THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biochimie et Biologie Moléculaire

École doctorale CBS2 n°168 - Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

Unité de recherche : UMR5237 - Centre de Recherche en Biologie Cellulaire de Montpellier

La fonction suppresseur de tumeur de la protéine adaptatrice SLAP dans le cancer colorectal implique la régulation de la signalisation mTORC2

Présentée par
Rudy MEVIZOU
Le 28 Mai 2021

Sous la direction de Dr. Serge ROCHE
et Dr. Audrey SIRVENT

Devant le jury composé de

Julie PANNEQUIN, DR2, IGF, Montpellier	Présidente du Jury
Julie GUILLERMET-GUIBERT, CR1, CRCT, Toulouse	Rapportrice
Sophie TARTARE-DECKERT, DR2, C3M, Nice	Rapportrice
Jean-Paul BORG, PU-PH, CRCM, Marseille	Examinateur
Serge ROCHE, DR1, CRBM, Montpellier	Directeur de thèse
Audrey SIRVENT, CR, CRBM, Montpellier	Co-directrice de thèse

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

La fonction anti-oncogénique de la protéine adaptatrice SLAP dans le cancer colorectal implique la régulation de la signalisation mTORC2

Plus de 95% des patients diagnostiqués avec un cancer colorectal (CCR) invasif décèderont dans les 5 ans, principalement en raison de la survenue de métastases. Par conséquent, une meilleure compréhension des voies de signalisation favorisant la progression métastatique et l'identification de nouvelles thérapies associées sont cruciales. Les tyrosines kinases apparaissent comme des acteurs importants de ce processus métastasique. Parmi elles, la tyrosine kinase SRC a été décrite comme jouant un rôle clé dans la prolifération des cellules souches/progénitrices intestinales et dans la tumorigenèse. De plus, un niveau élevé d'activité SRC constitue un facteur de mauvais pronostic pour les patients atteints de CCR et un facteur déterminant dans l'apparition des métastases. Cependant, bien que le rôle de SRC dans le développement tumoral soit bien défini, les mécanismes associés à son activité oncogénique dans le CCR sont encore mal connus. Nous avons découvert un nouveau mécanisme contrôlant l'activité tumorale de SRC dans le CCR qui met en jeu la fonction anti-oncogénique de la protéine adaptatrice SLAP. D'un point de vue mécanistique, SLAP va cibler et déstabiliser des substrats importants de SRC, afin d'atténuer sa signalisation oncogénique. Par exemple, dans le CCR SLAP diminue la dissémination cellulaire en induisant la dégradation du récepteur adhésif EphA2. Par protéomique, j'ai pu identifier une autre cible importante de SLAP dans les cellules de CCR : la sérine/thréonine kinase et inducteur de métastases mTORC2. Mécaniquement, SLAP inhibe la signalisation mTORC2 en désorganisant le complexe mTORC2 mature/actif *via* le ciblage de sa sous-unité régulatrice LST8. Enfin, j'ai montré que le niveau de SLAP dicte la réponse tumorale aux inhibiteurs catalytiques de mTOR dans les cellules de CCR. Collectivement, ces données soutiennent un mécanisme supplémentaire important par lequel SLAP contrôle l'activité tumorale et dévoilent SLAP comme un biomarqueur potentiel de la réponse aux inhibiteurs catalytiques de mTOR dans le CCR.

Mots clés : Signalisation cellulaire, cancer colorectal, tyrosine kinase, suppresseur de tumeur, métastases, invasion cellulaire, thérapie ciblée, biomarqueur.

SLAP displays anti-oncogenic function in colorectal cancer by inhibiting mTORC2 signaling

More than 95% of patients diagnosed with an invasive colorectal cancer (CRC) die within 5 years, mainly due to the metastatic spread of the disease. Therefore, a better understanding of signaling pathways promoting metastatic progression is warranted to identify novel therapeutic strategies in this cancer. The tyrosine kinase and signaling protein SRC has emerged as an important determinant of this metastatic process. SRC deregulation induces intestinal cancer stem cell proliferation and dissemination and is a marker of poor prognosis in CRC patients. However, the way how SRC promotes cancer invasion remains unclear because SRC is rarely mutated in human cancer. Interestingly, my host lab identified an important mechanism in the control of SRC tumor activity via the anti-oncogenic function of the small adaptor protein SLAP in CRC. Mechanistically, SLAP promotes ubiquitination-dependent degradation of critical substrates, such as the adhesive receptor EphA2, to dampen SRC oncogenic signaling. Interestingly, by proteomics, I discovered an additional mechanism underlying anti-oncogenic activity, which involves the serine/threonine kinase and metastasis inducer mTORC2. My results show that mTORC2 is an additional target of SLAP in CRC cells and that SLAP inhibits mTORC2 signaling to exert its inhibitory effect on CRC cells. Mechanistically, SLAP inhibits mTORC2 signaling by promoting the complex's disassembly *via* the targeting of the regulatory subunit LST8. Finally, I showed that the level of SLAP dictates the tumor response to mTOR catalytic inhibitors in CRC cells. Collectively, these data support an additional important mechanism by which SLAP controls tumor activity and unveil SLAP as a potential biomarker of response to catalytic mTOR inhibitors in CRC.

Key words: Cell signaling, colorectal cancer, tyrosine kinase, tumor suppressor, cell invasion, metastases, targeted therapies, biomarker.

Remerciements

Ce manuscrit vient conclure ces quatre années de doctorat, il est également l'occasion de remercier toutes les personnes qui ont rendu possible cette expérience enrichissante.

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres du jury : la Dr Julie Pannequin qui m'a fait l'honneur d'accepter de présider ce jury ; mes rapporteurs, les Drs Patrick Sophie Tartare-Deckert et Julie Guillermet-Guibert d'avoir consenti à juger mon travail de thèse et le PU-PH Jean-Paul Borg d'avoir accepté d'examiner ce travail. Un grand merci également aux Drs Dominique Helmlinger, Céline Gongora et Jean-Paul Borg pour leur participation à mes comités de suivi de thèse. Leurs conseils avisés, tout au long de ma thèse, auront été d'une aide précieuse.

Je remercie la Dr Anne Debant de m'avoir accueilli au CRBM durant ces quatre années si formatrices.

Je remercie le Dr Serge Roche de m'avoir accueillie dans son équipe et de m'avoir accordé sa confiance en acceptant de diriger mes travaux au laboratoire. Son expertise et ses conseils ont largement alimenté mes réflexions. Je te suis reconnaissant pour tout ce que tu as pu m'apporter durant ces 4 années.

Je remercie ma co-directrice de thèse, la Dr Audrey Sirvent-Coquard, pour sa rigueur scientifique, ses conseils, son soutien moral (en particulier pour les différentes présentations orales), sa perfectibilité et sa grande disponibilité qui ont fortement permis l'aboutissement de ce travail. Qu'elle trouve ici l'expression de ma reconnaissance la plus sincère. Puissent ces travaux être à la hauteur de ses attentes.

J'aimerai remercier également tous les membres de mon équipe :

Dana pour ton soutien apporté dans la dernière ligne droite. J'ai pu être témoin de tes capacités innées d'oratrices. Je te souhaite tout le meilleur pour ta thèse et notamment de poursuivre ton épanouissement professionnel que tu as déjà bien amorcé.

Elise et Yvan pour votre enthousiasme et bien que nous ne nous soyons pas côtoyés longtemps ce fût un plaisir de vous connaître.

Marie alias « miss potin », tu connais tout sur tout le monde. Merci pour ta bonne humeur si communicative et avoir contribué à la bonne ambiance de l'équipe.

Maud pour ta gentillesse, ton dynamisme et ta bonne humeur. Tu auras été une voisine de bureau exemplaire. Merci également pour tous ces apartés jeux qu'on a pu avoir.

Youcef pour avoir égayé au quotidien mes deux dernières années de thèse. Tes compétences professionnelles ne sont plus à démontrer et j'en suis certain te permettront de poursuivre une très belle carrière dans le domaine que tu auras choisi.

Merci aux anciens qui sont désormais parti vers de nouvelles aventures :

Céline pour tous les conseils que tu as pu me donner. Tu as toujours répondu présente pour m'apporter des précisions sur de nombreuses techniques de laboratoire.

Clément, Laure et Eloïne pour tous les bons délires qu'on a pu avoir ensemble. Je vous souhaite de réussir avec brio votre thèse !

Emilie pour tes différents conseils prodigués tout au long de ma thèse et tes taquineries. Je te souhaite de réussir dans cette nouvelle voie que tu as choisie.

Jordi ou plutôt « super » Jordi. Toujours prêt à rendre service, j'espère que tu t'épanouies dans ce domaine que tu apprécies tant.

Maya et Ingrid, merci pour votre accueil lors de mon arrivée en stage de M2. Vous avez fortement contribué à mon intégration dans l'équipe.

Valerie tu as bien mérité ton surnom "MacGyver" du laboratoire. Merci pour ton implication dans mon projet.

Un grand merci à tous pour ces 4 années. Ça n'aurait pas été de tout repos mais ce fût vraiment agréable de travailler et d'évoluer à vos côtés ! J'ai été un collègue un peu « mouvementé », mais bon on a quand même passé de bons moments (enfin je crois…)

Un grand merci évidemment à tous mes amis : Merci à tous pour vos soutiens dans les moments difficiles et pour toutes ces super soirées de détente qui m'ont permis de prendre pas mal de recul.

Le plus important pour la fin, J'adresse mes remerciements à ma famille. Vous avez toujours su m'encourager et m'accompagner dans ce que je voulais faire. Je vous en suis extrêmement reconnaissant. Enfin un grand merci à Maëva, je n'ai pas vraiment réussi à te vulgariser mes travaux durant tout ce temps, mais tu m'as toujours soutenu même si cela n'a pas forcément été facile tous les jours.

Ce travail a été financé par la Ligue nationale contre le cancer et par la Fondation ARC

Sommaire

LISTE DES ABREVIATIONS **9**

INTRODUCTION **15**

I. PATHOLOGIE DU CANCER COLORECTAL 16
A. Epidémiologie *16*
B. Physiologie du côlon *17*
1. Anatomie 17
2. Homéostasie intestinale 19
C. Carcinogénèse colorectale *20*
1. Etiologie 20
2. Progression tumorale colique : du polype au carcinome 21
3. Mécanismes moléculaires associés à la formation du CCR 23
4. Voies de signalisation impliquées 26
4.1. La voie Wnt 27
4.2 Les voies EGFR, Ras/MAPK, PI3K/AKT 28
4.3. La voie p53 30
4.4. La voie TGFβ 31
5. Tumeurs du côlon droit *vs* côlon gauche 31
D. Classification du CCR *33*
1. Classification histologique 33
2. Classification moléculaire 35
E. Traitement des CCR *37*
II. LES PROTEINES KINASES DANS LE CCR 40
A. Généralités *40*
1. Fonctions 40
2. Classification 41
B. Les CTK de la famille de SRC dans le CCR *44*
1. Généralités 44
2. Structure 45
3. Mécanismes de régulation des SFK 47
4. Rôle des SFK dans l'homéostasie intestinale 49
5. Rôle des SFK dans le développement des tumeurs intestinales 50
5.1. Rôle des SFK dans la formation des CCR 51
5.2. Rôle des SFK dans la progression tumorale 52
5.3. Rôle des SFK dans la formation de métastases 53
6. Mécanismes de dérégulation des SFK dans le CCR 54
6.1. Mutations somatiques 54
6.2. Surexpression 55
6.3. Inactivation de Csk 55
6.5. Dérégulation de phosphatases 56
6.6. Association des SFK avec des RTK 57
7. SRC, une potentielle cible thérapeutique dans le traitement du CCR 58
C. La Protéine Sérine-Thréonine Kinase mTOR *59*
1. Structure 60
1.1. mTORC1 60
1.2. mTORC2 61
2. Fonctions de la signalisation mTOR 63
2.1. Rôles de mTORC1 63
a. mTORC1 et la machinerie de la traduction : 63
b. mTORC1 et le métabolisme : 64
c. mTORC1 et le renouvellement protéique 65
2.2. Rôles de mTORC2 65
a. mTORC2 et la réorganisation du cytosquelette/motilité : 66
b. mTORC2 et la survie, la prolifération et la croissance cellulaires : 66
3. Mécanismes de régulation de la signalisation mTOR 67
3.1. Régulation de mTORC1 67
3.2. Régulation de mTORC2 69

3.3. Crosstalks connus entre mTORC1 et mTORC2 ... 72
4. Rôles de mTOR dans l'homéostasie intestinale ... 73
5. Rôles de mTOR dans la tumorigenèse colique ... 74
6. Mécanismes de dérégulation de mTOR dans le CCR ... 75
6.1. Dérégulation de mTOR ... 75
6.2. Activation des composants des complexes mTORC1/2 ... 77
6.3. Activation de la signalisation en amont de mTOR ... 77
7. Les inhibiteurs de mTOR en thérapie anticancéreuse ... 78
7.1. Première génération d'inhibiteurs de mTOR ... 78
7.2. Deuxième génération d'inhibiteurs de mTOR ... 79
III. LE CONTROLE DE LA SIGNALISATION ONCOGENIQUE DES SFK PAR LA PROTEINE ADAPTATRICE SLAP ... 81
A. Les protéines adaptatrices ... 81
1. Généralités ... 81
2. Les adaptateurs positifs ... 82
2.1. Introduction ... 82
3. Les adaptateurs négatifs ... 84
3.1. Présentation des adaptateurs négatifs ... 84
3.2. La régulation de la voie JAK/STAT par SOCS ... 85
B. Inhibition des voies dépendantes des SFK par SLAP ... 88
1. La famille des adaptateurs SLAP ... 88
1.1. Présentation de SLAP ... 88
1.2. Présentation de SLAP2 ... 91
2. Expression ... 93
3. Le rôle de SLAP dans la signalisation dépendante des PTK ... 93
3.1. SLAP et la régulation de la voie de signalisation du TCR ... 94
a. Inhibition de l'activation des thymocytes par SLAP ... 94
b. Contrôle du développement des thymocytes par SLAP ... 94
3.2. SLAP et la régulation de la voie de signalisation du BCR ... 96
3.3. Régulation de la signalisation du PDGFR ... 98
a. Inhibition de la réponse mitogénique ... 98
b. Inhibition de la réponse morphologique ... 98
3.4. SLAP et la régulation de la voie de signalisation du récepteur aux CSF ... 99
a. Inhibition de l'activation des monocytes ... 99
b. Inhibition de l'activation des ostéoclastes ... 100
c. Inhibition de l'activation des cellules dendritiques ... 101
3.5. Régulation de l'activation des mastocytes par SLAP ... 101
4. L'activité anti-oncogénique de SLAP dans le CCR ... 102
5. Activité oncogénique de SLAP ... 104

CONTEXTE D'ETUDE ... 105

RESULTATS ... 107

1. SLAP INTERAGIT AVEC MTORC2 DANS LES CELLULES DE CCR ... 108
2. SLAP REGULE NEGATIVEMENT LA SIGNALISATION MTORC2/AKT ... 111
3. LES FONCTIONS ANTI-ONCOGENIQUES DE SLAP DEPENDENT DE LA REGULATION DE LA SIGNALISATION MTORC2/AKT ... 115
4. SLAP DESENSIBILISE LES CELLULES CCR AUX INHIBITEURS CATALYTIQUES DE MTOR ... 118
5. TELO2 ET LST8 SONT LES INTERACTEURS MAJORITAIRES DE SLAP AU SEIN DU COMPLEXE MTORC2 122
6. LES PROPRIETES ANTI-ONCOGENIQUES DE SLAP DEPENDENT DU CIBLAGE DE LST8 ... 126
7. SLAP DESORGANISE LE COMPLEXE MTORC2 MATURE/ACTIF ... 129
CONCLUSION ... 134

