* **17**, doi:10.3390/ijms17121982 (2016).
- 154 Sengupta, S. & Harris, C. C. p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 44-55, doi:10.1038/nrm1546 (2005).
- 155 Ciriello, G. *et al.* Emerging landscape of oncogenic signatures across human cancers. *Nat Genet* **45**, 1127-1133, doi:10.1038/ng.2762 (2013).
- 156 Klusmann, I. *et al.* p53 Activity Results in DNA Replication Fork Processivity. *Cell Rep* **17**, 1845-1857, doi:10.1016/j.celrep.2016.10.036 (2016).

- 157 Yeo, C. Q. *et al.* p53 Maintains Genomic Stability by Preventing Interference between Transcription and Replication. *Cell Rep* **15**, 132-146, doi:10.1016/j.celrep.2016.03.011 (2016).
- 158 Wylie, A. *et al.* p53 genes function to restrain mobile elements. *Genes Dev* **30**, 64-77, doi:10.1101/gad.266098.115 (2016).
- 159 Chang, N. T., Yang, W. K., Huang, H. C., Yeh, K. W. & Wu, C. W. The transcriptional activity of HERV-I LTR is negatively regulated by its cis-elements and wild type p53 tumor suppressor protein. *J Biomed Sci* **14**, 211-222, doi:10.1007/s11373-006-9126-2 (2007).
- 160 Leonova, K. I. *et al.* p53 cooperates with DNA methylation and a suicidal interferon response to maintain epigenetic silencing of repeats and noncoding RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, E89-98, doi:10.1073/pnas.1216922110 (2013).
- 161 Sullivan, K. D., Palaniappan, V. V. & Espinosa, J. M. ATM regulates cell fate choice upon p53 activation by modulating mitochondrial turnover and ROS levels. *Cell Cycle* **14**, 56-63, doi:10.4161/15384101.2014.973330 (2015).
- 162 Muller, P. A., Trinidad, A. G., Caswell, P. T., Norman, J. C. & Vousden, K. H. Mutant p53 regulates Dicer through p63-dependent and -independent mechanisms to promote an invasive phenotype. *J Biol Chem* **289**, 122-132, doi:10.1074/jbc.M113.502138 (2014).
- 163 Weissmueller, S. *et al.* Mutant p53 drives pancreatic cancer metastasis through cell-autonomous PDGF receptor beta signaling. *Cell* **157**, 382-394, doi:10.1016/j.cell.2014.01.066 (2014).
- 164 Aschauer, L. & Muller, P. A. Novel targets and interaction partners of mutant p53 Gain-Of-Function. *Biochem Soc Trans* **44**, 460-466, doi:10.1042/BST20150261 (2016).
- 165 Bykov, V. J. N., Eriksson, S. E., Bianchi, J. & Wiman, K. G. Targeting mutant p53 for efficient cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **18**, 89-102, doi:10.1038/nrc.2017.109 (2018).
- 166 Alexandrova, E. M. & Moll, U. M. Depleting stabilized GOF mutant p53 proteins by inhibiting molecular folding chaperones: a new promise in cancer therapy. *Cell Death Differ* **24**, 3-5, doi:10.1038/cdd.2016.145 (2017).
- 167 Vassilev, L. T. *et al.* In Vivo Activation of the p53 Pathway by Small-Molecule Antagonists of MDM2. *Science*, doi:10.1126/science.1092472 (2004).
- 168 Cheok, C. F. & Lane, D. P. Exploiting the p53 Pathway for Therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med* **7**, doi:10.1101/cshperspect.a026310 (2017).
- 169 Sur, S. *et al.* A panel of isogenic human cancer cells suggests a therapeutic approach for cancers with inactivated p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 3964-3969, doi:10.1073/pnas.0813333106 (2009).
- 170 Xu, J. *et al.* Gain of function of mutant p53 by coaggregation with multiple tumor suppressors. *Nat Chem Biol* **7**, 285-295, doi:10.1038/nchembio.546 (2011).
- 171 Soragni, A. *et al.* A Designed Inhibitor of p53 Aggregation Rescues p53 Tumor Suppression in Ovarian Carcinomas. *Cancer Cell* **29**, 90-103, doi:10.1016/j.ccell.2015.12.002 (2016).
- 172 Foster, B. A., Coffey, H. A., Morin, M. J. & Rastinejad, F. Pharmacological rescue of mutant p53 conformation and function. *Science* **286**, 2507-2510 (1999).
- 173 Rippin, T. M. *et al.* Characterization of the p53-rescue drug CP-31398 in vitro and in living cells. *Oncogene* **21**, 2119-2129, doi:10.1038/sj.onc.1205362 (2002).

- 174 Madka, V. *et al.* p53-stabilizing agent CP-31398 prevents growth and invasion of urothelial cancer of the bladder in transgenic UPII-SV40T mice. *Neoplasia* **15**, 966-974 (2013).
- 175 Bykov, V. J. *et al.* Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-weight compound. *Nat Med* **8**, 282-288, doi:10.1038/nm0302-282 (2002).
- 176 Lambert, J. M. *et al.* PRIMA-1 reactivates mutant p53 by covalent binding to the core domain. *Cancer Cell* **15**, 376-388, doi:10.1016/j.ccr.2009.03.003 (2009).
- 177 Kravchenko, J. E. *et al.* Small-molecule RETRA suppresses mutant p53-bearing cancer cells through a p73-dependent salvage pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 6302-6307, doi:10.1073/pnas.0802091105 (2008).
- 178 Ferraiuolo, M., Di Agostino, S., Blandino, G. & Strano, S. Oncogenic Intra-p53 Family Member Interactions in Human Cancers. *Front Oncol* **6**, 77, doi:10.3389/fonc.2016.00077 (2016).
- 179 Alexandrova, E. M. *et al.* Improving survival by exploiting tumour dependence on stabilized mutant p53 for treatment. *Nature* **523**, 352-356, doi:10.1038/nature14430 (2015).
- 180 Kolb, J. P., Oguin, T. H., 3rd, Oberst, A. & Martinez, J. Programmed Cell Death and Inflammation: Winter Is Coming. *Trends Immunol* **38**, 705-718, doi:10.1016/j.it.2017.06.009 (2017).
- 181 Stockwell, B. R. *et al.* Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease. *Cell* **171**, 273-285, doi:10.1016/j.cell.2017.09.021 (2017).
- 182 Dolma, S., Lessnick, S. L., Hahn, W. C. & Stockwell, B. R. Identification of genotype-selective antitumor agents using synthetic lethal chemical screening in engineered human tumor cells. *Cancer Cell* **3**, 285-296 (2003).
- 183 Yang, W. S. & Stockwell, B. R. Synthetic lethal screening identifies compounds activating iron-dependent, nonapoptotic cell death in oncogenic-RAS-harboring cancer cells. *Chem Biol* **15**, 234-245, doi:10.1016/j.chembiol.2008.02.010 (2008).
- 184 Dixon, S. J. *et al.* Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* **149**, 1060-1072, doi:10.1016/j.cell.2012.03.042 (2012).
- 185 Bannai, S., Tsukeda, H. & Okumura, H. Effect of antioxidants on cultured human diploid fibroblasts exposed to cystine-free medium. *Biochem Biophys Res Commun* **74**, 1582-1588 (1977).
- 186 Angeli, J. P. F., Shah, R., Pratt, D. A. & Conrad, M. Ferroptosis Inhibition: Mechanisms and Opportunities. *Trends Pharmacol Sci* **38**, 489-498, doi:10.1016/j.tips.2017.02.005 (2017).
- 187 Hayano, M., Yang, W. S., Corn, C. K., Pagano, N. C. & Stockwell, B. R. Loss of cysteinyl-tRNA synthetase (CARS) induces the transsulfuration pathway and inhibits ferroptosis induced by cystine deprivation. *Cell Death Differ* **23**, 270-278, doi:10.1038/cdd.2015.93 (2016).
- 188 Gao, M., Monian, P., Quadri, N., Ramasamy, R. & Jiang, X. Glutaminolysis and Transferrin Regulate Ferroptosis. *Mol Cell* **59**, 298-308, doi:10.1016/j.molcel.2015.06.011 (2015).
- 189 Yang, C. *et al.* Glutamine oxidation maintains the TCA cycle and cell survival during impaired mitochondrial pyruvate transport. *Mol Cell* **56**, 414-424, doi:10.1016/j.molcel.2014.09.025 (2014).