RESULTATS COMPLEMENTAIRES ... 136

1. SLAP REGULE LES PROPRIETES SOUCHES CANCEREUSES ... 137
2. LA REGULATION DE LA SIGNALISATION MTORC2 PAR SLAP POURRAIT ETRE DEPENDANTE DE SRC ... 139
3. MECANISME D'INACTIVATION DE SLAP DANS LES CCR ... 141

FIGURES SUPPLEMENTAIRES **142**

DISCUSSION ET PERSPECTIVES **146**

1. LA FONCTION ANTI-ONCOGENIQUE DE SLAP DANS LES CCR 147
   a) Quel est le rôle de SLAP dans l'épithélium colique ? *147*
   b) Quelle est la contribution de SLAP dans la carcinogenèse colorectale ? *148*
   c) Quel est le mécanisme d'inactivation de SLAP dans les CCR ? *150*
2. REGULATION DE LA SIGNALISATION MTORC2 PAR SLAP DANS LES CELLULES DE CCR 152
   a) Les fonctions anti-oncogéniques de SLAP impliquent le ciblage de mTORC2 ..... *152*
   b) Par quel mécanisme moléculaire SLAP régule mTORC2 ? *153*
      - Mécanisme de poly-ubiquitination de type dégradation ? 155
      - Mécanisme de poly-ubiquitination de type non dégradatif ? 156
      - Mécanisme pTyr-dépendant ? 157
   c) Implication du RTK EphA2 dans la fonction oncogénique de mTORC2 ..... *159*
3. IMPLICATION THERAPEUTIQUE 159

MATERIEL ET METHODES **161**

BIBLIOGRAPHIE **172**

TABLE DES ILLUSTRATIONS **186**

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS **189**

Liste des abréviations

LISTE DES ABREVIATIONS

4EBP1	**4E**-**b**inding **p**rotein **1**
5-AZA	**5-AZA**cytidine
5-FU	**5** **F**luoro-**U**racile
Abl	**Abe**l**s**on
ADN	**A**cide **D**ésoxyribo**N**ucléique
ADNc	**ADN c**omplémentaire
AHD	**A**ck1 **H**omology **D**omain
AJCC	**A**merican **J**oint **C**ommittee for **C**ancer Staging
AMPK	**AM**P-activated **P**rotein **K**inase
AP-1	**A**ctivator **P**rotein-1
APC	**A**denomatous **P**olyposis **C**oli
aPK	**PK**s eucaryotes **a**typiques
APS	**A**dapter protein with a **P**H and **S**H2 domain
Arg	**Arg**inine
ARN	**A**cide **R**ibo**N**ucléique
ARNm	**ARN m**essager
Arp2/3	**A**ctin-**r**elated **p**rotein **2/3**
Asp	**A**cide a**sp**artique
ATG13	**A**u**T**opha**G**y related **13**
ATM	**A**taxia **T**elangiectasia **M**utated
ATP	**A**dénosine **T**ri**P**hosphate
ATR	**A**taxia **T**elangiectasia and **R**ad3-related protein
ATRA	**A**ll-**T**rans **R**etinoic **A**cid
BCL2L1	**BCL2 L**ike **1**
BCR	**B C**ell **R**eceptor
BIRC5	**B**aculoviral **I**AP **R**epeat **C**ontaining **5**
Blk	**B l**ymphoid tyrosine **k**inase
BPS	**B**etween **P**H and **S**H2
CAD	**C**arbamoyl-Phosphate Synthetase 2, **A**spartate Transcarbamylase, and **D**ihydroorotase
CAPOX	**CAP**écitabine et **OX**aliplatine
Cbl	**C**asitas **b**-lineage **l**ymphoma
CBP/PAG	**C**sk-**B**inding **P**rotein / **P**hosphoprotein **A**ssociated with **G**lycosphingolipidenriched microdomain
CCR	**C**ancer **C**olo**R**ectal
CD	**C**ellule **D**endritique
CD	**C**luster de **D**ifférenciation
CIN	**C**hromosomal **IN**stability
CIMP	**C**pG **I**sland **M**ethylator **P**henotype
CIS	**C**ytokine-**I**nducible **S**H2-containing protein
CK1	**C**aséine **K**inase **1**
CMH	**C**omplexe **M**ajeur d'**H**istocompatibilité
CMS	**C**onsensus **M**olecular **S**ubtype
COSMIC	**C**atalogue **O**f **S**omatic **M**utations **i**n **C**ancer
CRIB	**C**dc42/**R**ac **I**nteractive **B**inding region
CRIM	**C**ysteine-**RI**ch **M**otor Neuron 1
Crk	**C**T10 **r**egulator of **k**inase
CryoEM	**Cryo**-**M**icroscopie **E**lectronique
CSF-1	**C**olony **S**timulating **F**actor**-1**

CSF-1R	**C**olony **S**timulating **F**actor**-1 R**eceptor
Csk	**C**-**s**rc tyrosine **k**inase
CTK	**T**yrosine **K**inase **C**ytoplasmique
Cys	**Cys**téine
DAPP1	**D**ual **A**daptor Of **P**hosphotyrosine And 3-**P**hosphoinositides **1**
DCC	**D**eleted in **C**olon **C**arcinoma
DD	**D**omaine de **D**imérisation
DEPTOR	**DEP** domain-containing m**TOR**-interacting protein
DN	**D**ouble **N**égatif
DNAPK	**DNA**-dependent **P**rotein **K**inase
DP	**D**ouble **P**ositif
EBD	**E**rbB **B**inding **D**omain
EGF	**E**pidermal **G**rowth **F**actor
EGFR	**EGF R**eceptor
eIF4A, B, E	**e**ukaryotic translation **I**nitiation **F**actor **4A,B,E**
EMT	**T**ransition **E**pithélio-**M**ésenchymateuse
EphA2	**Eph**rin receptor **A2**
ePK	**PK**s **e**ucaryotes typiques
Epo	**E**rythro**po**ïétine
ERG	**E**lément de **R**éponse aux **G**lucocorticoïdes
Erk	**E**xtracellular signal **r**egulated **k**inase
FAK	**F**ocal **A**dhesion **K**inase
FAT	**F**RAP, **A**TM et **T**TRAP
FAT	**F**ocal **A**dhesion **T**argeting
FATC	**FAT C**-terminal
FBXW7	**F**-**B**o**X** And **W**D Repeat Domain Containing **7**
FCA	**F**oyer de **C**ryptes **A**berrantes
FKBP12	**FK**506 **B**inding **P**rotein 1A, **12**kDa
FL	**F**lt3 **L**igand
FLI-1	**F**riend **L**eukemia **I**ntegration-**1**
Flt3	**F**ms-**l**ike **t**yrosine kinase **3**
F-MuLV	**F**riend-**Mu**rine **L**eukemia **V**irus
FOLFIRI	**FOL**inic acid 5 **F**luoro-uracile et **IRI**notecan
FOLFOX	**FOL**inic acid 5 **F**luoro-uracile et **OX**aliplatine
FOLFOXIRI	**FOL**inic acid 5 **F**luoro-uracile, **OX**aliplatine et **IRI**notecan
FoxO1/3a	**F**orkhead B**ox O1/3a**
FRB	**F**KBP12/**R**apamycin-**B**inding
FRNK	**F**AK-**R**elated **N**on-**K**inase
Gads	**G**rb2-related **a**dapter **d**ownstream of **s**hc
GAP	**G**TPase **A**ctivating **P**rotein
GDP	**G**uanosine **Di****P**hosphate
Glu	Acide **Glu**tamique
Gly	**Gly**cine
GM-CSF	**G**ranulocyte **M**acrophage-**C**olony **S**timulating **F**actor
Grap	**G**rb2-**r**elated **a**dapter **p**rotein
Grb2, 10, 14	**G**rowth factor **r**eceptor-**b**ound protein **2**, **10**, **14**
GSK3β	**G**lycogène **S**ynthétase **K**inase **3 β**
GTP	**G**uanosine **T**ri**P**hosphate
Hck	**H**ematopoietic **c**ell **k**inase
HEAT	**H**untingtine, facteur d'**E**longation 3, protéine phosphatase 2**A**, **T**OR1
HIF1α	**H**ypoxia **I**nducible **F**actor **1α**
HNPCC	**H**ereditary **N**on-**P**olyposis **C**olorectal **C**ancer
IEC	**I**ntestinal **E**pithelial **C**ell
Ig	**I**mmuno**g**lobuline
IGFR	**I**nsulin like **G**rowth **F**actor **R**eceptor

IL **I**nter**L**eukine
INCA **I**nstitut **N**ational du **CA**ncer
InsR **Ins**ulin **R**eceptor
INVS **I**nstitut **N**ational de **V**eille **S**anitaire
IRS-1 **I**nsulin **R**eceptor **S**ubstrate-**1**
ISC **I**ntestinal **S**tem **C**ell
ITAM **I**mmunoreceptor **T**yrosine-based **A**ctivation **M**otifs
Jak **Ja**nus **k**inase
kDa **k**ilo**Da**lton
KI **K**nock-**I**n
KIR **R**égion **I**nhibitrice de **K**inase
KO **K**nock-**O**ut
LAT **L**inker of **A**ctivated **T** cells
Lck **L**eukocyte **c**-Terminal Src **k**inase
LEF **L**ymphoid **E**nhancer **F**actor
Leu **Leu**cine
LKB1 **L**iver **K**inase **B1**
LOH **L**oss **O**f **H**eterozygosity
LPA **L**eucémie **P**romyélocytaire **A**iguë
LPS **Li****P**opoly**S**accharides
LRP **L**ow density lipoprotein **R**eceptor-related **P**rotein
LV **L**eu**V**otrin
Lyn **L**ck/**y**es-Related **n**ovel Protein Tyrosine Kinase
Lys **Lys**ine
MAL **M**yelin **A**nd **L**ymphocyte Protein
MAPK **M**itogen-**A**ctivated **P**rotein **K**inase
MAPKAP1 **M**itogen-**A**ctivated **P**rotein **K**inase-**A**ssociated **P**rotein **1**
MCP1 **M**onocyte **C**hemotactic **P**rotein **1**
MDM2 **M**ouse **D**ouble **M**inute **2**
MGMT O-6-**M**ethyl**G**uanine-DNA **M**ethyl**T**ransferase
MICI **M**aladies **I**nflammatoires **C**hroniques de l'**I**ntestin
MIG6 **M**itogen-**I**nducible **G**ene **6**
miR **mi**cro **R**NA
MLH1 **M**ut**L** **H**omolog **1**
MLH3 **M**ut**L** **H**omolog 3
LST8 **m**ammalian **L**ethal with **S**EC13 protein **8**
MMR **M**is**M**atch **R**epair
MS **M**ass **S**pectrometry
MSH2 **M**ut**S** **H**omolog **2**
MSH6 **M**ut**S** **H**omolog **6**
MSI Instabilité des **M**icro**S**atellites
MSS **M**icro**S**atellites **S**tables
MTHFD2 **M**ethylene**T**etra**H**ydro**F**olate **D**ehydrogenase (NADP+ Dependent) **2**, Methenyltetrahydrofolate Cyclohydrolase
mTOR **m**echanistic **T**arget **O**f **R**apamycin ou anciennement **m**ammalian **T**arget **O**f **R**apamycin
mTORC1/2 **mTOR C**omplex1/2
MUTYH **MUTY H**omolog
Myr Acide **Myr**istique
Nck **N**on-**c**atalytic tyrosine **k**inase adaptor protein
NFAT **N**uclear **F**actor of **A**ctivated **T**-cells
OTUD7B **OTU D**eubiquitinase **7B**
P70S6K **70** KDa Ribosomal **P**rotein **S6 K**inase
PAF **P**olypose **A**dénomateuse **F**amiliale
PDCD4 **P**rogramme**D** **C**ell **D**eath **4**

PDGF	**P**latelet-**D**erived **G**rowth **F**actor
PDGFR	**PDGF R**eceptor
PDK1	**P**yruvate **D**ehydrogenase **K**inase **1**
PFK	**P**hospho-**F**ructo **K**inase
PH	**P**leckstrin **H**omology
PI(3,4,5)P3	**P**hosphatidyl**I**nositol-**3,4,5**-**triP**hosphate
PI(4,5)P2	**P**hosphatidyl**I**nositol-**4,5**-**biP**hosphate
PI3K	**P**hosphatidyl**I**nositol-**3**-**K**inase
PIK3CA	**P**hospho**I**nositide-**3**-**K**inase, **C**atalytic, **A**lpha Polypeptide
PIKK	**PI**3**K**-related **K**inases
PK	**P**rotéine **K**inase
PKB	**P**rotein **K**inase **B**
PKC	**P**rotein **K**inase **C**
PLC	**P**hospho**L**ipase **C**
PMS2, 6	**PMS**1 Homolog **2, 6**
PRAS40	**Pr**oline-**R**ich **A**kt **S**ubstrate of **40** kDa
Pro	**Pro**line
PROTOR ½	**PROT**ein associated with rict**OR 1** or **2**
pSer	**P**hospho**Sér**ine
PSTK	**P**rotéines **S**érine/**T**hréonine **K**inases
PTB	**P**hospho**T**yrosine **B**inding
PTEN	**P**hosphatase and **TEN**sin homolog
pThr	**p**hospho**Thr**éonine
PTK	**P**rotéine **T**yrosine **K**inase
PTP	**P**rotéine **T**yrosine **P**hosphatase
PTPL1	**P**rotein **T**yrosine **P**hosphatase non-receptor type 13
PTPR	**P**rotein **T**yrosine **P**hosphatase **R**eceptor
pTyr	**p**hospho**Tyr**osine
RA	**R**as **A**ssociation
Raptor	**R**egulatory **a**ssociated **p**rotein of m**TOR**
EpoR	**R**écepteur à l'**E**rythro**po**ïétine
RhoA	**R**as **ho**molog Family Member **A**
RHEB	**R**as **H**omolog **E**nriched in grain
Rictor	**R**apamycin-**i**nsensitive **c**ompanion of m**TOR**
RSK	**R**ibosomal Protein **S**6 **K**inase A1
RSV	**R**ous **S**arcoma **V**irus
RTK	**R**eceptor **T**yrosine **K**inase
S1P	**S**phingosine-**1**-**P**hosphate
Ser	**Sér**ine
SFK	**S**rc **F**amily **K**inases
SGK1	**S**erum/**G**lucocorticoid Regulated **K**inase **1**
SH1, 2, 3, 4	**S**rc **H**omology **1**, **2**, **3**, **4**
SH3BP2	**SH3** Domain **B**inding **P**rotein **2**
SHB	**SH**2 Domain Containing Adaptor Protein **B**
SHC	**SH**2-**C**ontaining transforming protein
SHP1, 2	**SH**2-containing **P**hosphatase **1**, **2**
shRNA	**s**hort **h**airpin **RNA**
SILAC	**S**table **I**sotope **L**abeling with **A**mino acids in **C**ell culture
siRNA	**s**mall **i**nterfering **RNA**
SLAP	**S**rc-**L**ike **A**daptor **P**rotein
SLP76	**S**H2 domain-containing **L**eukocyte **P**rotein of **76** kDa
SOCS	**S**uppressor **O**f **C**ytokine **S**ignaling
Sos	**S**on **o**f **s**evenless
SP	**S**imple **P**ositif
SREBP1/2	**S**terol **R**egulatory **E**lement **B**inding **P**rotein **1/2**