- 190 Yang, W. S. & Stockwell, B. R. Ferroptosis: Death by Lipid Peroxidation. *Trends Cell Biol* **26**, 165-176, doi:10.1016/j.tcb.2015.10.014 (2016).
- 191 Kagan, V. E. *et al.* Oxidized arachidonic and adrenic PEs navigate cells to ferroptosis. *Nat Chem Biol* **13**, 81-90, doi:10.1038/nchembio.2238 (2017).
- 192 Doll, S. *et al.* ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition. *Nat Chem Biol* **13**, 91-98, doi:10.1038/nchembio.2239 (2017).
- 193 Kuhn, H., Banthiya, S. & van Leyen, K. Mammalian lipoxygenases and their biological relevance. *Biochim Biophys Acta* **1851**, 308-330, doi:10.1016/j.bbali.2014.10.002 (2015).
- 194 Gaschler, M. M. & Stockwell, B. R. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem Biophys Res Commun* **482**, 419-425, doi:10.1016/j.bbrc.2016.10.086 (2017).
- 195 Shimada, K., Hayano, M., Pagano, N. C. & Stockwell, B. R. Cell-Line Selectivity Improves the Predictive Power of Pharmacogenomic Analyses and Helps Identify NADPH as Biomarker for Ferroptosis Sensitivity. *Cell Chem Biol* **23**, 225-235, doi:10.1016/j.chembiol.2015.11.016 (2016).
- 196 Cardoso, B. R., Hare, D. J., Bush, A. I. & Roberts, B. R. Glutathione peroxidase 4: a new player in neurodegeneration? *Mol Psychiatry* **22**, 328-335, doi:10.1038/mp.2016.196 (2017).
- 197 Driscoll, D. M. & Copeland, P. R. Mechanism and regulation of selenoprotein synthesis. *Annu Rev Nutr* **23**, 17-40, doi:10.1146/annurev.nutr.23.011702.073318 (2003).
- 198 Wenz, C. *et al.* t-BuOOH induces ferroptosis in human and murine cell lines. *Arch Toxicol* **92**, 759-775, doi:10.1007/s00204-017-2066-y (2018).
- 199 Dixon, S. J. *et al.* Human Haploid Cell Genetics Reveals Roles for Lipid Metabolism Genes in Nonapoptotic Cell Death. *ACS Chem Biol* **10**, 1604-1609, doi:10.1021/acscchembio.5b00245 (2015).
- 200 Zilka, O. *et al.* On the Mechanism of Cytoprotection by Ferrostatin-1 and Liproxstatin-1 and the Role of Lipid Peroxidation in Ferroptotic Cell Death. *ACS Cent Sci* **3**, 232-243, doi:10.1021/acscentsci.7b00028 (2017).
- 201 Yagoda, N. *et al.* RAS-RAF-MEK-dependent oxidative cell death involving voltage-dependent anion channels. *Nature* **447**, 864-868, doi:10.1038/nature05859 (2007).
- 202 Yang, W. S. *et al.* Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell* **156**, 317-331, doi:10.1016/j.cell.2013.12.010 (2014).
- 203 Abrams, R. P., Carroll, W. L. & Woerpel, K. A. Five-Membered Ring Peroxide Selectively Initiates Ferroptosis in Cancer Cells. *ACS Chem Biol* **11**, 1305-1312, doi:10.1021/acscchembio.5b00900 (2016).
- 204 Friedmann Angeli, J. P. *et al.* Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice. *Nat Cell Biol* **16**, 1180-1191, doi:10.1038/ncb3064 (2014).
- 205 Tonnus, W. & Linkermann, A. The in vivo evidence for regulated necrosis. *Immunol Rev* **277**, 128-149, doi:10.1111/imr.12551 (2017).
- 206 Yoo, S. E. *et al.* Gpx4 ablation in adult mice results in a lethal phenotype accompanied by neuronal loss in brain. *Free Radic Biol Med* **52**, 1820-1827, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.02.043 (2012).
- 207 Toyokuni, S., Ito, F., Yamashita, K., Okazaki, Y. & Akatsuka, S. Iron and thiol redox signaling in cancer: An exquisite balance to escape ferroptosis. *Free Radic Biol Med* **108**, 610-626, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2017.04.024 (2017).

- 208 Dixon, S. J. *et al.* Pharmacological inhibition of cystine-glutamate exchange induces endoplasmic reticulum stress and ferroptosis. *eLife* **3**, e02523, doi:10.7554/eLife.02523 (2014).
- 209 Gout, P. W., Buckley, A. R., Simms, C. R. & Bruchovsky, N. Sulfasalazine, a potent suppressor of lymphoma growth by inhibition of the x(c)- cystine transporter: a new action for an old drug. *Leukemia* **15**, 1633-1640 (2001).
- 210 Liu, D. S. *et al.* Inhibiting the system xC(-)/glutathione axis selectively targets cancers with mutant-p53 accumulation. *Nat Commun* **8**, 14844, doi:10.1038/ncomms14844 (2017).
- 211 Kim, S. E. *et al.* Ultrasmall nanoparticles induce ferroptosis in nutrient-deprived cancer cells and suppress tumour growth. *Nat Nanotechnol* **11**, 977-985, doi:10.1038/nnano.2016.164 (2016).
- 212 Viswanathan, V. S. *et al.* Dependency of a therapy-resistant state of cancer cells on a lipid peroxidase pathway. *Nature* **547**, 453-457, doi:10.1038/nature23007 (2017).
- 213 Harrison, D. A. The Jak/STAT pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**, doi:10.1101/cshperspect.a011205 (2012).
- 214 Dinarello, C. A. Historical insights into cytokines. *Eur J Immunol* **37 Suppl 1**, S34-45, doi:10.1002/eji.200737772 (2007).
- 215 Turner, M. D., Nedjai, B., Hurst, T. & Pennington, D. J. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim Biophys Acta* **1843**, 2563-2582, doi:10.1016/j.bbamcr.2014.05.014 (2014).
- 216 Stark, G. R., Cheon, H. & Wang, Y. Responses to Cytokines and Interferons that Depend upon JAKs and STATs. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **10**, doi:10.1101/cshperspect.a028555 (2018).
- 217 Stark, G. R. & Darnell, J. E., Jr. The JAK-STAT pathway at twenty. *Immunity* **36**, 503-514, doi:10.1016/j.immuni.2012.03.013 (2012).
- 218 Villarino, A. V., Kanno, Y., Ferdinand, J. R. & O'Shea, J. J. Mechanisms of Jak/STAT signaling in immunity and disease. *J Immunol* **194**, 21-27, doi:10.4049/jimmunol.1401867 (2015).
- 219 Yoshimura, A. *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* **14**, 2816-2826 (1995).
- 220 Endo, T. A. *et al.* A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature* **387**, 921-924, doi:10.1038/43213 (1997).
- 221 Naka, T. *et al.* Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature* **387**, 924-929, doi:10.1038/43219 (1997).
- 222 Starr, R. *et al.* A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* **387**, 917-921, doi:10.1038/43206 (1997).
- 223 Yoshimura, A., Suzuki, M., Sakaguchi, R., Hanada, T. & Yasukawa, H. SOCS, Inflammation, and Autoimmunity. *Front Immunol* **3**, 20, doi:10.3389/fimmu.2012.00020 (2012).
- 224 Lu, Y. *et al.* Loss of SOCS3 gene expression converts STAT3 function from anti-apoptotic to pro-apoptotic. *J Biol Chem* **281**, 36683-36690, doi:10.1074/jbc.M607374200 (2006).