SSA	**S**essile **S**errated **A**denoma
STAP	**S**ignal **T**ransducing **A**da**P**tor Family Member
STAT	**S**ignal **T**ransducer and **A**ctivator of **T**ranscription
Syk	**S**pleen t**y**rosine **k**inase
TAZ	**T**af**AZ**zin
TBC1D7	**TBC1 D**omain Family Member **7**
TCF	**T**-**C**ell **F**actor
TCR	**R**écepteur des **C**ellules **T**
TGFβ	**T**ransforming **G**rowth **F**actor **β**
Thr	**Thr**éonine
TIF-1A	**T**ranscription **I**nitiation **F**actor **1A**
TNM	**T**umeur, **N**oeud lymphatique, **M**étastase
TNF	**T**umor **N**ecrosis **F**actor
TOS	**TO**r **S**ignalisation
TSA	**T**raditional **S**errated **A**denomas
TSC2	**T**uberous **SC**lerosis **2**
Trp	**Tr**ypto**p**hane
TRRAP	**TR**ansformation/**TR**anscription domain **A**ssociated **P**rotein
Tyr	**Tyr**osine
UBF52	**U**pstream **B**inding **F**actor **52**
UICC	**U**nion **I**nternationale **C**ontre **I**e **C**ancer
ULK1	**U**nc-51-**L**ike autophagy-activating **K**inase **1**
USP9X	**U**biquitin-**S**pecific **P**rotease **9X**
VEGF	**V**ascular **E**ndothelial **G**rowth **F**actor
VEGFR	**V**ascular **E**ndothelial **G**rowth **F**actor **R**eceptor
WT	**W**ild **T**ype
XELOX	**XEL**oda et **OX**aliplatine
Yap	**Y**es **A**ssociated **P**rotein
ZAP-70	**Z**eta-chain-**A**ssociated **P**rotein

Introduction

I. PATHOLOGIE DU CANCER COLORECTAL

A. Epidémiologie

Le cancer colorectal (CCR) représente un problème majeur de santé publique en France avec 43 336 nouveaux cas et 17 117 décès imputables recensés en 2018 (INCA, 2019). Selon les dernières données de l'INCA (Institut National du Cancer), il se situe au 3ème rang des cancers les plus fréquents et au 2nd rang des cancers les plus meurtriers, représentant près de 12% de l'ensemble des décès par cancer. L'amélioration des thérapies anti-cancéreuses et la mise en place de nouvelles associations thérapeutiques combinées à un programme de dépistage précoce de ces tumeurs ont grandement contribué à une meilleure prise en charge des stades précoces. Tous stades confondus, la survie à 5 ans est de 60% ; la gravité du CCR étant principalement liée à sa forte propension à former des métastases qui sont observées dans 40 à 60% des cas (synchrones dans 20 à 25% des cas) (Phelip et al. 2014). Ainsi, si le taux de survie à 5 ans pour les CCR diagnostiqués à un stade précoce est de 90%, il n'est que de 10% pour ceux diagnostiqués à un stade métastatique (Comella et al. 2010). Une meilleure compréhension des mécanismes reliés à l'agressivité de ces cancers et l'identification de nouvelles stratégies thérapeutiques associées sont donc nécessaires pour diminuer le taux de mortalité des patients atteints de CCR métastatique, ce qui constitue l'objectif de mon travail de thèse.

B. Physiologie du côlon

1. Anatomie

Pour mieux comprendre le développement du CCR, il faut tout d'abord connaître l'organisation structurelle et fonctionnelle du côlon. Il est situé dans l'abdomen entre la valvule de Bauhin (jonction entre l'iléon terminal et le côlon droit) et la jonction recto-sigmoïdienne où lui fait suite le rectum. Sa première partie est formée par une poche appelée cæcum à laquelle est appendu l'appendice. Suivent ensuite trois segments que sont le côlon ascendant, le côlon transverse, et le côlon descendant. Ce dernier se prolonge par une partie terminale ayant une forme de S et constituant le côlon sigmoïde, lui-même se poursuivant par le rectum et l'anus **(Figure 1)**.

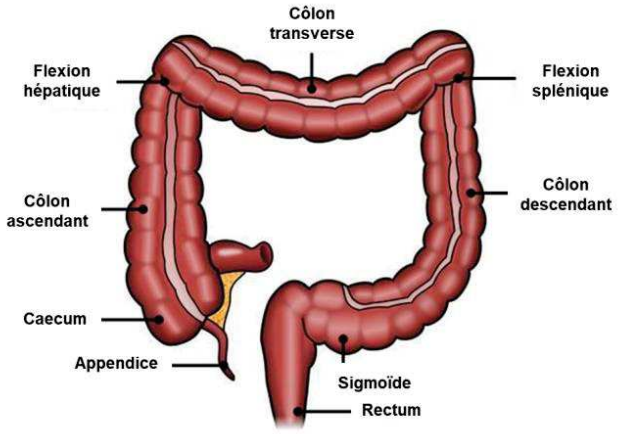


Figure 1 : Anatomie du côlon chez l'homme.

Au niveau structural, la paroi colique, tout comme le reste du tractus gastro-intestinal, est formée de 4 couches concentriques **(Figure 2)**. De l'extérieur vers la lumière on trouve :

- la séreuse, également appelée adventice, est une couche externe de protection formée d'un mésothélium (épithélium pavimenteux simple) et d'un tissu conjonctif. Elle est absente au niveau du rectum,

- la musculeuse, composée de deux couches de cellules musculaires lisses innervées est responsable du péristaltisme du tube digestif. Entre ces deux couches de cellules musculaires se trouvent le plexus myentérique d'Auerbach et des cellules de Cajal, principalement responsables du contrôle du rythme du péristaltisme (contrôle moteur de l'intestin),

- la sous-muqueuse, couche intermédiaire de tissu conjonctif renfermant de nombreux vaisseaux sanguins et lymphatiques. Elle contient également le plexus nerveux de Meissner dont la fonction est de contrôler les sécrétions gastro-intestinales et le débit sanguin local,

- la muqueuse, couche interne en contact direct avec la lumière intestinale. La muqueuse comporte trois éléments : l'épithélium de surface monostratifié intervenant dans la digestion et l'absorption des nutriments, le chorion, formé de tissu conjonctif assurant un rôle de soutien, et la musculaire-muqueuse dont les fibres musculaires lisses permettent les replis de la face luminale de l'épithélium ainsi que les contractions assurant les mouvements propres à la muqueuse.

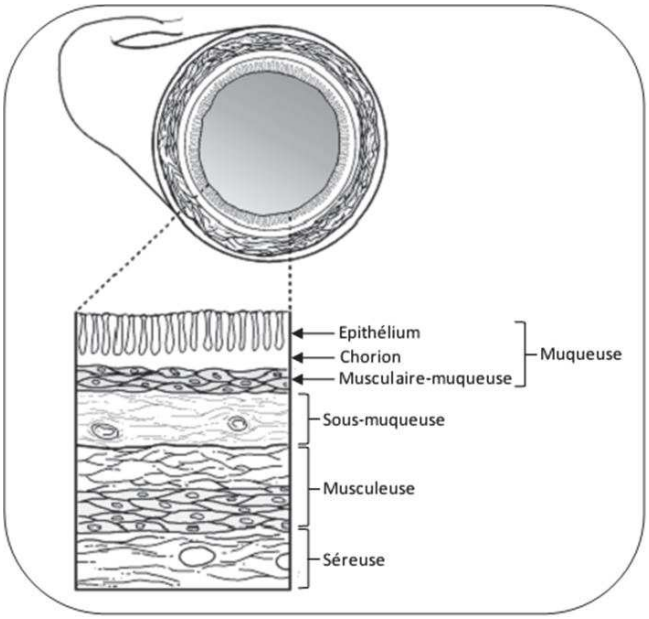


Figure 2 : Structure de la paroi de l'intestin.
De l'extérieur vers la lumière intestinale, la paroi de l'intestin est constituée de 4 couches concentriques : la séreuse, la musculeuse, la sous-muqueuse et la muqueuse qui est formée de l'épithélium, du chorion et de la musculaire-muqueuse.

2. Homéostasie intestinale

L'épithélium du côlon contient de nombreux replis qui contribuent à augmenter considérablement la surface d'échange avec la lumière intestinale (jusqu'à 20 fois). Il forme des invaginations profondes vers la sous-muqueuse, nommées cryptes (ou glandes) de Lieberkhün (Clevers 2013). Ces cryptes représentent l'unité fonctionnelle de l'organe, possédant les fonctions d'absorption et de sécrétion dans la lumière intestinale. Chaque crypte est constituée d'environ 250 cellules, dont les cellules souches qui assurent le renouvellement continu de l'épithélium tous les 5-7 jours. Par division asymétrique elles induisent la formation de cellules progénitrices prolifératives qui s'engagent dans les différents linéages épitheliaux (cellules absorptives ou sécrétrices) (Noah, Donahue, et Shroyer 2011). Les cellules différenciées migrent alors vers la partie supérieure de la crypte pour assurer la fonction physiologique du côlon et, à terme, elles sont progressivement éliminées par apoptose dans la lumière colique (Delgado, Grabinger, et Brunner 2016). Les cellules absorbantes assurent l'absorption de l'eau et des nutriments. Les cellules sécrétrices, composées des cellules caliciformes (ou cellules en gobelet) et des cellules entéro-endocrines (1% de la population), sécrètent respectivement du mucus, des bactéricides et des hormones. De manière intéressante, le rapport entre les cellules absorptives et sécrétrices s'inverse au fur et à mesure de la progression dans le côlon au profit des cellules sécrétrices dans la portion terminale du côlon. Bien que l'intestin grêle soit souvent utilisé comme modèle de la physiopathologie intestinale, l'épithélium du côlon se différencie de l'intestin grêle par une absence de dispositifs d'amplification de surface (villosités) et par la composition cellulaire épithéliale. En particulier, les cellules de Paneth, abondantes dans l'intestin grêle, ne sont retrouvées qu'au niveau du cæcum **(Figure 3)**.

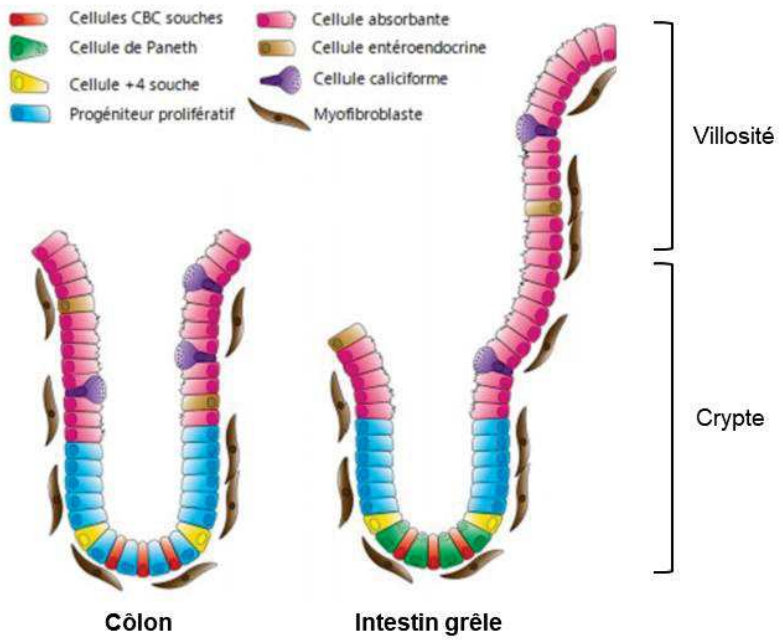


Figure 3 : Organisation de l'épithélium intestinal *(adaptée de Ma et al. 2016*).
L'épithélium intestinal est organisé en crypte et épithélium de surface dans le côlon, et dans l'intestin grêle, il est organisé en axe crypte-villosité. Les différents types cellulaires composant ces épithéliums sont représentés.

C. Carcinogénèse colorectale

1. Etiologie

Les facteurs associés au développement des CCR sont (Haggar et Boushey 2009; Willett 1989) : (i) l'âge (90% des cas surviennent après 50 ans) ; (ii) la présence de polypes rectocoliques qui constitue le principal signal d'alarme ; (iii) les habitudes de vie et alimentaires (alimentation trop calorique et riche en graisse, alcool, tabac, sédentarité) ; (iv) les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), (i.e. maladie de Crohn ou colite ulcéreuse) ; (v) les antécédents familiaux et personnels de cancers. Ainsi les CCR sont, soit d'origine sporadique (85% des cas), soit d'origine héréditaire (15% des cas). Parmi les cancers d'origine héréditaire, on retrouve la polypose adénomateuse familiale (PAF) et le syndrome de lynch également nommé cancer colorectal héréditaire sans polypose (HNPCC) (Cunningham et al. 2010; Eric R. Fearon 2011; Jasperson et al. 2010; Peters, Bien, et Zubair 2015). De manière

intéressante, l'étude de ces CCR a permis la découverte de gènes essentiels pour la physiopathologie colorectale. Par exemple, la PAF est associée à l'inactivation du gène suppresseur de tumeur APC (Adenomatous Polyposis Coli) qui est muté dans 80% des cancers sporadiques. Dans le cas du HNPCC, ce sont les mutations de gènes de réparation de l'ADN (MLH1 ou MSH2, à moindre degré MSH6, PMS2, et sans doute MLH3) qui sont impliquées(Lynch, Smyrk, et Lynch 1996). Il existe d'autres formes héréditaires de CCR plus rares comme le syndrome de Peutz-Jeghers (mutation LKB1), la polypose juvénile de Cowden (mutations PTEN), le syndrome de Turcot's (mutations APC, MLH1, PMS2), ou la PAF atténuée (MUTYH) (Jasperson et al. 2010; Peters, Bien, et Zubair 2015).

2. Progression tumorale colique : du polype au carcinome

Pour assurer son renouvellement, l'épithélium colique maintient un équilibre entre prolifération, différenciation et mort cellulaire. La transformation néoplasique survient lors d'une dérégulation de ces mécanismes au profit de la prolifération cellulaire. L'évolution du CCR est relativement bien caractérisée car ces tumeurs se développent lentement (10-20 ans) et leurs détections/caractérisations s'opèrent par une simple endoscopie (Carethers et Jung 2015). Le CCR représente un modèle typique de cancérogénèse multi-étapes caractérisé par la progression d'un épithélium normal en épithélium hyper-prolifératif puis en adénome et enfin en carcinome pouvant acquérir *in fine* des propriétés invasives.