- 225 Madonna, S., Scarponi, C., De Pita, O. & Albanesi, C. Suppressor of cytokine signaling 1 inhibits IFN-gamma inflammatory signaling in human keratinocytes by sustaining ERK1/2 activation. *FASEB J* **22**, 3287-3297, doi:10.1096/fj.08-106831 (2008).
- 226 Yasukawa, H. *et al.* The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *EMBO J* **18**, 1309-1320, doi:10.1093/emboj/18.5.1309 (1999).
- 227 Sasaki, A. *et al.* 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 (1999).
- 228 Pawson, T. & Nash, P. Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. *Science* **300**, 445-452, doi:10.1126/science.1083653 (2003).
- 229 Songyang, Z. *et al.* SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* **72**, 767-778 (1993).
- 230 Kuriyan, J. & Cowburn, D. Modular peptide recognition domains in eukaryotic signaling. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **26**, 259-288, doi:10.1146/annurev.biophys.26.1.259 (1997).
- 231 Krebs, D. L. & Hilton, D. J. SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem Cells* **19**, 378-387, doi:10.1634/stemcells.19-5-378 (2001).
- 232 Nicholson, S. E. *et al.* 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, doi:10.1093/emboj/18.2.375 (1999).
- 233 Machida, K. & Mayer, B. J. The SH2 domain: versatile signaling module and pharmaceutical target. *Biochim Biophys Acta* **1747**, 1-25, doi:10.1016/j.bbapap.2004.10.005 (2005).
- 234 Linossi, E. M. & Nicholson, S. E. The SOCS box-adapting proteins for ubiquitination and proteasomal degradation. *IUBMB Life* **64**, 316-323, doi:10.1002/iub.1011 (2012).
- 235 Kamura, T. *et al.* VHL-box and SOCS-box domains determine binding specificity for Cul2-Rbx1 and Cul5-Rbx2 modules of ubiquitin ligases. *Genes Dev* **18**, 3055-3065, doi:10.1101/gad.1252404 (2004).
- 236 Kamizono, S. *et al.* The SOCS box of SOCS-1 accelerates ubiquitin-dependent proteolysis of TEL-JAK2. *J Biol Chem* **276**, 12530-12538, doi:10.1074/jbc.M010074200 (2001).
- 237 Bullock, A. N., Debreczeni, J. E., Edwards, A. M., Sundstrom, M. & Knapp, S. 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, doi:10.1073/pnas.0601638103 (2006).
- 238 Bullock, A. N., Rodriguez, M. C., Debreczeni, J. E., Songyang, Z. & Knapp, S. 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, doi:10.1016/j.str.2007.09.016 (2007).
- 239 Babon, J. J. *et al.* The SOCS box domain of SOCS3: structure and interaction with the elonginBC-cullin5 ubiquitin ligase. *J Mol Biol* **381**, 928-940, doi:10.1016/j.jmb.2008.06.038 (2008).

- 240 Babon, J. J., Sabo, J. K., Zhang, J. G., Nicola, N. A. & Norton, R. S. The SOCS box encodes a hierarchy of affinities for Cullin5: implications for ubiquitin ligase formation and cytokine signalling suppression. *J Mol Biol* **387**, 162-174 (2009).
- 241 Zhang, J. G. *et al.* 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, doi:10.1073/pnas.231486498 (2001).
- 242 Boyle, K. *et al.* The SOCS box of suppressor of cytokine signaling-3 contributes to the control of G-CSF responsiveness in vivo. *Blood* **110**, 1466-1474, doi:10.1182/blood-2007-03-079178 (2007).
- 243 Babon, J. J. *et al.* Suppression of cytokine signaling by SOCS3: characterization of the mode of inhibition and the basis of its specificity. *Immunity* **36**, 239-250, doi:10.1016/j.immuni.2011.12.015 (2012).
- 244 Kershaw, N. J. *et al.* SOCS3 binds specific receptor-JAK complexes to control cytokine signaling by direct kinase inhibition. *Nat Struct Mol Biol* **20**, 469-476, doi:10.1038/nsmb.2519 (2013).
- 245 Marine, J. C. *et al.* SOCS1 deficiency causes a lymphocyte-dependent perinatal lethality. *Cell* **98**, 609-616 (1999).
- 246 Alexander, W. S. *et al.* SOCS1 is a critical inhibitor of interferon gamma signaling and prevents the potentially fatal neonatal actions of this cytokine. *Cell* **98**, 597-608 (1999).
- 247 Tanaka, K. *et al.* Loss of suppressor of cytokine signaling 1 in helper T cells leads to defective Th17 differentiation by enhancing antagonistic effects of IFN-gamma on STAT3 and Smads. *J Immunol* **180**, 3746-3756 (2008).
- 248 Torisu, T. *et al.* Suppressor of cytokine signaling 1 protects mice against concanavalin A-induced hepatitis by inhibiting apoptosis. *Hepatology* **47**, 1644-1654, doi:10.1002/hep.22214 (2008).
- 249 Hashimoto, M. *et al.* SOCS1 regulates type I/type II NKT cell balance by regulating IFN-gamma signaling. *Int Immunol* **23**, 165-176, doi:10.1093/intimm/dxq469 (2011).
- 250 Kinjyo, I. *et al.* SOCS1/JAB is a negative regulator of LPS-induced macrophage activation. *Immunity* **17**, 583-591 (2002).
- 251 Hashimoto, M. *et al.* Silencing of SOCS1 in macrophages suppresses tumor development by enhancing antitumor inflammation. *Cancer Sci* **100**, 730-736 (2009).
- 252 Sachithanandan, N. *et al.* Macrophage deletion of SOCS1 increases sensitivity to LPS and palmitic acid and results in systemic inflammation and hepatic insulin resistance. *Diabetes* **60**, 2023-2031, doi:10.2337/db11-0259 (2011).
- 253 Hanada, T. *et al.* Suppressor of cytokine signaling-1 is essential for suppressing dendritic cell activation and systemic autoimmunity. *Immunity* **19**, 437-450 (2003).
- 254 Hanada, T. *et al.* Induction of hyper Th1 cell-type immune responses by dendritic cells lacking the suppressor of cytokine signaling-1 gene. *J Immunol* **174**, 4325-4332 (2005).
- 255 Carow, B. *et al.* Silencing suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS1) in macrophages improves Mycobacterium tuberculosis control in an interferon-gamma (IFN-gamma)-dependent manner. *J Biol Chem* **286**, 26873-26887, doi:10.1074/jbc.M111.238287 (2011).
- 256 Stutz, A., Kessler, H., Kaschel, M. E., Meissner, M. & Dalpke, A. H. Cell invasion and strain dependent induction of suppressor of cytokine signaling-1 by *Toxoplasma gondii*. *Immunobiology* **217**, 28-36, doi:10.1016/j.imbio.2011.08.008 (2012).

- 257 Zhang, Y. *et al.* Cross-talk between programmed death-1 and suppressor of cytokine signaling-1 in inhibition of IL-12 production by monocytes/macrophages in hepatitis C virus infection. *J Immunol* **186**, 3093-3103, doi:10.4049/jimmunol.1002006 (2011).
- 258 Okumura, A., Pitha, P. M., Yoshimura, A. & Harty, R. N. Interaction between Ebola virus glycoprotein and host toll-like receptor 4 leads to induction of proinflammatory cytokines and SOCS1. *J Virol* **84**, 27-33, doi:10.1128/JVI.01462-09 (2010).
- 259 Sasi, W., Sharma, A. K. & Mokbel, K. The role of suppressors of cytokine signalling in human neoplasms. *Mol Biol Int* **2014**, 630797, doi:10.1155/2014/630797 (2014).
- 260 Qiu, X. *et al.* A requirement for SOCS-1 and SOCS-3 phosphorylation in Bcr-Abl-induced tumorigenesis. *Neoplasia* **14**, 547-558 (2012).
- 261 Limnander, A., Danial, N. N. & Rothman, P. B. v-Abl signaling disrupts SOCS-1 function in transformed pre-B cells. *Mol Cell* **15**, 329-341, doi:10.1016/j.molcel.2004.06.041 (2004).
- 262 Chen, X. P. *et al.* Pim serine/threonine kinases regulate the stability of Socs-1 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 2175-2180, doi:10.1073/pnas.042035699 (2002).
- 263 Narazaki, M. *et al.* 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 (1998).
- 264 Zhang, J. G. *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 U S A* **96**, 2071-2076 (1999).
- 265 Gregorieff, A., Pyronnet, S., Sonenberg, N. & Veillette, A. Regulation of SOCS-1 expression by translational repression. *J Biol Chem* **275**, 21596-21604, doi:10.1074/jbc.M910087199 (2000).
- 266 Saito, H. *et al.* IFN regulatory factor-1-mediated transcriptional activation of mouse STAT-induced STAT inhibitor-1 gene promoter by IFN-gamma. *J Immunol* **164**, 5833-5843 (2000).
- 267 Letourneur, M., Valentino, L., Travagli-Gross, J., Bertoglio, J. & Pierre, J. Sp2 regulates interferon-gamma-mediated socs1 gene expression. *Mol Immunol* **46**, 2151-2160, doi:10.1016/j.molimm.2009.05.004 (2009).
- 268 Madonna, S. *et al.* The IFN-gamma-dependent suppressor of cytokine signaling 1 promoter activity is positively regulated by IFN regulatory factor-1 and Sp1 but repressed by growth factor independence-1b and Kruppel-like factor-4, and it is dysregulated in psoriatic keratinocytes. *J Immunol* **185**, 2467-2481, doi:10.4049/jimmunol.1001426 (2010).
- 269 Sims, S. H. *et al.* A novel interferon-inducible domain: structural and functional analysis of the human interferon regulatory factor 1 gene promoter. *Mol Cell Biol* **13**, 690-702 (1993).
- 270 Travagli, J., Letourneur, M., Bertoglio, J. & Pierre, J. STAT6 and Ets-1 form a stable complex that modulates Socs-1 expression by interleukin-4 in keratinocytes. *J Biol Chem* **279**, 35183-35192, doi:10.1074/jbc.M403223200 (2004).
- 271 Hebenstreit, D. *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* **171**, 5901-5907 (2003).