- Muqueuse normale => Polypes

Au niveau de la muqueuse du côlon, seules les cellules souches, situées à la base des cryptes, sont capables d'auto-renouvellement et d'une prolifération illimitée, contrairement aux cellules différenciées qui meurent au bout de 5 jours environ. Il est donc vraisemblable que ces cellules soient les meilleures candidates pour

l'accumulation de mutations multiples et soient à l'origine de la tumeur colique (Papailiou et al. 2011; Sasikumar et al. 2011). Lorsqu'une mutation initiale se produit, le clone muté acquiert des propriétés migratoires lui permettant de coloniser la base de la crypte prenant ainsi le pas sur les cellules souches non mutées. Ce processus de remplacement des cellules souches initiales est appelé succession de niche. Le clone muté peut alors proliférer dans la muqueuse intestinale donnant naissance aux foyers de cryptes aberrantes (FCA) (Pretlow et al. 1992). A partir de ces foyers, il peut y avoir développement de lésions précancéreuses appellées communément polypes. Ils sont composés de polypes bénins et de polypes néoplasiques. Les polypes non néoplasiques regroupent les polypes hyperplasiques, muqueux, les pseudopolypes inflammatoires, les sous-muqueux et les polypes hamartomateux (Bosman et al. 2010; Walsh 2017). Ils n'évoluent pas vers le cancer sauf dans des rares cas rapportés comme celui hyperplasique et l'hamartome. Les néoplasiques incluent les polypes festonnés et polypes adénomateux, ces derniers représentant les polypes les plus fréquents. Les festonnés regroupent les adénomes dentelés traditionnels (Traditional Serrated Adenomas : TSA) et sessiles (Sessile Serrated Adenoma : SSA) et disposent de caractéristiques moléculaires et morphologiques distinctes des polypes adénomateux conventionnels (Harvey et Ruszkiewicz 2007; Leggett et Whitehall 2010; Rosty et al. 2013).

- Polypes => Carcinomes

Les CCR se développent à partir de la transformation d'un polype de type adénomateux (adénomes) dans 90% des cas et on estime qu'environ 5% de l'ensemble de ces adénomes puissent évoluer en adénocarcinomes (Bosman et al. 2010; Stryker, Carney, et Dozois 1987). Le développement d'un carcinome est d'abord superficiel, strictement intra-épithélial, sans franchissement de la lame basale et est

désigné sous le terme "*in situ*". 95% des adénocarcinomes se développent à partir des glandes de Lieberkühn (adénocarcinomes Lieberkühniens), et dans de rares cas on observe des tumeurs carcinoïdes, des sarcomes, mélanomes ou des lymphomes. Au stade tardif, de nombreux clones issus de ces adénocarcinomes peuvent disséminer pour former des métastases au niveau du foie (75%), des poumons (15%), des os et du cerveau (5%) et du péritoine (Phelip et al. 2014).

3. Mécanismes moléculaires associés à la formation du CCR

Le développement tumoral colorectal correspond à l'accumulation progressive d'altérations génétiques et épigénétiques multiples et séquentielles (Carethers et Jung 2015). Actuellement, l'instabilité génomique est identifiée comme une caractéristique moléculaire centrale qui conduit à l'accrétion d'autres aberrations génétiques responsables de la transformation tumorale dans le CCR. Les CCR sont ainsi classés en 3 types moléculaires distincts : les tumeurs avec instabilité chromosomique (CIN), celles avec un phénotype « CpG island methylator phenotype » (CIMP) et celles caractéristiques d'une instabilité des microsatellites (MSI) dans les séquences répétées en nucléotides (Jass 2007; Worthley et Leggett 2010).

- La voie CIN

Les tumeurs CIN^+ sont les plus fréquentes (70-90%) et sont caractérisées par l'accumulation d'anomalies chromosomiques numériques et structurelles (aneuploïdie) menant à la perte d'hétérozygotie (LOH) (Carethers et Jung 2015; Pino et Chung 2010). La CIN est généralement associée à l'occurrence de mutations perte de fonction du gène suppresseur de tumeur APC, essentiel à l'initiation tumorale. La progression des tumeurs CIN^+ est associée à l'apparition de mutations oncogéniques (KRAS, PIK3CA...), l'inactivation de suppresseurs de tumeur supplémentaires dont DCC ou SMAD4 (*via* la perte du chromosome 18q) et/ou TP53 (*via* la perte du

chromosome 17p ou l'occurrence de mutations somatiques inactivatrices) (Lengauer, Kinzler, et Vogelstein 1997; Pino et Chung 2010). Ce processus par lequel des mutations génétiques s'accumulent au fil du temps provoquant la progression des adénomes en adénocarcinomes invasifs dans le côlon, est maintenant considéré comme la voie canonique "adénome-carcinome" initialement décrite par Fearon et Volgenstein (E. R. Fearon et Vogelstein 1990) **(Figure 4 et Figure 5 en orange)**. A noter que les tumeurs CIN$^+$ sont de mauvais pronostic (Walther, Houlston, et Tomlinson 2008).

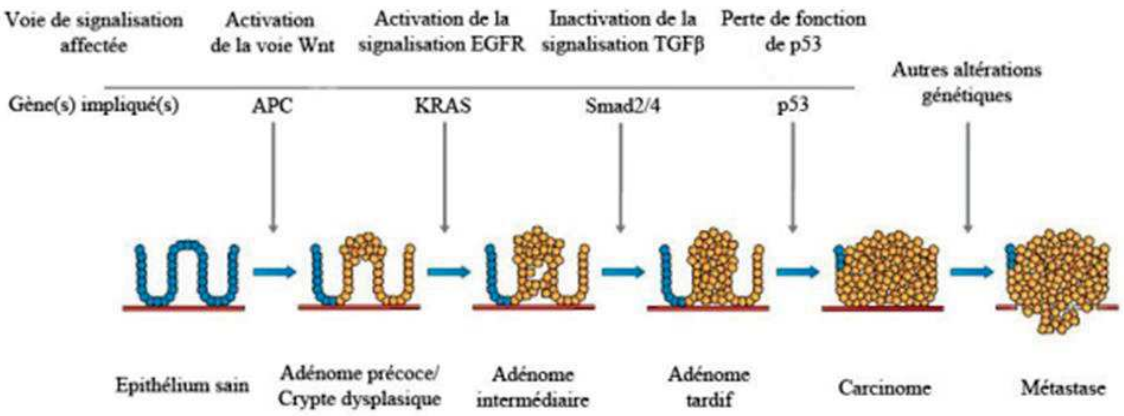


Figure 4 : Modèle de progression des CCR selon Fearon & Volgelestein (*adaptée de Davies, Miller, et Coleman 2005*)
Principaux facteurs génétiques et voies de signalisation impliqués dans la cancérogenèse colorectale**.**

- Tumeurs CIMP

Les tumeurs CIMP$^+$ (10-20% des CCR) (Worthley et Leggett 2010), sont induites par des mutations oncogéniques de KRAS ou BRAF et sont caractérisées par l'hyperméthylation de régions promotrices de gènes suppresseurs de tumeur tels que MLH1. Cette modification épigénétique est largement impliquée dans l'apparition du phénotype MSI des CCR, qui sera discuté ci-dessous. De manière importante, les tumeurs CIN$^+$ proviennent de polypes adénomateux, à l'inverse de ceux dérivant de la

voie CIMP pour lesquels les adénomes dentelés sessiles sont le principal précurseur pathologique **(Figure 5, en vert)** (IJspeert et al. 2015; Jass 2007; Young et al. 2007).

- La voie MSI

Les tumeurs MSI^+ se caractérisent par un défaut du système de réparation des mésappariements des bases de l'ADN (MMR) résultant, soit de mutations perte de fonction dans les gènes MMR, soit d'une hyperméthylation conduisant à une extinction de l'expression du gène MLH1. Les erreurs de réplication ne sont plus reconnues et conduisent à une accumulation de micro-additions et de micro-délétions dans les séquences microsatellites avec des modifications de longueur des séquences codantes conduisant à des protéines non fonctionnelles, dont les suppresseurs de tumeurs APC et TGFβRII. Alors que le syndrome de Lynch provoque la forme pure de CCR MSI^+ **(Figure 5, en bleu)**, la majorité d'entre elles se produisent sporadiquement dans le contexte d'hyperméthylation du promoteur de MLH1. Ces dernières présentent donc à la fois un phénotype $CIMP^+$ et MSI^+, et sont considérées dans ce manuscrit comme faisant partie de la voie CIMP.

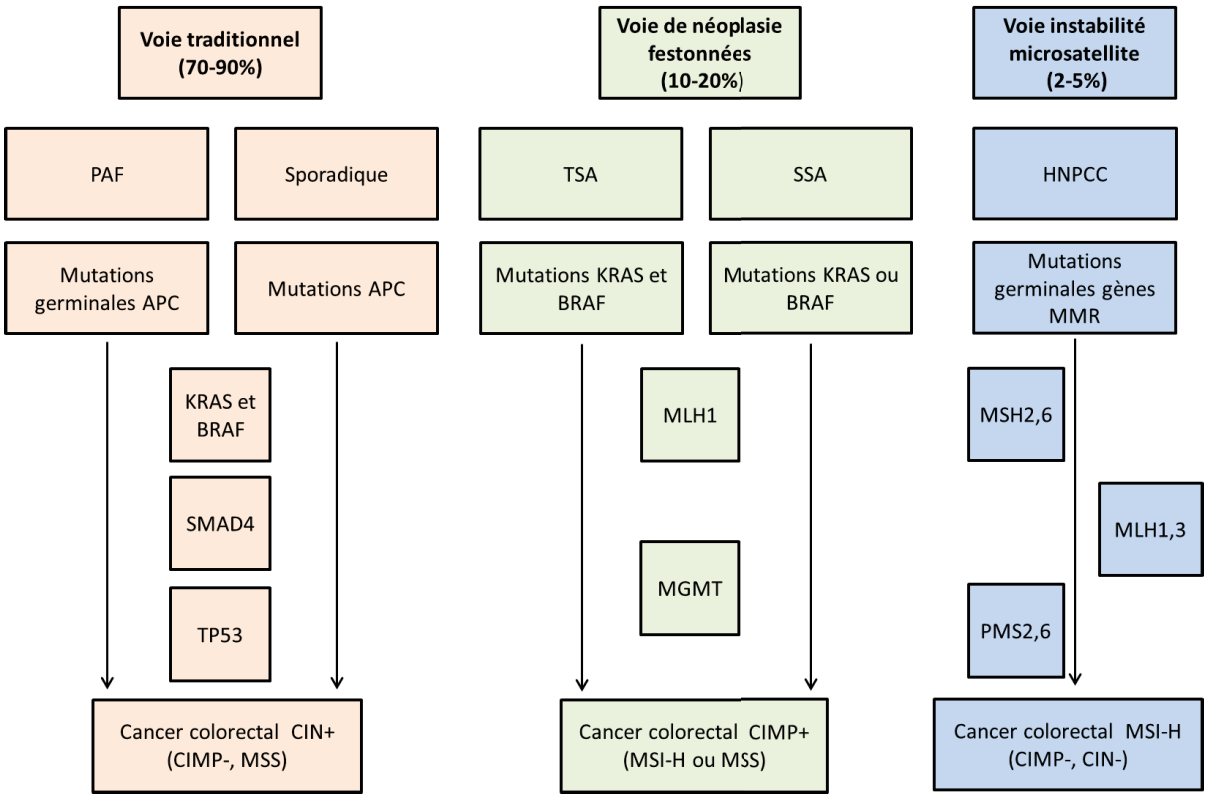


Figure 5 : Aperçu des trois principales voies de la carcinogénèse du côlon (*adaptée de Dekker et al. 2019*).

Une voie classique et conventionnelle (en **orange**) est initiée par des mutations APC et progresse par accumulation séquentielle de mutations génétiques et instabilité chromosomique provoquant des tumeurs CIN^+ et sans instabilité des microsatellites (MSS). La voie de néoplasie (en **vert**) qui est hétérogène, comprenant une voie traditionnelle (TSA) liée aux mutations KRAS/BRAF conduisant à des tumeurs $CIMP^{+/-}$ et MSS, une voie festonnée sessile (SSA) liée à des mutations KRAS ou BRAF avec hyperméthylation de MGMT ou MLH1 conduisant à des tumeurs $CIMP^+$, à forte instabilité des microsatellites (MSI-H). La voie d'instabilité microsatellite pure (en **bleu**) qui est reliée à des mutations germinales des gènes MMR que l'on retrouve dans le syndrome de Lynch se caractérisant par des tumeurs MSI-H, CIN^- et $CIMP^-$.

4. Voies de signalisation impliquées

Le développement des CCR est également associé à la dérégulation des voies de signalisation essentielles à l'homéostasie épithéliale intestinale, dont la voie Wnt/β-caténine, RTK (Receptor Tyrosine Kinase), p53 et TGFβ (Transforming growth factor bêta).

4.1. La voie Wnt

Wnt est un facteur essentiel de l'homéostasie et de la régénération de l'épithélium intestinal, *via* l'activation de la protéine de signalisation β-caténine **(Figure 6)** (Clevers et Nusse 2012; Kretzschmar et Clevers 2017). La β-caténine est un régulateur clé de l'adhésion cellulaire *via* sa liaison à l'E-cadhérine (Peifer et al. 1992; Rubinfeld et al. 1995). Dans le cytoplasme, la β-caténine est dégradée par le protéasome *via* le complexe Axin/APC/GSK3-β (Glycogène synthétase Kinase 3 bêta) (Stamos et Weis 2013). La liaison de Wnt à son récepteur et ses corécepteurs LRP 5/6 (Low density lipoprotein Receptor-related Protein) induit la dissociation de β-caténine à ce complexe et sa stabilisation dans le cytoplasme (Nusse 2012). Son accumulation au noyau permet l'expression de gènes de prolifération (i.e. Myc, Cycline D) *via* sa liaison avec les facteurs de transcription de la famille TCF/LEF (T-cell factor/Lymphoid enhancer factor) (Novellasdemunt, Antas, et Li 2015). L'hyperactivation de cette voie de signalisation est essentielle à l'initiation et la progression tumorales colorectales (Schneikert et Behrens 2007). Elle est dérégulée dans plus de 90% des CCR, essentiellement suite à la perte de fonction du suppresseur de tumeurs APC (80% des CCR) (Näthke 2004). D'autres composants de cette voie sont également retrouvés dérégulés dans ces tumeurs, dont des mutations oncogéniques de la β-caténine elle-même (5-10%) (Morin et al. 1997) ou des mutations inactivatrices de l'Axine (Salahshor et Woodgett 2005).

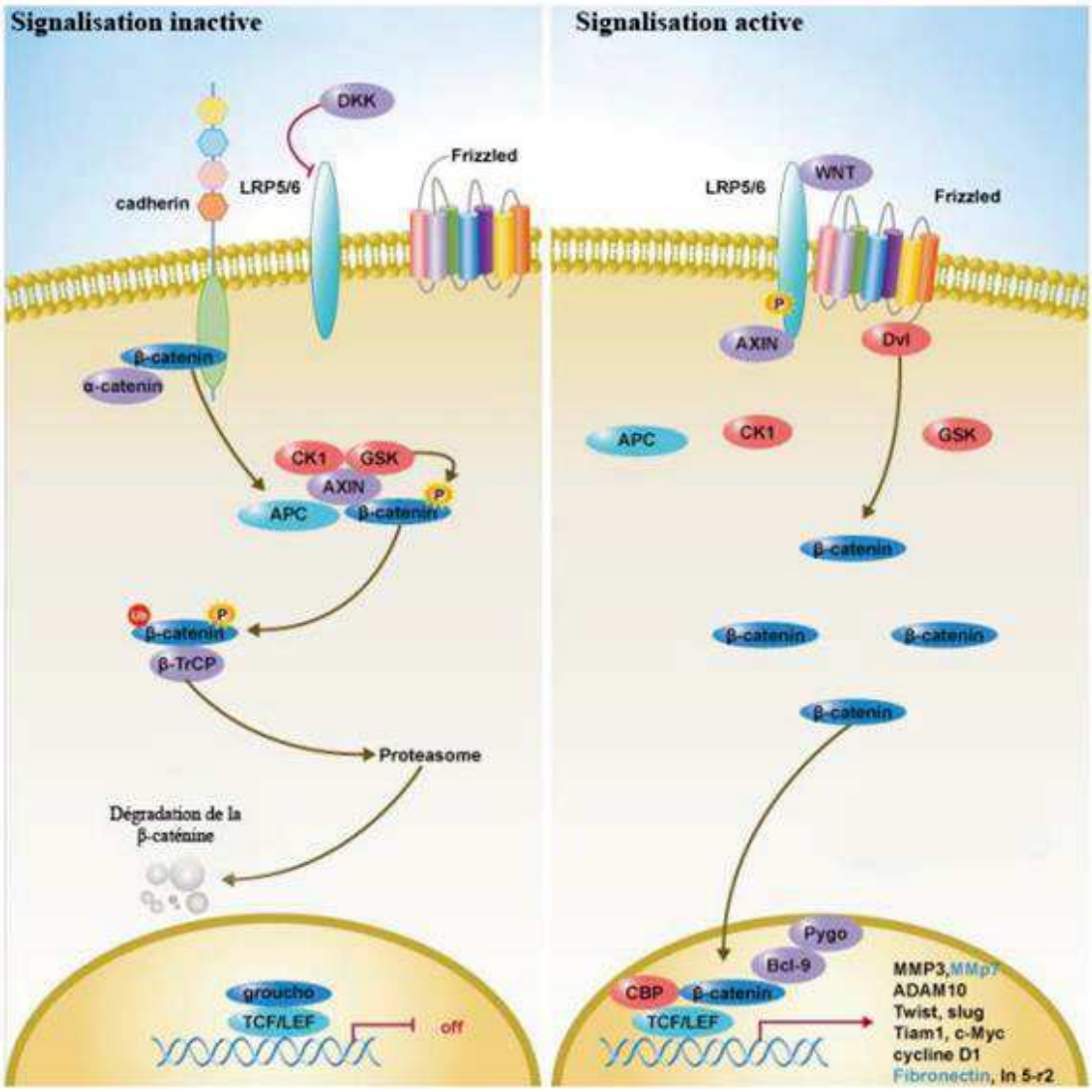


Figure 6 : Voie de signalisation Wnt/β-caténine canonique (*adaptée de old.sinobiological.com).*
En l'absence de ligand **(à gauche)**, la β-caténine est séquestrée dans un complexe APC/Axin/GSK3β/CK1 qui permet sa phosphorylation entraînant sa dégradation par le

4.2 Les voies EGFR, Ras/MAPK, PI3K/AKT

Le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) et ses voies de signalisation en aval tel que Ras/Raf/MAPK et PI3K/AKT régulent la prolifération des cellules épithéliales progénitrices et la dérégulation de cette voie joue un rôle important dans la progression du CCR *via* la dérégulation de la survie, de la prolifération et de la dissémination des cellules tumorales épithéliales **(Figure 7)**. L'une des causes de la suractivation de ces voies de signalisation dans le CCR est la surexpression de

l'EGFR, retrouvée dans 25% à 82% des CCR (Spano et al. 2005). Par ailleurs, les composants de cette voie, dont KRAS, BRAF et PIK3CA sont fréquemment dérégulés suite à des mutations somatiques activatrices. Par exemple, des mutations KRAS surviennent dans environ 40% des cas, en particulier dans l'exon 2 au niveau des codons 12 (70–80%) et 13 (15–20%) (Markowitz et Bertagnolli 2009). De manière surprenante, l'activation oncogénique de KRAS seule ne suffit pas à induire des adénocarcinomes dans le côlon (Haigis et al. 2008). Il faut l'association de l'inactivation d'APC pour obtenir cette transformation maligne, suggérant que KRAS n'est pas impliqué dans l'initiation tumorale mais qu'il participe à la progression tumorale. Des mutations de BRAF (BRAF V600E dans 90% des cas) surviennent dans 13 à 78% des CCR MSI^+ contre seulement 5-8% des CCR CIN^+ (Thiel et Ristimäki 2013). Enfin, les mutations de NRAS existent mais n'ont été rapportées que dans seulement 2,5 à 4,5% des CCR (Takane et al. 2017). Le statut KRAS et BRAF est critique pour les oncologues, car il constitue une valeur prédictive de la résistance/efficacité aux thérapies anti-EGFR (Lièvre et al. 2008). Enfin, la voie PI3K-AKT est fréquemment dérégulée par des mutations activatrices dans le gène PIK3CA (25% des CCR) (Samuels et al. 2004; Whitehall et al. 2012) ou par inactivation épigénétique de PTEN (Phosphatase and tensin homolog), un régulateur négatif important de l'activité PI3K (Carethers et Jung 2015). Comme pour les mutations KRAS et BRAF, elles prédisent également la résistance au traitement par anticorps anti-EGFR (Frattini et al. 2007).

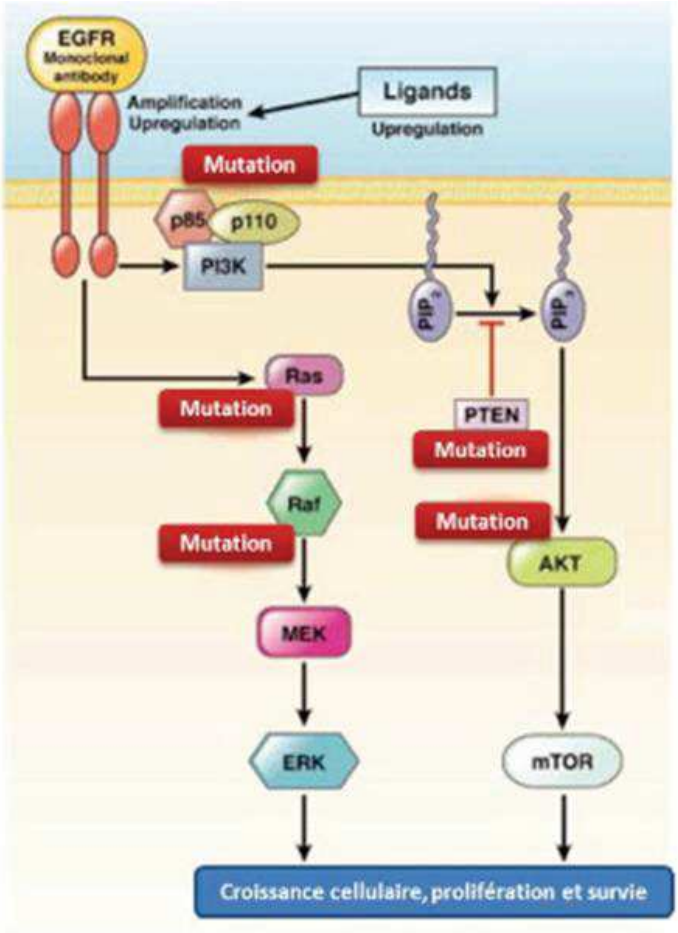


Figure 7 : Dérégulations connues des voies de signalisation de l'EGFR dans le CCR (*Flodrops, 2019).*
De nombreux gènes codant pour les protéines des voies de signalisation RAS/RAF/MAPK et PI3K/AKT sont mutés dans les CCR. Ces dérégulations induisent une augmentation de la croissance et de la prolifération cellulaires. La surexpression du récepteur EGFR et de ses ligands sont d'autres mécanismes concourant à cette dérégulation.

4.3. La voie p53

Le gène TP53 code pour la protéine p53 qui non seulement agit comme « gardienne du génome » dans les cellules normales (Lane 1992), mais aussi en tant que suppresseur de tumeur dans les cellules cancéreuses. Il n'est donc pas étonnant que ce gène soit le plus muté dans les cancers humains. L'inactivation de TP53 entraîne la progression tumorale, permettant une prolifération cellulaire excessive. En ce qui concerne le CCR, TP53 est retrouvé muté dans ~60% des cas, ce qui est généralement associé au passage de l'adénome au carcinome invasif (Baker et al.

1990; Eric R. Fearon 2011; Kanthan, Senger, et Kanthan 2012). Il est à noter que des mutants TP53 « gain de fonction » existent et interviennent dans la reprogrammation métabolique tumorale, ce qui favorise la progression et l'invasion tumorale (H. Li et al. 2019).

4.4. La voie TGFβ

La voie de signalisation TGFβ est impliquée dans le contrôle de plusieurs processus biologiques dont l'apoptose, la prolifération, la différenciation, la migration et l'adhésion cellulaire (Schuster et Krieglstein 2002). Dans le côlon, il a été rapporté que la signalisation du TGFβ réduit la prolifération des cellules épithéliales et favorise l'apoptose et la différenciation (Jung, Staudacher, et Beauchamp 2017). Ainsi, dans les tissus normaux colorectaux ou les CCR précoces, la voie du TGFβ sert de suppresseur de tumeur en inhibant la prolifération et l'immortalisation cellulaires et en induisant l'apoptose ; par conséquent, l'inactivation de la voie TGFβ, fréquemment observée, favorise la tumorigenèse colorectale (Z. Jiang et al. 2019; Massagué 2008). Cependant, au fur et à mesure que les tumeurs se développent et progressent, les effets suppresseurs de tumeur de la voie TGFβ sont souvent perdus. Au cours des derniers stades de la carcinogénèse colorectale, TGFβ est fortement exprimé et devient oncogénique, son activation favorise alors la progression du cancer, l'invasion et les métastases.

5. Tumeurs du côlon droit *vs* côlon gauche

Les tumeurs de CCR peuvent théoriquement se développer dans n'importe quel segment du côlon. En fonction de la localisation anatomique de la tumeur, les CCR se comportent différemment en termes de progression de la maladie et de survie globale, ce qui influence grandement le pronostic et la prise en charge du patient (chirurgie, traitements médicamenteux…). Les tumeurs du côlon droit (regroupant le caecum, le

côlon ascendant et les deux tiers proximaux du côlon transverse) et du côlon gauche (le tiers distal du côlon transverse, le côlon descendant et le côlon sigmoïde) présentent des caractéristiques moléculaires et histologiques différentes **(Figure 8)** (Baran et al. 2018). Celles du côté droit présentent généralement un phénotype MSI-H et CIMP et ont une histologie plate, dû à la présence de polypes adénomes festonnées sessiles, qui est difficile à détecter précocement. Les tumeurs du côté gauche, disposent de mutations liées à la voie CIN, telles que les mutations KRAS, APC, PIK3CA, TP53 et présentent une morphologie de type polyploïde, les rendant beaucoup plus facile à détecter par coloscopie. De plus, la localisation anatomique du CCR joue un rôle clé dans le contexte métastatique. Alors que les tumeurs du côlon gauche induisent préférentiellement des métastases hépatiques et pulmonaires, les patients présentant des tumeurs du côlon droit développent une carcinose péritonéale, qui est considérée comme le pronostic le plus sévère.

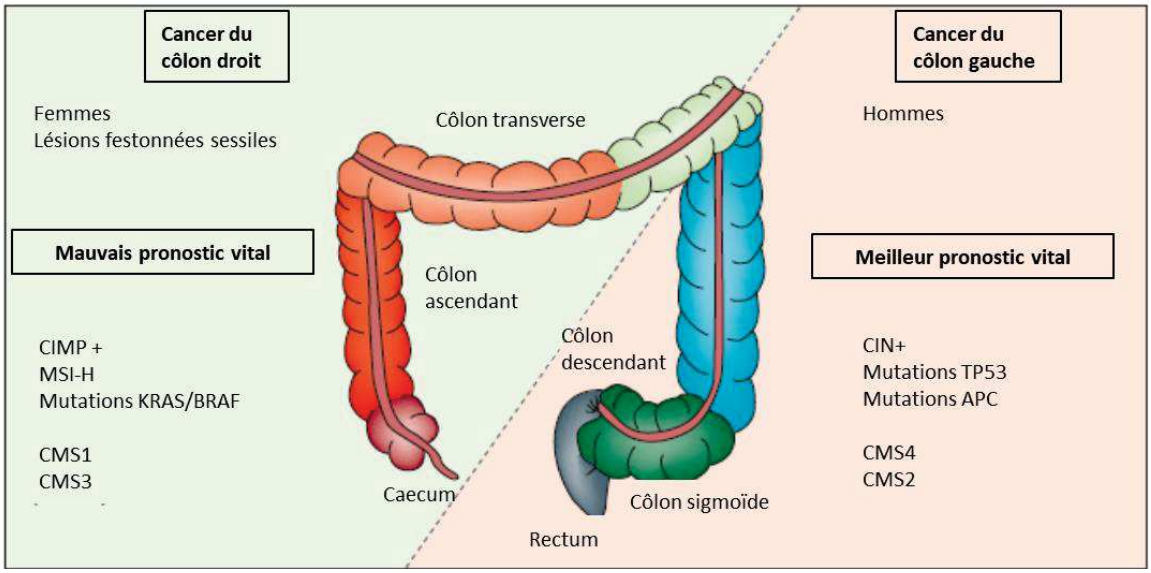


Figure 8 : Représentation des différences entre cancer du côlon droit vs côlon gauche (*adaptée de Dekker et al. 2019*).
Note : Le pronostic délétère du cancer du côlon droit ne s'applique pas à tous les stades du cancer et est principalement observé dans un contexte métastatique en ce qui concerne la réponse aux traitements anti-EGFR.

D. Classification du CCR

1. Classification histologique

Le facteur pronostique majeur des CCR est le stade histologique de la tumeur qui regroupe 3 notions : le degré d'envahissement de la paroi intestinale par la tumeur, l'envahissement ganglionnaire et la présence ou non de métastases à distance. Ces notions permettent la classification des CCR dans l'optique d'améliorer la prise en charge des patients. Historiquement, la première classification du CCR a été établie par Dukes en 1932 (Sarma 1986). Puis en 1987, l'UICC (Union Internationale Contre le Cancer) a proposé la classification internationale pTNM (pathology Tumor Node Metastasis). Cette classification a été réalisée en accord avec l'American Joint Comitte for Cancer Staging (AJCC). Elle est à ce jour régulièrement révisée. La classification actuellement utilisée correspond à la 8ème édition **(Tableau 1)** (Amin et al. 2017) :

(i) Classification de Dukes :

- Stade A : Atteinte de la muqueuse ou de la sous-muqueuse ou de la musculeuse.

- Stade B : Atteinte de la sous-séreuse ou de la séreuse voir au-delà.

- Stade C : Envahissement ganglionnaire.

- Stade D : Métastases.