- 272 Jegalian, A. G. & 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* **277**, 2345-2352, doi:10.1074/jbc.M105575200 (2002).
- 273 Mostecky, J., Showalter, B. M. & Rothman, P. B. Early growth response-1 regulates lipopolysaccharide-induced suppressor of cytokine signaling-1 transcription. *J Biol Chem* **280**, 2596-2605, doi:10.1074/jbc.M408938200 (2005).
- 274 Laner-Plamberger, S. *et al.* Hedgehog/GLI signaling activates suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) in epidermal and neural tumor cells. *PLoS One* **8**, e75317, doi:10.1371/journal.pone.0075317 (2013).
- 275 Weniger, M. A. *et al.* Mutations of the tumor suppressor gene SOCS-1 in classical Hodgkin lymphoma are frequent and associated with nuclear phospho-STAT5 accumulation. *Oncogene* **25**, 2679-2684, doi:10.1038/sj.onc.1209151 (2006).
- 276 Mottok, A., Renne, C., Willenbrock, K., Hansmann, M. L. & Brauningner, A. Somatic hypermutation of SOCS1 in lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma is accompanied by high JAK2 expression and activation of STAT6. *Blood* **110**, 3387-3390, doi:10.1182/blood-2007-03-082511 (2007).
- 277 Lennerz, J. K. *et al.* Suppressor of cytokine signaling 1 gene mutation status as a prognostic biomarker in classical Hodgkin lymphoma. *Oncotarget* **6**, 29097-29110, doi:10.18632/oncotarget.4829 (2015).
- 278 Melzner, I. *et al.* Biallelic mutation of SOCS-1 impairs JAK2 degradation and sustains phospho-JAK2 action in the MedB-1 mediastinal lymphoma line. *Blood* **105**, 2535-2542, doi:10.1182/blood-2004-09-3701 (2005).
- 279 Schiff, B. *et al.* SOCS1 mutation subtypes predict divergent outcomes in diffuse large B-Cell lymphoma (DLBCL) patients. *Oncotarget* **4**, 35-47, doi:10.18632/oncotarget.774 (2013).
- 280 Watanabe, D., Naka, T. & Kishimoto, T. Implication of SOCS-1 gene methylation in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* **127**, 608-609, doi:10.1111/j.1365-2141.2004.05245.x (2004).
- 281 Chen, C. Y. *et al.* SOCS1 methylation in patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* **37**, 300-305, doi:10.1002/gcc.10222 (2003).
- 282 Liu, T. C. *et al.* Epigenetic alteration of the SOCS1 gene in chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol* **123**, 654-661 (2003).
- 283 Sobti, R. C. *et al.* Aberrant promoter methylation and loss of suppressor of cytokine signalling-1 gene expression in the development of uterine cervical carcinogenesis. *Cell Oncol (Dordr)* **34**, 533-543, doi:10.1007/s13402-011-0056-2 (2011).
- 284 Hussain, S. *et al.* Methylation-mediated gene silencing of suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS-1) gene in esophageal squamous cell carcinoma patients of Kashmir valley. *J Recept Signal Transduct Res* **31**, 147-156, doi:10.3109/10799893.2011.553836 (2011).
- 285 Macfarlane, L. A. & Murphy, P. R. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr Genomics* **11**, 537-561, doi:10.2174/138920210793175895 (2010).
- 286 Kobayashi, N. *et al.* Identification of miR-30d as a novel prognostic maker of prostate cancer. *Oncotarget* **3**, 1455-1471, doi:10.18632/oncotarget.696 (2012).

- 287 Ren, D. *et al.* Oncogenic miR-210-3p promotes prostate cancer cell EMT and bone metastasis via NF-kappaB signaling pathway. *Mol Cancer* **16**, 117, doi:10.1186/s12943-017-0688-6 (2017).
- 288 Zhang, X. *et al.* Upregulation of miR-572 transcriptionally suppresses SOCS1 and p21 and contributes to human ovarian cancer progression. *Oncotarget* **6**, 15180-15193, doi:10.18632/oncotarget.3737 (2015).
- 289 Merkel, O. *et al.* Oncogenic role of miR-155 in anaplastic large cell lymphoma lacking the t(2;5) translocation. *J Pathol* **236**, 445-456, doi:10.1002/path.4539 (2015).
- 290 Bouamar, H. *et al.* MicroRNA 155 control of p53 activity is context dependent and mediated by Aicda and Socs1. *Mol Cell Biol* **35**, 1329-1340, doi:10.1128/MCB.01446-14 (2015).
- 291 Babar, I. A. *et al.* Nanoparticle-based therapy in an in vivo microRNA-155 (miR-155)-dependent mouse model of lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, E1695-1704, doi:10.1073/pnas.1201516109 (2012).
- 292 Feng, M., Luo, X., Gu, C. & Fei, J. Seed targeting with tiny anti-miR-155 inhibits malignant progression of multiple myeloma cells. *J Drug Target* **23**, 59-66, doi:10.3109/1061186X.2014.951653 (2015).
- 293 Mignacca, L. *et al.* Sponges against miR-19 and miR-155 reactivate the p53-Socs1 axis in hematopoietic cancers. *Cytokine* **82**, 80-86, doi:10.1016/j.cyto.2016.01.015 (2016).
- 294 Huang, C., Li, H., Wu, W., Jiang, T. & Qiu, Z. Regulation of miR-155 affects pancreatic cancer cell invasiveness and migration by modulating the STAT3 signaling pathway through SOCS1. *Oncol Rep* **30**, 1223-1230, doi:10.3892/or.2013.2576 (2013).
- 295 Zhao, X. D., Zhang, W., Liang, H. J. & Ji, W. Y. Overexpression of miR -155 promotes proliferation and invasion of human laryngeal squamous cell carcinoma via targeting SOCS1 and STAT3. *PLoS One* **8**, e56395, doi:10.1371/journal.pone.0056395 (2013).
- 296 Jiang, S. *et al.* MicroRNA-155 functions as an OncomiR in breast cancer by targeting the suppressor of cytokine signaling 1 gene. *Cancer Res* **70**, 3119-3127, doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4250 (2010).
- 297 Pichiorri, F. *et al.* MicroRNAs regulate critical genes associated with multiple myeloma pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 12885-12890, doi:10.1073/pnas.0806202105 (2008).
- 298 Wang, X. & Chen, Z. MicroRNA-19a functions as an oncogenic microRNA in non-small cell lung cancer by targeting the suppressor of cytokine signaling 1 and mediating STAT3 activation. *Int J Mol Med* **35**, 839-846, doi:10.3892/ijmm.2015.2071 (2015).
- 299 Marioni, G. *et al.* miR-19a and SOCS-1 expression in the differential diagnosis of laryngeal (glottic) verrucous squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol* **69**, 415-421, doi:10.1136/jclinpath-2015-203308 (2016).
- 300 Qin, S. *et al.* miR-19a promotes cell growth and tumorigenesis through targeting SOCS1 in gastric cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* **14**, 835-840 (2013).
- 301 Chen, S. *et al.* Host miR155 promotes tumor growth through a myeloid-derived suppressor cell-dependent mechanism. *Cancer Res* **75**, 519-531, doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-2331 (2015).
- 302 Calabrese, V. *et al.* SOCS1 links cytokine signaling to p53 and senescence. *Mol Cell* **36**, 754-767, doi:10.1016/j.molcel.2009.09.044 (2009).

- 303 Strebovsky, J., Walker, P., Lang, R. & Dalpke, A. H. Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) limits NFkappaB signaling by decreasing p65 stability within the cell nucleus. *Faseb j* **25**, 863-874, doi:10.1096/fj.10-170597 (2011).
- 304 Cui, X. *et al.* The suppressor of cytokine signaling SOCS1 promotes apoptosis of intestinal epithelial cells via p53 signaling in Crohn's disease. *Exp Mol Pathol* **101**, 1-11, doi:10.1016/j.yexmp.2016.05.011 (2016).
- 305 Tagami-Nagata, N. *et al.* Suppressor of cytokine signalling-1 induces significant preclinical antitumor effect in malignant melanoma cells. *Exp Dermatol* **24**, 864-871, doi:10.1111/exd.12802 (2015).
- 306 Shimada, K. *et al.* Molecular mechanism underlying the antiproliferative effect of suppressor of cytokine signaling-1 in non-small-cell lung cancer cells. *Cancer Sci* **104**, 1483-1491, doi:10.1111/cas.12266 (2013).
- 307 Zhou, B. P. *et al.* Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat Cell Biol* **3**, 245-252, doi:10.1038/35060032 (2001).
- 308 Wagayama, H. *et al.* High expression of p21WAF1/CIP1 is correlated with human hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus-associated chronic liver diseases. *Hum Pathol* **33**, 429-434 (2002).
- 309 Yeganeh, M. *et al.* Suppressor of cytokine signaling 1-dependent regulation of the expression and oncogenic functions of p21(CIP1/WAF1) in the liver. *Oncogene* **35**, 4200-4211, doi:10.1038/onc.2015.485 (2016).
- 310 De Sepulveda, P., Ilangumaran, S. & Rottapel, R. Suppressor of cytokine signaling-1 inhibits VAV function through protein degradation. *J Biol Chem* **275**, 14005-14008 (2000).
- 311 Ungureanu, D., Saharinen, P., Junttila, I., Hilton, D. J. & Silvennoinen, O. 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 (2002).
- 312 Bunda, S., Kommaraju, K., Heir, P. & Ohh, M. SOCS-1 mediates ubiquitylation and degradation of GM-CSF receptor. *PLoS One* **8**, e76370, doi:10.1371/journal.pone.0076370 (2013).
- 313 Rui, L., Yuan, M., Frantz, D., Shoelson, S. & White, M. F. SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. *J Biol Chem* **277**, 42394-42398, doi:10.1074/jbc.C200444200 (2002).
- 314 Gui, Y. *et al.* SOCS1 controls liver regeneration by regulating HGF signaling in hepatocytes. *J Hepatol* **55**, 1300-1308, doi:10.1016/j.jhep.2011.03.027 (2011).
- 315 Gui, Y. *et al.* Regulation of MET receptor tyrosine kinase signaling by suppressor of cytokine signaling 1 in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* **34**, 5718-5728, doi:10.1038/onc.2015.20 (2015).
- 316 Raccurt, M. *et al.* Suppressor of cytokine signalling gene expression is elevated in breast carcinoma. *Br J Cancer* **89**, 524-532, doi:10.1038/sj.bjc.6601115 (2003).
- 317 Roman-Gomez, J. *et al.* The suppressor of cytokine signaling-1 is constitutively expressed in chronic myeloid leukemia and correlates with poor cytogenetic response to interferon-alpha. *Haematologica* **89**, 42-48 (2004).

- 318 Schuringa, J. J., Wierenga, A. T., Kruijer, W. & Vellenga, E. Constitutive Stat3, Tyr705, and Ser727 phosphorylation in acute myeloid leukemia cells caused by the autocrine secretion of interleukin-6. *Blood* **95**, 3765-3770 (2000).
- 319 Reddy, A. *et al.* Genetic and Functional Drivers of Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Cell* **171**, 481-494 e415, doi:10.1016/j.cell.2017.09.027 (2017).
- 320 Reddy, P. N. *et al.* SOCS1 cooperates with FLT3-ITD in the development of myeloproliferative disease by promoting the escape from external cytokine control. *Blood* **120**, 1691-1702, doi:10.1182/blood-2010-08-301416 (2012).
- 321 Tobelaim, W. S. *et al.* Tumour-promoting role of SOCS1 in colorectal cancer cells. *Sci Rep* **5**, 14301, doi:10.1038/srep14301 (2015).
- 322 Li, Z. *et al.* Expression of SOCS-1, suppressor of cytokine signalling-1, in human melanoma. *J Invest Dermatol* **123**, 737-745, doi:10.1111/j.0022-202X.2004.23408.x (2004).
- 323 Berzaghi, R. *et al.* SOCS1 favors the epithelial-mesenchymal transition in melanoma, promotes tumor progression and prevents antitumor immunity by PD-L1 expression. *Sci Rep* **7**, 40585, doi:10.1038/srep40585 (2017).
- 324 Huang, F. J. *et al.* Molecular basis for the critical role of suppressor of cytokine signaling-1 in melanoma brain metastasis. *Cancer Res* **68**, 9634-9642, doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1429 (2008).
- 325 Xu, Y. *et al.* Effects of suppressor of cytokine signaling 1 silencing on human melanoma cell proliferation and interferon-gamma sensitivity. *Mol Med Rep* **11**, 583-588, doi:10.3892/mmr.2014.2674 (2015).
- 326 Scutti, J. A. *et al.* Role of SOCS-1 Gene on Melanoma Cell Growth and Tumor Development. *Transl Oncol* **4**, 101-109 (2011).
- 327 Guenterberg, K. D. *et al.* Enhanced anti-tumor activity of interferon-alpha in SOCS1-deficient mice is mediated by CD4(+) and CD8(+) T cells. *Cancer Immunol Immunother* **60**, 1281-1288, doi:10.1007/s00262-011-1034-2 (2011).
- 328 Zimmerer, J. M. *et al.* IFN-alpha-induced signal transduction, gene expression, and antitumor activity of immune effector cells are negatively regulated by suppressor of cytokine signaling proteins. *J Immunol* **178**, 4832-4845 (2007).
- 329 Fojtova, M. *et al.* Development of IFN-gamma resistance is associated with attenuation of SOCS genes induction and constitutive expression of SOCS 3 in melanoma cells. *Br J Cancer* **97**, 231-237, doi:10.1038/sj.bjc.6603849 (2007).
- 330 Zitzmann, K. *et al.* SOCS1 silencing enhances antitumor activity of type I IFNs by regulating apoptosis in neuroendocrine tumor cells. *Cancer Res* **67**, 5025-5032, doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2575 (2007).
- 331 Takahashi, Y. *et al.* Enhancement of antiproliferative activity of interferons by RNA interference-mediated silencing of SOCS gene expression in tumor cells. *Cancer Sci* **99**, 1650-1655, doi:10.1111/j.1349-7006.2008.00850.x (2008).
- 332 Lesinski, G. B. *et al.* Modulation of SOCS protein expression influences the interferon responsiveness of human melanoma cells. *BMC Cancer* **10**, 142, doi:10.1186/1471-2407-10-142 (2010).
- 333 Rous, P. A Sarcoma of the Fowl Transmissible by an Agent Separable from the Tumor Cells. *J Exp Med* **13**, 397-411 (1911).