(ii) Classification TNM :

TNM	Stade	Description clinique
T	x	Renseignements insuffisants pour classer la tumeur primitive
	0	Pas de signe de tumeur primitive
	is	In situ
	1	Atteinte de la sous-muqueuse.
	2	Atteinte de la musculeuse.
	3	Atteinte de la sous-séreuse, de la séreuse ou de la graisse péricolique.
	4	Tumeur envahissant directement d'autres organes ou d'autres structures
	4a	Tumeur perforant le péritoine viscéral
	4b	Tumeur envahissant directement d'autres organes ou d'autres structures
N	x	Renseignements insuffisants pour classer les ganglions lymphatiques régionaux
	0	Pas de métastases ganglionnaires lymphatiques régionales
	1	Présence de métastases dans ganglions lymphatiques régionaux
	1a	1 seul ganglion lymphatique régional
	1b	2 à 3 ganglions lymphatiques régionaux
	2	4 ou plus ganglions lymphatiques régionaux atteints
	2a	4 à 6 ganglions lymphatiques régionaux
	2b	7 ou plus ganglions lymphatiques régionaux
M	0	Pas de métastase
	1	Présence de métastases
	1a	Métastases dans 1 seul organe
	1b	Métastases dans plus d'1 organe ou dans le péritoine.
	1c	Métastases dans le péritoine avec ou sans atteinte d'un autre organe

Tableau 1 : Huitième édition de la classification TNM des lésions cancéreuses colorectales

A partir de la classification du TNM, les CCR sont classés en quatre stades selon l'UICC **(Tableau 2)** :

Stade	Classification TNM			Survie à 5 ans (%)
0	Tis	N0	M0	
I	T1	N0	M0	93
	T2	N0	M0	
II	T3	N0	M0	85
	T4	N0	M0	72
III	T1-T2	N1	M0	83
	T3-T4	N1	M0	54
	Tout T	N2	M0	44
IV	Tout T	Tout N	M1	8

Tableau 2 : Correspondance entre la classification TNM, le stade colorectal et la survie à 5 ans

2. Classification moléculaire

Plus récemment, un consortium international d'experts a établi une classification moléculaire à partir des données génomiques de 4 000 patients. Cette classification appelée CMS (Consensus Molecular Subtype) regroupe 4 classes de tumeurs suivant leurs caractéristiques épigénomiques, transcriptomiques, microenvironnementales, génétiques, pronostiques et cliniques **(Figure 9)** (Guinney et al. 2015). À ce jour, la signature génomique de chaque sous-groupe s'est avérée avoir des implications cliniques en tant qu'outil précieux pour prédire le pronostic des patients et pour déterminer la meilleure stratégie de traitement pour chaque patient en fonction du sous-type tumoral (Fessler et Medema 2016).

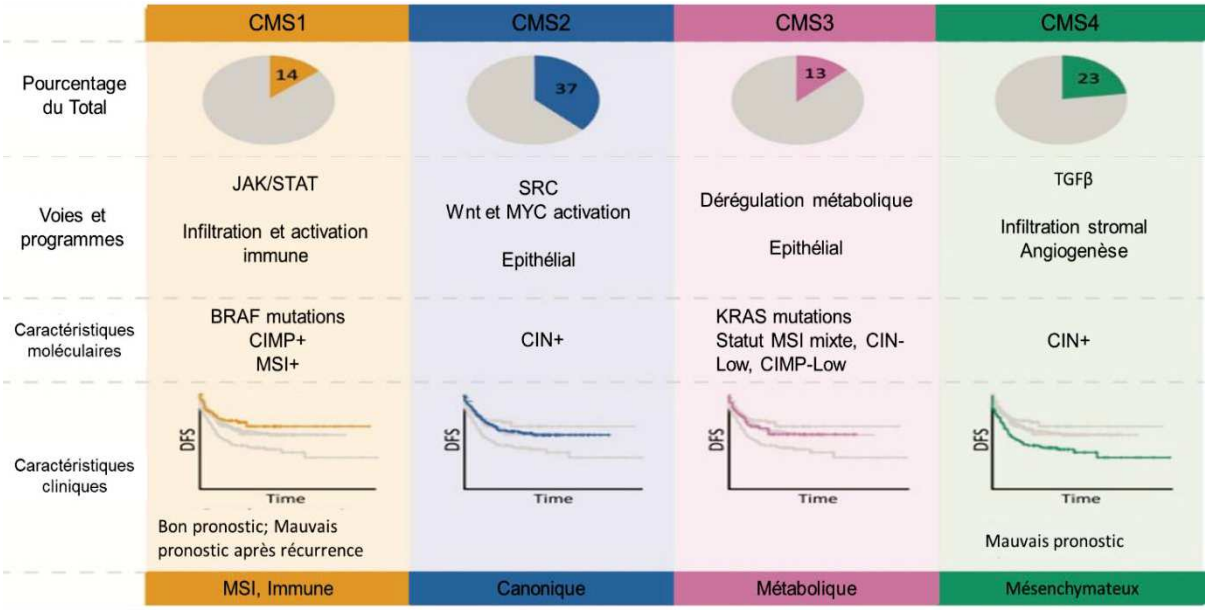


Figure 9 : Caractéristiques clés de la classification CMS *(adaptée de Fessler et Medema 2016).*

- Le groupe CMS-1 (MSI, « Immune ») : Il représente 14% des CCR et se caractérise par des tumeurs MSI^{+}, une infiltration immune marquée (car ces tumeurs portent plus de mutations immunogènes et abritent un nombre accru de néo-antigènes), un phénotype CIMP élevé et concerne la majorité des tumeurs mutées BRAF. La caractéristique principale de ce sous-type est le changement du programme métabolique. La localisation est préférentiellement au niveau du côlon droit. Leur pronostic est généralement bon en l'absence de métastase. Les récidives et l'évolution métastatique sont rares. Cependant, les rechutes sont de très mauvais pronostic.

- Le groupe CMS-2 (« Canonique ») : Il représente 37% des CCR localisés préférentiellement au niveau du côlon gauche et présente une dérégulation des voies EGFR, SRC, Wnt/Myc. Ces tumeurs présentent une forte instabilité chromosomique (CIN élevé) et sont généralement MSS. Leur pronostic est intermédiaire.

- Le groupe CMS-3 (« Métabolique ») : Il représente 13% des CCR, de type épithélial, caractérisé par des mutations KRAS fréquentes, un phénotype CIMP modéré et un

statut MSI mixte. Les tumeurs sont réparties de manière assez homogène entre le côlon gauche et le côlon droit. Leur pronostic est intermédiaire.

- Le groupe CMS-4 (« Mésenchymateux ») : Il représente 20% des CCR. Les tumeurs sont caractérisées par une infiltration stromale et une angiogenèse importante qui sont associées à de nombreuses altérations somatiques, une activation fréquente de la voie du TGFβ, et une transition épithelio-mésenchymateuse (EMT) significative comparativement aux autres sous-types de CCR. Ce sont des tumeurs CIN^+ du côlon distal qui sont majoritairement diagnostiquées à des stades avancés et sont de mauvais pronostic.

Il est important de mentionner que cette classification représente plus de 80% des tumeurs CCR analysés et les 20% restant pourraient représenter des phénotypes mixtes : phénotypes en transition ou encore le reflet d'une hétérogénéité intratumorale.

E. Traitement des CCR

Le traitement du CCR a progressé rapidement au cours des dernières décennies, en particulier pour la maladie avancée. Cependant, les résultats varient largement en fonction des caractéristiques moléculaires spécifiques à la tumeur, de sa localisation et des caractéristiques des patients. Les décisions de traitement sont prises par les patients avec leur médecin après avoir examiné les meilleures options disponibles après analyse des caractéristiques tumorales ainsi que des risques et des avantages associés.

- Stade précoce :

Lorsque le diagnostic est suffisamment précoce (CCR de stade I et II), l'ablation chirurgicale de la tumeur est souvent curative et généralement le seul traitement

nécessaire (Lecomte et al. 2019). Le traitement adjuvant n'est pas indiqué pour la plupart des patients, souvent non associé à une amélioration de la survie par rapport à la chirurgie seule. Si le cancer s'est propagé aux ganglions lymphatiques voisins, la résection chirurgicale est généralement suivie d'une chimiothérapie, concernant ainsi des patients atteints d'un CCR de stade III ou à haut risque de stade II. La chimiothérapie adjuvante standard consiste le plus souvent en l'utilisation de fluoropyrimidine (5-FU) associée à l'acide folinique (Leuvotrin, LV) en combinaison à de l'oxaliplatine (protocole FOLFOX). L'utilisation de capécitabine associée à de l'oxaliplatine (protocole CAPOX ou XELOX) est devenu également un protocole standard (Lecomte et al. 2019).

- Stade tardif :

Au stade tardif, le cancer est métastatique avec une colonisation du foie, des poumons ou du péritoine. S'il n'y a que quelques métastases au foie ou aux poumons, les tumeurs (primaires et métastatiques) sont enlevées par chirurgie. Mais le traitement de référence du CCR de stade IV, consiste le plus souvent en une combinaison de chimiothérapie de type FOLFOX, FOLFIRI (5-FU, LV, Irinotecan) ou FOLFOXIRI (5-FU/LV, Oxaliplatine, Irinotecan) associée ou non à des thérapies ciblées (Phelip et al. 2014). Des anti-angiogéniques, tels que le bevacizumab ou le ramucirumab qui ciblent respectivement le VEGF et son récepteur VEGFR2, peuvent être ajoutés aux chimiothérapies FOLFIRI ou FOLFOX pour les patients atteints de CCR métastatique recevant un traitement de première ligne. En outre, la caractérisation moléculaire des tumeurs est cruciale car les porteurs de certaines mutations ne répondent pas à certaines thérapies ciblées. Pour exemple, la thérapie ciblée anti-EGFR (cetuximab, panitumumab) améliore la survie des patients avec une tumeur non-mutée pour les éléments de la voie MAPK (i.e. statut KRAS). Par contre, ces anticorps n'auront pas

d'activité anti-tumorale significative pour les tumeurs avec des mutations dans la voie Ras/MAPK (CCR CMS3). L'apport de l'immunothérapie de nouvelle génération reste limité dans le CCR en raison d'une très faible infiltration immunitaire. Néanmoins, les inhibiteurs de checkpoints immunitaires ont démontré une efficacité remarquable dans environ la moitié des patients atteints de CCR métastatiques MSI-H (CMS1, type immun, seulement ≈10% des cas). Ainsi, récemment la FDA a approuvé deux anticorps bloquant l'immune checkpoint PD1 (le pembrolizumab et le nivolumab) et un inhibiteur bloquant CTLA-4 (l'ipilimumab) **(Figure 10)**. En revanche, pour environ 90% des patients qui ont des tumeurs MSS, les traitements d'immunothérapie ont une activité extrêmement limitée. La recherche de nouvelles cibles et de nouvelles combinaisons de traitements permettant de sensibiliser les tumeurs MSI résistantes et les tumeurs MSS aux inhibiteurs de checkpoints immunitaires paraît donc de toute première importance. Récemment, un nouvel inhibiteur multikinase a été approuvé pour le traitement des CCR métastatiques réfractaires, le régorafénib.

Malheureusement, à ce jour l'efficacité des thérapies ciblées dans le CCR métastatique est relative et souvent limitée dans le temps. Il existe un besoin évident de nouvelles cibles thérapeutiques ou de combinaison de thérapies pour réduire la progression métastatique et l'évasion immunitaire.

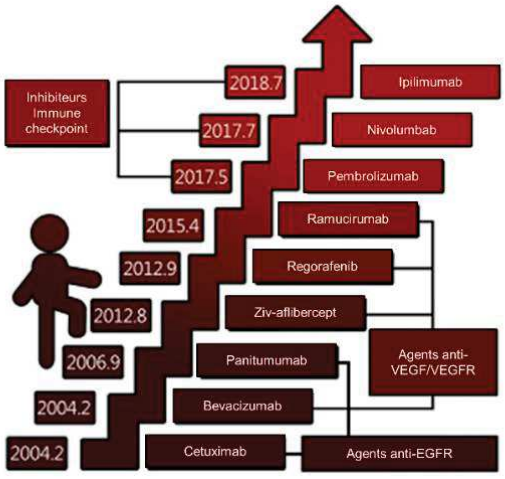


Figure 10 : Agents ciblés approuvés par la FDA dans le CCR.

II. Les protéines kinases dans le CCR

La phosphorylation des protéines est le type de modification post-traductionnelle le plus largement représenté dans la signalisation cellulaire. Elle est effectuée par une famille de protéine appelée protéine kinase (PK). La famille des gènes codant pour ces protéines est la plus importante en nombre chez les cellules eucaryotes (soit environ 1,7% du génome humain, codant pour 518 PK) (Manning et al. 2002). L'importance de ces modifications post-traductionnelles devient évidente si l'on considère que les PK peuvent phosphoryler plus de 30% des protéines. En accord avec cette notion, la phosphorylation des protéines contrôle les processus cellulaires essentiels comme la prolifération, la migration, la survie ou le devenir cellulaires (Cohen 2001). Par conséquent, il n'est pas surprenant que la dérégulation de ces PK soit impliquée dans de nombreuses pathologies, dont le cancer. J'évoquerai brièvement dans ce chapitre la classification des PK et leurs fonctions biologiques avant d'introduire plus spécifiquement SRC et mTOR, qui ont fait l'objet de mon travail de thèse.

A. Généralités

1. Fonctions

Les PK sont des enzymes du groupe des transférases catalysant le transfert d'un γ-phosphate, provenant d'une molécule d'ATP (Adénosine TriPhosphate) ou plus rarement de GTP (Guanosine TriPhosphate), sur un acide aminé accepteur dans une protéine substrat cible **(Figure 11)**. Ce processus, appelé phosphorylation, peut induire des changements conformationnels de la protéine substrat, entraînant la perturbation ou la création de surfaces d'interaction protéine-protéine, ayant pour effet

la modification de l'activité, de la localisation cellulaire ou encore de l'habilité des protéines cibles à réagir avec d'autres molécules, conduisant alors à la régulation des voies de transduction du signal dans le cytoplasme et le noyau. La réaction inverse, la déphosphorylation, est quant à elle assurée par des protéines phosphatases **(Figure 11)**. Ces réactions de phosphorylations/déphosphorylation sont des modifications rapides et réversibles qui permettent une régulation fine et dynamique des voies de signalisation. Ainsi, l'activation des gènes et la réponse cellulaire subséquente sont contrôlées par le travail coordonné des PK « Writer », des phosphatases « Eraser » et de la phosphorylation de leurs substrats « Reader ».

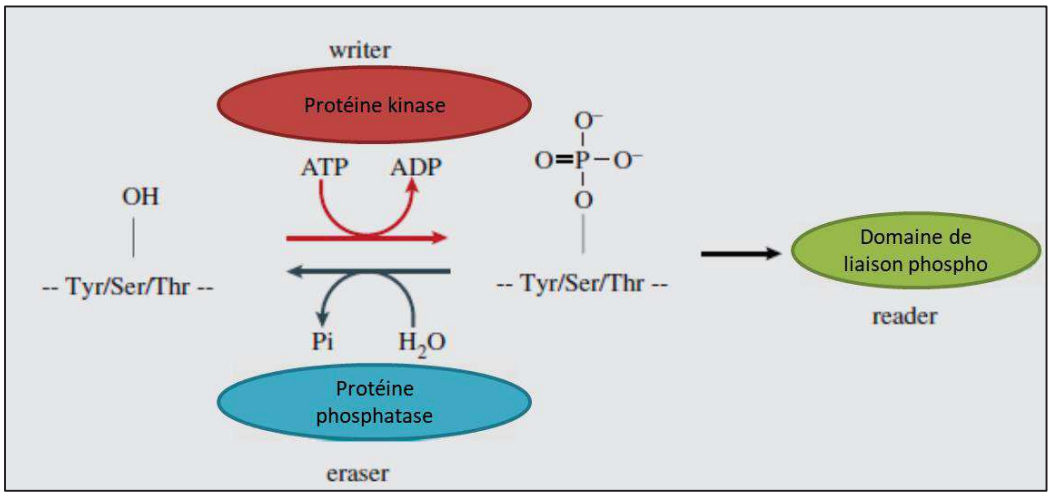


Figure 11 : Représentation schématique du mode d'action des protéines kinases.

2. Classification

Les PK ont été identifiées par le projet « kinome humain » à partir des entrées présentes dans les bases de données génomiques et protéiques (Manning et al. 2002). L'analyse des similarités des séquences et des structures de leurs domaines catalytiques, a permis de dresser une première classification et ainsi de diviser les PK en deux super-familles nommées respectivement « ePK » pour PK eucaryotes typiques et « aPK » pour PK eucaryotes atypiques (Hanks, Quinn, et Hunter 1988). Au

nombre de 478, les ePK présentent une forte homologie de séquence au niveau de leurs domaines catalytiques. Les aPK sont moins nombreuses (40) et ne présentent pas de similarité avec le domaine kinase des ePK (Tableau 3). Les ePK partagent un domaine catalytique anionique d'environ 250 acides aminés, constitué d'un petit lobe N-terminal de feuillets β et d'un grand lobe C-terminal d'hélices α contenant un site de liaison à l'ATP. Les deux domaines étant séparés par un fragment liant l'ensemble appelé boucle catalytique ou « linker ». En fonction de leurs homologies de séquence, de leurs domaines catalytiques, de la structure de leurs régions N- et C-terminales, de leurs fonctions biologiques et de l'existence d'une classification précédemment établie chez les PK de levure, de C. elegans et de drosophile, les PK humaines sont classées en 9 groupes, 134 familles et 201 sous-familles, comme présenté dans le **tableau 3**.

Super-familles	Groupes	Origine du nom	Familles	Sous-familles	Kinases de levures	Kinases de C.elegans	Kinases de drosophile	Kinases humaines	Exemples de kinases humaines
ePK	AGC	PKA/PKG/PKC kinases group	14	21	17	30	30	63	PKB, PKA, PKC, PKG
	CAMKIIKI	Calcium/Calmodulin regulated kinases group	17	33	21	46	32	74	CAMKL, CAMKII, PDK
	CKI	Casein kinase 1 group	3	5	4	85	10	12	CKI, TTBK, VRK,
	CMGC	CDK/MAPK/GSK3/CLK kinases group	8	24	21	49	33	61	CDK5, ERK1, DYRK1A, GSK3
	STE	Yeast STE-like MAPK kinases group	3	13	14	25	18	47	MAP2K, MAP3K, MAP4K
	TK	Tyrosine kinases group	30	30	0	90	32	90	TrkA, FGFR, SRC
	TKL	Tyrosine kinases-like group	7	13	0	15	17	43	LRRK, MLK, STRK
	RGC	Receptor Guanylate Cyclase group	1	1	0	27	6	5	GCA, GC2D, GC2F
	Other	Other ePK kinases	37	39	38	67	45	83	CAMKK, PLK, AUR
aPK	Atypical	Atypical protein kinases	14	22	15	20	17	40	HistK, BCR, PDHK
Total			134	201	130	454	240	518	

Tableau 3 : Résumé de la classification des protéines kinases eucaryotes.

Comme la plupart des PK ont plusieurs substrats, les PK ont été classées également en fonction de la nature de l'acide aminé récepteur du γ-phosphate d'ATP plutôt que de leur spécificité du substrat protéique. En particulier, chez les eucaryotes, 2 grands groupes sont généralement évoqués et décrits dans la littérature scientifique en raison

de leurs rôles clés dans la régulation de la plupart des activités cellulaires et leurs implications physiopathologiques :

- Les protéines sérine/thréonine kinases (PSTK). Ces protéines ciblant des résidus sérine ou thréonine représentent 80 % du kinome humain, un fait qui se reflète dans la fréquence du rapport de la phosphorylation au niveau cellulaire (pSer : pThr : pTyr = 1 000 : 100 : 1).

- Les protéines tyrosine kinases (PTK). Les PTK jouent un rôle essentiel dans la signalisation intracellulaire régulée par la phosphorylation des protéines sur tyrosine. Ce mécanisme de signalisation a émergé avec l'apparition des organismes multicellulaires, sans doute pour coordonner l'activité cellulaire au sein de ces organismes (King et Carroll 2001). Ce processus est extrêmement régulé comme le montre le faible niveau de phosphorylation basal des protéines sur tyrosine (seulement 2 à 3% de la phosphorylation totale des protéines). Depuis la découverte de SRC (Hunter et Sefton 1980), le premier oncogène et la première PTK, on dénombre 90 PTK chez l'Homme, qui sont réparties en deux sous-familles : les RTK et les tyrosines kinases cytoplasmiques (CTK) **(Figure 12)**.

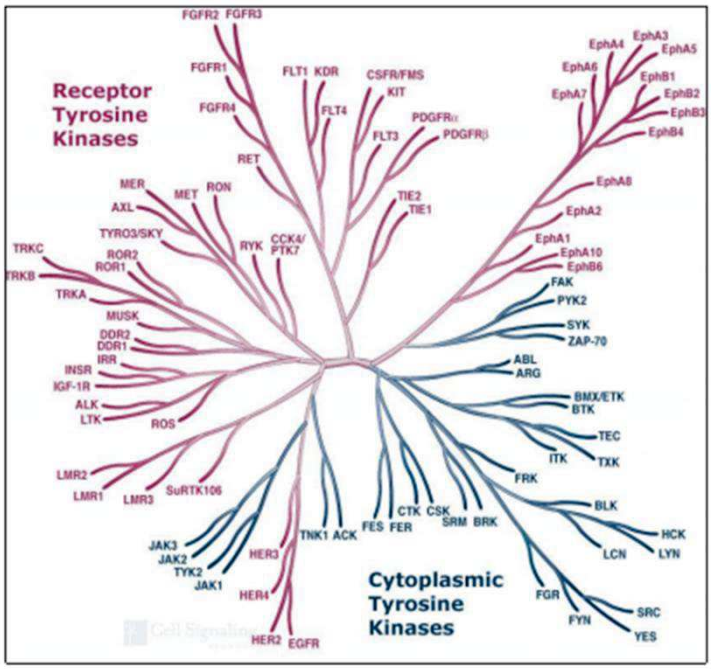


Figure 12 : Dendrogramme du tyrosine kinome humain (*d'après Cell Signaling Technology).*

B. Les CTK de la famille de SRC dans le CCR

1. Généralités

Les CTK sont composées de 32 membres distribués en 10 sous-familles suivant leur organisation structurale **(Figure 13)** (Blume-Jensen et Hunter 2001). La plus grande de ces sous-familles est celle des CTK de la famille SRC (SFK). Le prototype des SFK est v-SRC, le produit transformant du rétrovirus aviaire RSV (Hunter et Sefton 1980). Le gène v-src est une forme mutée et activée du gène cellulaire normal, c-src, qui code pour une protéine possédant une activité tyrosine kinase. La famille des SFK est composée de 8 membres chez les mammifères : SRC, Lck, Hck, Fyn, Blk, Lyn, Fgr et Yes. SRC, Fyn et Yes présentent une expression largement ubiquitaire et sont en général co-exprimés dans les mêmes types cellulaires. Bien qu'initialement décrit comme spécifique des cellules hématopoïétiques, Lyn présente également une large distribution tissulaire. En revanche, les autres membres de la famille (Hck, Fgr, Blk, Lck) ont une expression tissulaire plus restreinte, généralement hématopoïétique (Martellucci et al. 2020). J'illustrerai donc le rôle des SFK dans les grandes fonctions physiologiques par l'exemple de SRC en présentant sa structure, sa régulation et ses fonctions, avec l'exemple de l'intestin.

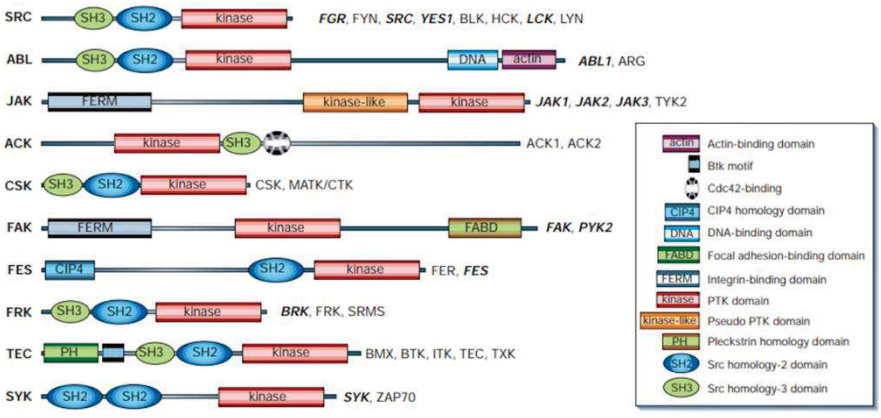


Figure 13 : La famille des CTK (*adaptée de Blume-Jensen et Hunter 2001).*
Les 32 CTK sont réparties en fonction de leur structure en 10 sous-familles représentées schématiquement sur cette figure. Les membres de chaque famille sont indiqués à droite et le nom de la famille à gauche. Les domaines structuraux sont identifiés dans l'encart de droite.

2. Structure

Les SFK partagent une structure modulaire commune constituée d'un domaine N-terminal ou SH4, un domaine unique suivi des domaines SH3 et SH2, un interdomaine ou *linker*, un domaine catalytique SH1 et une queue C-terminale **(Figure 14)** (Yeatman 2004).

- SH4 : Cette région est composée de 15 à 17 acides aminés importants pour la localisation subcellulaire. Ce domaine possède un site de myristoylation, le résidu glycine en position 2, permettant l'adressage des protéines à la membrane (Resh 1999). La localisation des SFK à la membrane plasmique est essentielle pour leur fonction (Thomas et Brugge 1997), comme montré pour l'activité transformante de v-SRC. Cependant, l'énergie fournie par le myristate est insuffisante (approximativement 10^{-4} M K_d) pour stabiliser leur association avec la bicouche lipidique (Resh 1999). L'association à la membrane est ainsi renforcée par un ou deux résidus cystéines palmitoylés, à l'exception de SRC et Blk. Dans ce cas, la stabilisation de ces deux enzymes est renforcée par des résidus basiques environnants (lysines et arginines), qui grâce à leur charge positive engagent des interactions électrostatiques avec les phospholipides membranaires chargés négativement. Cette différence d'interaction avec la membrane doit être à l'origine de différence de localisation subcellulaire entre les SFK.

- Domaine unique : ce domaine d'environ 80 acides aminés est conservé au cours de l'évolution, et spécifique pour chaque membre des SFK. Cette région est intrinsèquement désordonnée et sa fonction n'a pas encore été clairement élucidée. Cependant, elle peut jouer un rôle dans l'interaction avec d'autres protéines, ainsi que sur l'ancrage et la topologie de l'enzyme à la face interne de la membrane pour réguler la phosphorylation de substrats spécifiques.

- Domaine SH3 : ce domaine d'interaction protéique d'environ 60 acides aminés est impliqué dans la reconnaissance et la liaison des séquences de type PXXP pouvant adopter une conformation en hélice gauche. Ces domaines SH3 adoptent une conformation globulaire composée de 5 feuillets β qui forment une surface de liaison hydrophobe pour la séquence riche en proline, ainsi que 2 boucles qui assurent des contacts spécifiques avec le ligand augmentant ainsi l'affinité de l'interaction.

- Domaine SH2 : ce domaine d'interaction protéine d'environ 100 acides aminés se lie à des peptides phosphorylés sur Tyr *via* une poche commune à tous les SH2 qui est riche en résidus basiques (FLVRES) (Eck, Shoelson, et Harrison 1993). La profondeur de cette poche empêche les résidus sérines et thréonines phosphorylés de s'y loger. La spécificité d'interaction réside dans la nature des 3 à 5 résidus C-terminaux environnant la pTyr *via* une liaison spécifique du domaine SH2 (Zhou Songyang et Cantley 1995). Par exemple, les domaines SH2 des SFK se lient préférentiellement à une séquence consensus de type pYEEI (Z. Songyang et al. 1993).

- Linker : Ce domaine logé entre le domaine SH2 et le domaine catalytique joue un rôle essentiel dans la régulation de l'activité catalytique. Il adopte une conformation poly-Proline de type II grâce à la présence d'une proline (cas de SRC, Fyn, Yes, Fgr) ou deux prolines (cas de Lyn, Lck, Hck, Blk) contenues dans cette séquence.

- Domaine catalytique : ce domaine d'environ 250 acides aminés porte l'activité PTK avec un site de la liaison de l'ATP. Il est composé de deux lobes, un petit lobe en N-terminal et un grand lobe en C-terminal, et l'interface entre ces deux structures globulaires définit le site catalytique. Les deux lobes sont reliés par un segment flexible d'une vingtaine d'acides aminés, dénommé la boucle d'activation qui contient un site d'autophosphorylation indispensable à l'activation complète de la kinase (Kmiecik et Shalloway 1987).

- Extrémité C-terminale : ce domaine constitué de 15 à 19 acides aminés joue également un rôle déterminant dans la régulation de l'activité des SFK. Cette régulation repose sur la phosphorylation d'une Tyr conservée entre les différents membres de la famille qui présentent une affinité pour le domaine SH2 de la PTK.

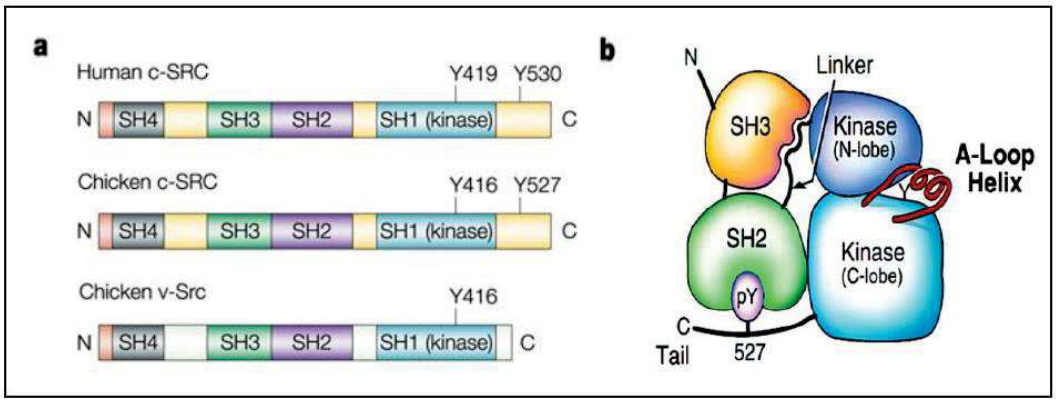


Figure 14 : Structure modulaire des SFK (*adaptée de Yeatman 2004).*
a. Comparaison des structures moléculaires du c-SRC humain, et du c-SRC et v-Src aviaires. De la région N-terminale à la région C-terminale, les SFK sont constituées d'un domaine N-terminal ou SH4, d'un domaine unique, d'un domaine SH3, d'un domaine SH2, d'un interdomaine ou linker, d'un domaine catalytique SH1 et d'une queue C-terminale. Le domaine SH1 contient un résidu Tyr impliqué dans l'autophosphorylation de la protéine. Le domaine C-terminal contient un résidu Tyr impliqué dans la régulation de la protéine à l'exception des formes virales oncogéniques, dont v-Src. **b.** Représentation de la structure de c-SRC aviaire dans sa conformation inactive (d'après Xu et al. 1999). Les domaines SH3 et SH2 sont respectivement en jaune et en vert, suivis de la région linker. Les lobes catalytiques N-terminal (petit lobe) et C-terminal (grand lobe) du domaine SH1 sont en bleus. La boucle d'activation du domaine kinase située entre les 2 lobes contient la Tyr416 activatrice. La queue C-terminale contient la Tyr527 inhibitrice.