- 334 Stehelin, D., Varmus, H. E., Bishop, J. M. & Vogt, P. K. DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* **260**, 170-173 (1976).
- 335 Sefton, B. M., Hunter, T., Beemon, K. & Eckhart, W. Evidence that the phosphorylation of tyrosine is essential for cellular transformation by Rous sarcoma virus. *Cell* **20**, 807-816 (1980).
- 336 Brown, M. T. & Cooper, J. A. Regulation, substrates and functions of src. *Biochim Biophys Acta* **1287**, 121-149 (1996).
- 337 Roskoski, R., Jr. Src protein-tyrosine kinase structure, mechanism, and small molecule inhibitors. *Pharmacol Res* **94**, 9-25, doi:10.1016/j.phrs.2015.01.003 (2015).
- 338 Thomas, S. M. & Brugge, J. S. Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**, 513-609, doi:10.1146/annurev.cellbio.13.1.513 (1997).
- 339 Kim, L. C., Song, L. & Haura, E. B. Src kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat Rev Clin Oncol* **6**, 587-595, doi:10.1038/nrclinonc.2009.129 (2009).
- 340 Courtneidge, S. A., Levinson, A. D. & Bishop, J. M. The protein encoded by the transforming gene of avian sarcoma virus (pp60src) and a homologous protein in normal cells (pp60proto-src) are associated with the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 3783-3787 (1980).
- 341 Krueger, J. G., Garber, E. A. & Goldberg, A. R. Subcellular localization of pp60src in RSV-transformed cells. *Curr Top Microbiol Immunol* **107**, 51-124 (1983).
- 342 Kamps, M. P., Buss, J. E. & Sefton, B. M. Rous sarcoma virus transforming protein lacking myristic acid phosphorylates known polypeptide substrates without inducing transformation. *Cell* **45**, 105-112 (1986).
- 343 Kaplan, J. M., Mardon, G., Bishop, J. M. & Varmus, H. E. The first seven amino acids encoded by the v-src oncogene act as a myristylation signal: lysine 7 is a critical determinant. *Mol Cell Biol* **8**, 2435-2441 (1988).
- 344 Resh, M. D. Myristylation and palmitoylation of Src family members: the fats of the matter. *Cell* **76**, 411-413 (1994).
- 345 Shenoy-Scaria, A. M., Gauen, L. K., Kwong, J., Shaw, A. S. & Lublin, D. M. Palmitoylation of an amino-terminal cysteine motif of protein tyrosine kinases p56lck and p59fyn mediates interaction with glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins. *Mol Cell Biol* **13**, 6385-6392 (1993).
- 346 Paige, L. A., Nadler, M. J., Harrison, M. L., Cassady, J. M. & Geahlen, R. L. Reversible palmitoylation of the protein-tyrosine kinase p56lck. *J Biol Chem* **268**, 8669-8674 (1993).
- 347 Rickles, R. J. *et al.* Phage display selection of ligand residues important for Src homology 3 domain binding specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 10909-10913 (1995).
- 348 Feng, S., Chen, J. K., Yu, H., Simon, J. A. & Schreiber, S. L. Two binding orientations for peptides to the Src SH3 domain: development of a general model for SH3-ligand interactions. *Science* **266**, 1241-1247 (1994).
- 349 Songyang, Z. & Cantley, L. C. Recognition and specificity in protein tyrosine kinase-mediated signalling. *Trends Biochem Sci* **20**, 470-475 (1995).
- 350 Kaplan, J. M., Varmus, H. E. & Bishop, J. M. The src protein contains multiple domains for specific attachment to membranes. *Mol Cell Biol* **10**, 1000-1009 (1990).

- 351 Waksman, G. & Kuriyan, J. Structure and specificity of the SH2 domain. *Cell* **116**, S45-
48, 43 p following S48 (2004).
- 352 Cooper, J. A., Gould, K. L., Cartwright, C. A. & Hunter, T. Tyr527 is phosphorylated in
pp60c-src: implications for regulation. *Science* **231**, 1431-1434 (1986).
- 353 Zheng, X. M., Resnick, R. J. & Shalloway, D. A phosphotyrosine displacement
mechanism for activation of Src by PTPalpha. *EMBO J* **19**, 964-978,
doi:10.1093/emboj/19.5.964 (2000).
- 354 Okada, M. & Nakagawa, H. A protein tyrosine kinase involved in regulation of pp60c-
src function. *J Biol Chem* **264**, 20886-20893 (1989).
- 355 Zrihan-Licht, S. *et al.* Association of csk-homologous kinase (CHK) (formerly MATK)
with HER-2/ErbB-2 in breast cancer cells. *J Biol Chem* **272**, 1856-1863 (1997).
- 356 Smart, J. E. *et al.* Characterization of sites for tyrosine phosphorylation in the
transforming protein of Rous sarcoma virus (pp60v-src) and its normal cellular
homologue (pp60c-src). *Proc Natl Acad Sci USA* **78**, 6013-6017 (1981).
- 357 Purchio, A. F. Evidence the pp60src, the product of the Rous sarcoma virus src gene,
undergoes autophosphorylation. *J Virol* **41**, 1-7 (1982).
- 358 Xu, W., Doshi, A., Lei, M., Eck, M. J. & Harrison, S. C. Crystal structures of c-Src
reveal features of its autoinhibitory mechanism. *Mol Cell* **3**, 629-638 (1999).
- 359 Songyang, Z. *et al.* Catalytic specificity of protein-tyrosine kinases is critical for
selective signalling. *Nature* **373**, 536-539, doi:10.1038/373536a0 (1995).
- 360 Takeda, H. *et al.* Comparative analysis of human SRC-family kinase substrate
specificity in vitro. *J Proteome Res* **9**, 5982-5993, doi:10.1021/pr100773t (2010).
- 361 Stein, P. L., Vogel, H. & Soriano, P. Combined deficiencies of Src, Fyn, and Yes
tyrosine kinases in mutant mice. *Genes Dev* **8**, 1999-2007 (1994).
- 362 Summy, J. M. *et al.* Specificity in signaling by c-Yes. *Front Biosci* **8**, s185-205 (2003).
- 363 Huveneers, S. & Danen, E. H. Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and
Rho. *J Cell Sci* **122**, 1059-1069, doi:10.1242/jcs.039446 (2009).
- 364 Meng, W. & Takeichi, M. Adherens junction: molecular architecture and regulation.
Cold Spring Harb Perspect Biol **1**, a002899, doi:10.1101/cshperspect.a002899 (2009).
- 365 Irby, R. B. & Yeatman, T. J. Increased Src activity disrupts cadherin/catenin-mediated
homotypic adhesion in human colon cancer and transformed rodent cells. *Cancer Res*
62, 2669-2674 (2002).
- 366 Calautti, E. *et al.* Tyrosine phosphorylation and src family kinases control keratinocyte
cell-cell adhesion. *J Cell Biol* **141**, 1449-1465 (1998).
- 367 Reynolds, A. B. & Roczniak-Ferguson, A. Emerging roles for p120-catenin in cell
adhesion and cancer. *Oncogene* **23**, 7947-7956, doi:10.1038/sj.onc.1208161 (2004).
- 368 Biscardi, J. S., Ishizawar, R. C., Silva, C. M. & Parsons, S. J. Tyrosine kinase signalling
in breast cancer: epidermal growth factor receptor and c-Src interactions in breast cancer.
Breast Cancer Res **2**, 203-210 (2000).
- 369 Ishizawar, R. C., Miyake, T. & Parsons, S. J. c-Src modulates ErbB2 and ErbB3
heterocomplex formation and function. *Oncogene* **26**, 3503-3510,
doi:10.1038/sj.onc.1210138 (2007).
- 370 Kanda, S., Miyata, Y., Kanetake, H. & Smithgall, T. E. Non-receptor protein-tyrosine
kinases as molecular targets for antiangiogenic therapy (Review). *Int J Mol Med* **20**, 113-
121 (2007).

- 371 Trevino, J. G. *et al.* Expression and activity of SRC regulate interleukin-8 expression in pancreatic adenocarcinoma cells: implications for angiogenesis. *Cancer Res* **65**, 7214-7222, doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3858 (2005).
- 372 Mukhopadhyay, D., Tsiokas, L. & Sukhatme, V. P. Wild-type p53 and v-Src exert opposing influences on human vascular endothelial growth factor gene expression. *Cancer Res* **55**, 6161-6165 (1995).
- 373 Talamonti, M. S., Roh, M. S., Curley, S. A. & Gallick, G. E. Increase in activity and level of pp60c-src in progressive stages of human colorectal cancer. *J Clin Invest* **91**, 53-60, doi:10.1172/JCI116200 (1993).
- 374 Yeatman, T. J. A renaissance for SRC. *Nat Rev Cancer* **4**, 470-480, doi:10.1038/nrc1366 (2004).
- 375 Masaki, T. *et al.* Reduced C-terminal Src kinase (Csk) activities in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **29**, 379-384, doi:10.1002/hep.510290239 (1999).
- 376 Cam, W. R. *et al.* Reduced C-terminal Src kinase activity is correlated inversely with pp60(c-src) activity in colorectal carcinoma. *Cancer* **92**, 61-70 (2001).
- 377 Irby, R. B. *et al.* Activating SRC mutation in a subset of advanced human colon cancers. *Nat Genet* **21**, 187-190, doi:10.1038/5971 (1999).
- 378 Pene-Dumitrescu, T. & Smithgall, T. E. Expression of a Src family kinase in chronic myelogenous leukemia cells induces resistance to imatinib in a kinase-dependent manner. *J Biol Chem* **285**, 21446-21457, doi:10.1074/jbc.M109.090043 (2010).
- 379 Hayette, S. *et al.* Longitudinal studies of SRC family kinases in imatinib- and dasatinib-resistant chronic myelogenous leukemia patients. *Leuk Res* **35**, 38-43, doi:10.1016/j.leukres.2010.06.030 (2011).
- 380 Mayer, E. L. & Krop, I. E. Advances in targeting SRC in the treatment of breast cancer and other solid malignancies. *Clin Cancer Res* **16**, 3526-3532, doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-1834 (2010).
- 381 Zhang, S. & Yu, D. Targeting Src family kinases in anti-cancer therapies: turning promise into triumph. *Trends Pharmacol Sci* **33**, 122-128, doi:10.1016/j.tips.2011.11.002 (2012).
- 382 Miller, A. A. *et al.* A phase II study of dasatinib in patients with chemosensitive relapsed small cell lung cancer (Cancer and Leukemia Group B 30602). *J Thorac Oncol* **5**, 380-384, doi:10.1097/JTO.0b013e3181cee36e (2010).
- 383 Sharma, M. R. *et al.* Dasatinib in previously treated metastatic colorectal cancer: a phase II trial of the University of Chicago Phase II Consortium. *Invest New Drugs* **30**, 1211-1215, doi:10.1007/s10637-011-9681-x (2012).
- 384 Campone, M. *et al.* Phase II study of single-agent bosutinib, a Src/Abl tyrosine kinase inhibitor, in patients with locally advanced or metastatic breast cancer pretreated with chemotherapy. *Ann Oncol* **23**, 610-617, doi:10.1093/annonc/mdr261 (2012).
- 385 Arcaroli, J. J. *et al.* Gene array and fluorescence in situ hybridization biomarkers of activity of saracatinib (AZD0530), a Src inhibitor, in a preclinical model of colorectal cancer. *Clin Cancer Res* **16**, 4165-4177, doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-0066 (2010).
- 386 Zhang, S. *et al.* Combating trastuzumab resistance by targeting SRC, a common node downstream of multiple resistance pathways. *Nat Med* **17**, 461-469, doi:10.1038/nm.2309 (2011).

- 387 Rexer, B. N. *et al.* Phosphoproteomic mass spectrometry profiling links Src family kinases to escape from HER2 tyrosine kinase inhibition. *Oncogene* **30**, 4163-4174, doi:10.1038/onc.2011.130 (2011).
- 388 Bertotti, A. *et al.* Inhibition of Src impairs the growth of met-addicted gastric tumors. *Clin Cancer Res* **16**, 3933-3943, doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-0106 (2010).
- 389 Yoshida, T. *et al.* Effects of Src inhibitors on cell growth and epidermal growth factor receptor and MET signaling in gefitinib-resistant non-small cell lung cancer cells with acquired MET amplification. *Cancer Sci* **101**, 167-172, doi:10.1111/j.1349-7006.2009.01368.x (2010).
- 390 Saint-Germain, E. *et al.* SOCS1 regulates senescence and ferroptosis by modulating the expression of p53 target genes. *Aging (Albany NY)* **9**, 2137-2162, doi:10.18632/aging.101306 (2017).
- 391 Purvis, J. E. *et al.* p53 dynamics control cell fate. *Science* **336**, 1440-1444, doi:10.1126/science.1218351 (2012).
- 392 Cai, L., Dalal, C. K. & Elowitz, M. B. Frequency-modulated nuclear localization bursts coordinate gene regulation. *Nature* **455**, 485-490, doi:10.1038/nature07292 (2008).
- 393 Hoffmann, A., Levchenko, A., Scott, M. L. & Baltimore, D. The I κ B-NF- κ B signaling module: temporal control and selective gene activation. *Science* **298**, 1241-1245, doi:10.1126/science.1071914 (2002).
- 394 Tay, S. *et al.* Single-cell NF- κ B dynamics reveal digital activation and analogue information processing. *Nature* **466**, 267-271, doi:10.1038/nature09145 (2010).
- 395 Ashall, L. *et al.* Pulsatile stimulation determines timing and specificity of NF- κ B-dependent transcription. *Science* **324**, 242-246, doi:10.1126/science.1164860 (2009).
- 396 Batchelor, E., Loewer, A., Mock, C. & Lahav, G. Stimulus-dependent dynamics of p53 in single cells. *Mol Syst Biol* **7**, 488, doi:10.1038/msb.2011.20 (2011).
- 397 Lahav, G. *et al.* Dynamics of the p53-Mdm2 feedback loop in individual cells. *Nat Genet* **36**, 147-150, doi:10.1038/ng1293 (2004).
- 398 Geva-Zatorsky, N. *et al.* Oscillations and variability in the p53 system. *Mol Syst Biol* **2**, 2006 0033, doi:10.1038/msb4100068 (2006).
- 399 Hu, W. *et al.* A single nucleotide polymorphism in the MDM2 gene disrupts the oscillation of p53 and MDM2 levels in cells. *Cancer Res* **67**, 2757-2765, doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2656 (2007).
- 400 Tsuruoka, S. *et al.* Functional analysis of ABCA8, a new drug transporter. *Biochem Biophys Res Commun* **298**, 41-45 (2002).
- 401 Dvorak, P., Pesta, M. & Soucek, P. ABC gene expression profiles have clinical importance and possibly form a new hallmark of cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* **39**, 1010428317699800, doi:10.1177/1010428317699800 (2017).
- 402 Thompson, M. R., Xu, D. & Williams, B. R. ATF3 transcription factor and its emerging roles in immunity and cancer. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* **87**, 1053-1060, doi:10.1007/s00109-009-0520-x (2009).
- 403 Larrieu-Lahargue, F., Welm, A. L., Thomas, K. R. & Li, D. Y. Netrin-4 induces lymphangiogenesis in vivo. *Blood* **115**, 5418-5426, doi:10.1182/blood-2009-11-252338 (2010).

- 404 Nacht, M. *et al.* Netrin-4 regulates angiogenic responses and tumor cell growth. *Exp Cell Res* **315**, 784-794, doi:10.1016/j.yexcr.2008.11.018 (2009).
- 405 Printen, J. A., Brady, M. J. & Saltiel, A. R. PTG, a protein phosphatase 1-binding protein with a role in glycogen metabolism. *Science* **275**, 1475-1478 (1997).
- 406 Yang, R. *et al.* Loss of protein targeting to glycogen sensitizes human hepatocellular carcinoma cells towards glucose deprivation mediated oxidative stress and cell death. *Bioscience reports* **35**, doi:10.1042/bsr20150090 (2015).
- 407 Shur, I., Socher, R., Hameiri, M., Fried, A. & Benayahu, D. Molecular and cellular characterization of SEL-OB/SVEP1 in osteogenic cells in vivo and in vitro. *Journal of cellular physiology* **206**, 420-427, doi:10.1002/jcp.20497 (2006).
- 408 Munoz-Fontela, C., Mandinova, A., Aaronson, S. A. & Lee, S. W. Emerging roles of p53 and other tumour-suppressor genes in immune regulation. *Nat Rev Immunol* **16**, 741-750, doi:10.1038/nri.2016.99 (2016).
- 409 Engeland, K. Cell cycle arrest through indirect transcriptional repression by p53: I have a DREAM. *Cell Death Differ* **25**, 114-132, doi:10.1038/cdd.2017.172 (2018).
- 410 Ou, Y., Wang, S. J., Li, D., Chu, B. & Gu, W. Activation of SAT1 engages polyamine metabolism with p53-mediated ferroptotic responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, E6806-e6812, doi:10.1073/pnas.1607152113 (2016).
- 411 Murphy, M. E. Ironing out how p53 regulates ferroptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 12350-12352, doi:10.1073/pnas.1615159113 (2016).
- 412 Mallette, F. A., Calabrese, V., Ilangumaran, S. & Ferbeyre, G. SOCS1, a novel interaction partner of p53 controlling oncogene-induced senescence. *Aging (Albany NY)* **2**, 445-452, doi:10.18632/aging.100163 (2010).
- 413 Okamoto, K., Kitabayashi, I. & Taya, Y. KAP1 dictates p53 response induced by chemotherapeutic agents via Mdm2 interaction. *Biochem Biophys Res Commun* **351**, 216-222, doi:10.1016/j.bbrc.2006.10.022 (2006).
- 414 Wang, C. *et al.* MDM2 interaction with nuclear corepressor KAP1 contributes to p53 inactivation. *Embo j* **24**, 3279-3290, doi:10.1038/sj.emboj.7600791 (2005).
- 415 Li, X. *et al.* Role for KAP1 serine 824 phosphorylation and sumoylation/desumoylation switch in regulating KAP1-mediated transcriptional repression. *J Biol Chem* **282**, 36177-36189, doi:10.1074/jbc.M706912200 (2007).
- 416 Charoenthongtrakul, S., Zhou, Q., Shembade, N., Harhaj, N. S. & Harhaj, E. W. Human T cell leukemia virus type 1 Tax inhibits innate antiviral signaling via NF-kappaB-dependent induction of SOCS1. *J Virol* **85**, 6955-6962, doi:10.1128/jvi.00007-11 (2011).
- 417 Candi, E., Agostini, M., Melino, G. & Bernassola, F. How the TP53 family proteins TP63 and TP73 contribute to tumorigenesis: regulators and effectors. *Hum Mutat* **35**, 702-714, doi:10.1002/humu.22523 (2014).
- 418 Tannahill, G. M. *et al.* SOCS2 can enhance interleukin-2 (IL-2) and IL-3 signaling by accelerating SOCS3 degradation. *Mol Cell Biol* **25**, 9115-9126, doi:10.1128/mcb.25.20.9115-9126.2005 (2005).
- 419 Kong, X. *et al.* Interleukin-22 induces hepatic stellate cell senescence and restricts liver fibrosis in mice. *Hepatology* **56**, 1150-1159, doi:10.1002/hep.25744 (2012).

- 420 Piessevaux, J. *et al.* Functional cross-modulation between SOCS proteins can stimulate cytokine signaling. *J Biol Chem* **281**, 32953-32966, doi:10.1074/jbc.M600776200 (2006).
- 421 Babon, J. J. *et al.* The structure of SOCS3 reveals the basis of the extended SH2 domain function and identifies an unstructured insertion that regulates stability. *Mol Cell* **22**, 205-216, doi:10.1016/j.molcel.2006.03.024 (2006).
- 422 Giordanetto, F. & Kroemer, R. T. A three-dimensional model of Suppressor Of Cytokine Signalling 1 (SOCS-1). *Protein Eng* **16**, 115-124 (2003).
- 423 Liao, N. P. D. & Babon, J. J. Expression and Purification of JAK1 and SOCS1 for Structural and Biochemical Studies. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **1725**, 267-280, doi:10.1007/978-1-4939-7568-6_21 (2018).
- 424 Qian, Q., Lv, Y. & Li, P. SOCS1 is associated with clinical progression and acts as an oncogenic role in triple-negative breast cancer. *IUBMB Life*, doi:10.1002/iub.1728 (2018).
- 425 Baetz, A., Koelsche, C., Strebovsky, J., Heeg, K. & Dalpke, A. H. Identification of a nuclear localization signal in suppressor of cytokine signaling 1. *Faseb j* **22**, 4296-4305, doi:10.1096/fj.08-116079 (2008).
- 426 Ingley, E. *et al.* Csk-binding protein mediates sequential enzymatic down-regulation and degradation of Lyn in erythropoietin-stimulated cells. *J Biol Chem* **281**, 31920-31929, doi:10.1074/jbc.M602637200 (2006).
- 427 Sommer, U. *et al.* Mechanisms of SOCS3 phosphorylation upon interleukin-6 stimulation. Contributions of Src- and receptor-tyrosine kinases. *J Biol Chem* **280**, 31478-31488, doi:10.1074/jbc.M506008200 (2005).
- 428 Battistello, E. *et al.* Pan-SRC kinase inhibition blocks B-cell receptor oncogenic signaling in non-Hodgkin lymphoma. *Blood* **131**, 2345-2356, doi:10.1182/blood-2017-10-809210 (2018).
- 429 Rodriguez-Abreu, D., Bordoni, A. & Zucca, E. Epidemiology of hematological malignancies. *Ann Oncol* **18 Suppl 1**, i3-i8, doi:10.1093/annonc/mdl443 (2007).
- 430 Chaganti, S. *et al.* Guidelines for the management of diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol* **174**, 43-56, doi:10.1111/bjh.14136 (2016).
- 431 Xu-Monette, Z. Y. *et al.* Mutational profile and prognostic significance of TP53 in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP: report from an International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Blood* **120**, 3986-3996, doi:10.1182/blood-2012-05-433334 (2012).
- 432 Lenz, G. *et al.* Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *N Engl J Med* **359**, 2313-2323, doi:10.1056/NEJMoa0802885 (2008).
- 433 Wang, X. J. *et al.* P53 expression correlates with poorer survival and augments the negative prognostic effect of MYC rearrangement, expression or concurrent MYC/BCL2 expression in diffuse large B-cell lymphoma. *Mod Pathol* **30**, 194-203, doi:10.1038/modpathol.2016.178 (2017).
- 434 Young, K. H. *et al.* Structural profiles of TP53 gene mutations predict clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma: an international collaborative study. *Blood* **112**, 3088-3098, doi:10.1182/blood-2008-01-129783 (2008).

- 435 Young, K. H. *et al.* Mutations in the DNA-binding codons of TP53, which are associated with decreased expression of TRAILreceptor-2, predict for poor survival in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* **110**, 4396-4405, doi:10.1182/blood-2007-02-072082 (2007).
- 436 Paik, J. H. *et al.* Expression and prognostic implications of cell cycle regulatory molecules, p16, p21, p27, p14 and p53 in germinal centre and non-germinal centre B-like diffuse large B-cell lymphomas. *Histopathology* **47**, 281-291, doi:10.1111/j.1365-2559.2005.02222.x (2005).
- 437 Chang, C. C., Liu, Y. C., Cleveland, R. P. & Perkins, S. L. Expression of c-Myc and p53 correlates with clinical outcome in diffuse large B-cell lymphomas. *Am J Clin Pathol* **113**, 512-518, doi:10.1309/YHFE-R65B-D3LK-3GGV (2000).
- 438 Kerbauy, F. R. *et al.* Detection and possible prognostic relevance of p53 gene mutations in diffuse large B-cell lymphoma. An analysis of 51 cases and review of the literature. *Leuk Lymphoma* **45**, 2071-2078, doi:10.1080/10428190410001713170 (2004).
- 439 Sohn, S. K. *et al.* Prognostic significance of bcl-2, bax, and p53 expression in diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Hematol* **73**, 101-107, doi:10.1002/ajh.10333 (2003).
- 440 Ke, J. *et al.* Anomalous constitutive Src kinase activity promotes B lymphoma survival and growth. *Mol Cancer* **8**, 132, doi:10.1186/1476-4598-8-132 (2009).
- 441 Yang, C. *et al.* Tyrosine kinase inhibition in diffuse large B-cell lymphoma: molecular basis for antitumor activity and drug resistance of dasatinib. *Leukemia* **22**, 1755-1766, doi:10.1038/leu.2008.163 (2008).
- 442 Hollmann, C. A. *et al.* Therapeutic implications of Src independent calcium mobilization in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Res* **34**, 585-593, doi:10.1016/j.leukres.2009.08.030 (2010).
- 443 Winiarska, M. *et al.* Inhibitors of SRC kinases impair antitumor activity of anti-CD20 monoclonal antibodies. *mAbs* **6**, 1300-1313, doi:10.4161/mabs.32106 (2014).
- 444 Abdullah, C., Korkaya, H., Iizuka, S. & Courtneidge, S. A. SRC increases MYC mRNA expression in ER+ breast cancer via mRNA stabilization and inhibition of p53 function. *Mol Cell Biol*, doi:10.1128/mcb.00463-17 (2017).
- 445 Peiro, G. *et al.* Src, a potential target for overcoming trastuzumab resistance in HER2-positive breast carcinoma. *Br J Cancer* **111**, 689-695, doi:10.1038/bjc.2014.327 (2014).
- 446 Khoury, T. *et al.* Apoptosis-related (survivin, Bcl-2), tumor suppressor gene (p53), proliferation (Ki-67), and non-receptor tyrosine kinase (Src) markers expression and correlation with clinicopathologic variables in 60 thymic neoplasms. *Chest* **136**, 220-228, doi:10.1378/chest.08-2482 (2009).