3. Mécanismes de régulation des SFK

Au vu de l'activité oncogénique des SFK, la caractérisation de leurs mécanismes de régulation constitue un élément important pour la compréhension des mécanismes de transformation cancéreuse. Ainsi, la comparaison entre la version virale de SRC, et son homologue cellulaire c-SRC a permis de dévoiler un premier mécanisme de régulation des SFK *via* la phosphorylation de la Tyr C-terminale. Plus particulièrement, la phosphorylation de cette Tyr stabilise la conformation fermée et inactive de SRC *via* une interaction intramoléculaire avec le domaine SH2. L'analyse structurale par

cristallographie de SRC et Hck a dévoilé un mécanisme de régulation supplémentaire *via* le domaine SH3 (Sicheri, Moarefi, et Kuriyan 1997; Xu, Harrison, et Eck 1997). Ce dernier interagit avec la séquence « linker » pour stabiliser la conformation fermée inactive. Depuis, le modèle de régulation des SFK couramment admis repose sur un équilibre entre des conformations actives "ouvertes" et inactives "fermées" de la protéine (**Figure 15**) (Sicheri, Moarefi, et Kuriyan 1997; Xu et al. 1999). Il est à noter que les séquences intramoléculaires reconnues par les domaines SH2 et SH3 ne sont pas des sites de liaison de haute affinité permettant une plasticité conformationnelle (active/inactive) et une régulation fine de son activité. La déstabilisation de sa conformation fermée va permettre l'exposition de la Tyr419 de la boucle activatrice conduisant à sa phosphorylation (en *cis* ou *trans*). Cette phosphorylation entraîne une stabilisation de la conformation ouverte active permettant l'accès à la tyrosine substrat.

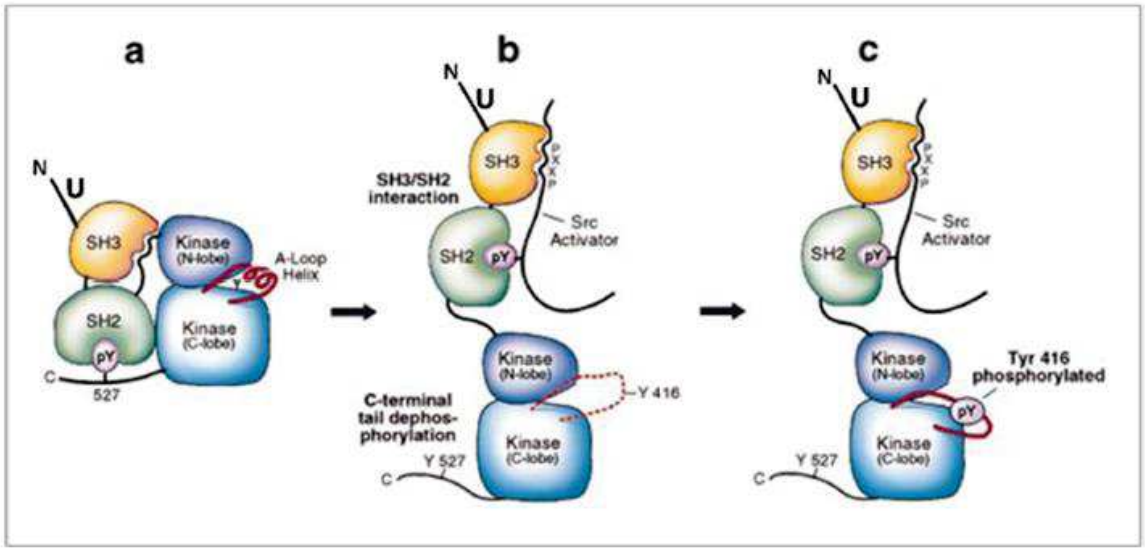


Figure 15 : Structure des SFK en conformation fermée inactive (à gauche) et en conformation ouverte active (à droite) (*adaptée de (Xu et al. 1999).*
a. Les interactions intramoléculaires SH2/pY527 et SH3/linker maintiennent l'enzyme dans une conformation fermée et inactive. La boucle d'activation (A-loop) adopte une structure en hélice α qui empêche l'interaction du domaine kinase avec son substrat et la phosphorylation de la Tyr416. **b.** La déphosphorylation de l'extrémité C-terminale, ainsi que la liaison des domaines SH2 et SH3 avec leurs ligands entraînent un changement conformationnel qui permet l'ouverture du domaine kinase et l'élimination de la structure en hélice α de la boucle d'activation. **c.** La Tyr416 peut alors être phosphorylée, ce qui induit une réorganisation de la boucle d'activation facilitant ainsi l'accès du substrat au site actif et permettant la pleine activité catalytique de l'enzyme.

4. Rôle des SFK dans l'homéostasie intestinale

La fonction des SFK dans la physiologie intestinale a été abordée par des études de KO spécifique dans ce tissu chez la souris et la drosophile. Ces études révèlent un rôle essentiel des SFK dans la prolifération des cellules souches intestinales (ISC) et des cellules progénitrices au cours de l'homéostasie et de la régénération tissulaire (Cordero et al. 2014; Kohlmaier et al. 2015). De manière cohérente, les formes actives des SFK ont été spécifiquement détectées dans le compartiment prolifératif des cryptes intestinales abritant les ISC et des cellules progénitrices. Par ailleurs, alors que la déplétion spécifique de SRC dans les cellules épithéliales intestinales (IEC) n'avait pas de phénotype apparent dans les conditions physiologiques, la déplétion concomitante de SRC, Fyn et Yes entraîne une réduction du nombre de cellules de Paneth, ainsi qu'une augmentation drastique de la mort par apoptose des IEC au niveau des villosités dans l'intestin grêle (Cordero et al. 2014). Ces données témoignent du rôle primordial des SFK dans le maintien de l'épithélium intestinal et de la redondance de fonction des SFK dans ce tissu hautement prolifératif. En accord avec ces données, l'ablation du régulateur négatif des SFK, Csk, induit une prolifération cellulaire et un renouvellement aberrant des cellules de l'épithélium intestinal, une perte de maturation des cellules de Paneth et des cellules caliciformes, et une diminution du nombre de cellules souches intestinales (Imada et al. 2016). Par contre, la déplétion de SRC dans le compartiment intestinal est suffisante pour enrayer la régénération des cryptes intestinales suite à une induction de dommages à l'ADN par irradiation gamma, suggérant une fonction spécifique de SRC au cours de la régénération (Kohlmaier et al. 2015). Ces fonctions cellulaires sont associées à un rôle essentiel des SFK dans la régulation des voies de signalisation majeures de l'homéostasie et du renouvellement de l'épithélium intestinal, dont les voies Wnt/β-

caténine, STAT3, EGFR/RAS/MAPK, Rac et Yap/TAZ. (Cordero et al. 2014; Imada et al. 2016; Moroishi, Hansen, et Guan 2015). Les substrats directs associés à ces voies de signalisation cellulaires ne sont cependant que peu caractérisés.

5. Rôle des SFK dans le développement des tumeurs intestinales

Au vu du rôle essentiel des SFK dans l'intestin, il n'est pas surprenant que ces PTK puissent jouer un rôle important dans le CCR. Les premières études effectuées sur des prélèvements CCR de patients ont révélé une augmentation fréquente de l'expression de SRC concomitante à une activité enzymatique aberrante. Cette suractivation, cohérente avec une activité oncogénique, est retrouvée dans plus de 80% des CCR et est associée à un mauvais pronostic chez les patients (Audrey Sirvent, Benistant, et Roche 2012; Summy et Gallick 2003). De manière intéressante, les SFK peuvent être activées au stade précoce de la tumorigenèse (i.e. polypes intestinaux et les adénomes) (Cartwright, Meisler, et Eckhart 1990; Cordero et al. 2014) et leur niveau d'activité est d'ailleurs un facteur pronostique de la survie globale dans les CCR de stades II-III (Martínez-Pérez et al. 2017). L'expression/l'activité des SFK est également augmentée aux stades tardifs (**Figure 16)**. Notamment, le niveau d'activité tumorale de SRC/Yes est un marqueur de mauvais pronostic **(Figure 17)** et de résistance thérapeutique au stade IV du CCR (Kopetz et al. 2014; Summy et Gallick 2003). Ces évidences suggèrent une implication de plusieurs SFK dans les différentes étapes de la carcinogénèse colique, une implication qui sera explicitée plus en détail ci-après et qui est résumée en **Figure 18.**

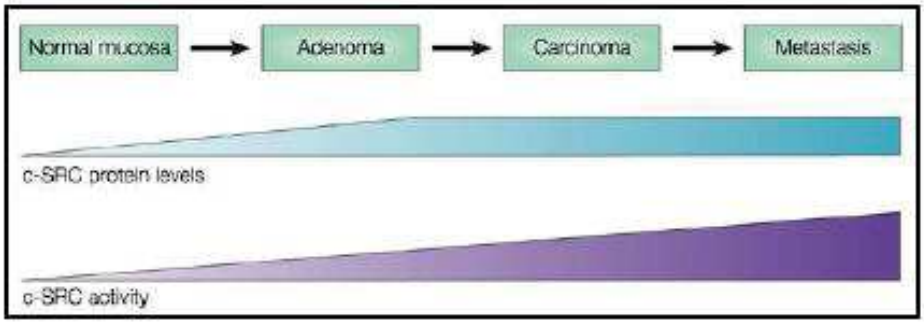


Figure 16 : Augmentation de l'expression et de l'activité de SRC au cours de la progression tumorale colique (*adaptée de Yeatman 2004).*

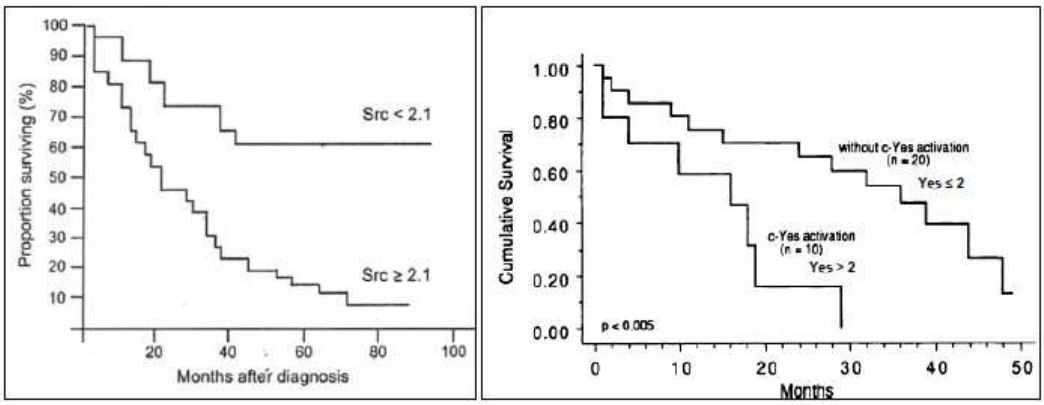


Figure 17 : Courbes de survie de patients atteints de CCR en fonction de l'augmentation de l'activité de Src (à gauche) et de Yes (à droite) (*adaptée de Aligayer et al. 2002; Han, Curley, et Gallick 1996).*
L'activation des SFK est définie par une augmentation de l'activité kinase dans la tumeur supérieure à 2 en comparaison avec le tissu sain.

5.1. Rôle des SFK dans la formation des CCR

SRC joue un rôle important dans l'initiation tumorale intestinale induite par l'inactivation d'APC chez la souris ou la drosophile (Cordero et al. 2014; Kohlmaier et al. 2015), *via* l'activation des cellules souches cancéreuses (CSC), et en accord avec la signature préférentielle SRC observée dans les tumeurs de type CMS2 chez les patients (Guinney et al. 2015). L'activation de SRC et de Yes retrouvées dans ces tumeurs soutiennt l'activité oncogénique de la voie β-caténine, sans doute *via* la phosphorylation de plusieurs composants de cette voie, dont la β-caténine (Sancier et al. 2011; Audrey Sirvent et al. 2020). En plus de la voie Wnt/β-caténine, les SFK

promeuvent la prolifération des cellules tumorales *via* la suractivation des récepteurs aux facteurs de croissance (Audrey Sirvent, Urbach, et Roche 2015). Une activité SFK excessive peut également contribuer à la dérégulation du cycle cellulaire de ces cellules cancéreuses résultant en une division cellulaire anormale, un défaut de la cytokinèse, une polyploïdie cellulaire et un nombre excessif de centrosomes (Nakayama et al. 2017). Bien que non formellement montrée, cette activité cellulaire dépendante de SRC doit contribuer à l'instabilité chromosomique observée dans ces tumeurs.

5.2. Rôle des SFK dans la progression tumorale

SRC joue également un rôle important dans la progression des CCR. Premièrement, SRC joue un rôle essentiel dans l'induction de l'angiogenèse tumorale au cours de la progression du CCR par un mécanisme complexe, dont (i) l'activation de SRC par l'hypoxie (Bo Wang et al. 2020) et (ii) l'induction SRC-dépendante de facteurs d'angiogenèse et de la signalisation des récepteurs angiogéniques (Ellis et al. 1998; Simons, Gordon, et Claesson-Welsh 2016). Deuxièmement, une activité excessive des SFK soutient la survie de ces cellules tumorales. Cette fonction est médiée par l'activation de la voie de signalisation de survie AKT (Windham et al. 2002), l'inhibition de la voie de signalisation apoptotique FAS (Chakrabandhu et al. 2016; Cursi et al. 2006) et l'induction de gènes anti-apoptotiques tels que BCL2L1 ou BIRC5 (Rosenbluh et al. 2012). Troisièmement, SRC peut répondre à la forte demande d'énergie tumorale en phosphorylant et en activant plusieurs cascades métaboliques. Par exemple, SRC peut favoriser le développement de tumeurs intestinales par phosphorylation directe de l'enzyme glycolytique PFKFBP3 permettant une glycolyse anabolique aberrante (Ma et al. 2020).

5.3. Rôle des SFK dans la formation de métastases

Les SFK jouent des rôles clés dans la progression métastatique. En particulier, SRC perturbe l'adhésion cellulaire et favorise la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), pour induire la migration de ces cellules tumorales épithéliales (Boyer et al. 1997). En particulier, SRC induit la dissociation cellulaire *via* la phosphorylation du complexe E-cadhérine/β-caténine localisé aux jonctions adhérentes, leur internalisation et la perte de fonction de l'E-cadhérine (Canel et al. 2013) . Cet évènement majeur a pour conséquence l'accumulation de la β-caténine pour activer la transcription de gènes impliqués dans l'EMT tels que Myc et Snail, deux des acteurs fondamentaux dans ce processus. SRC favorise également la survie des cellules disséminées en initiant l'activation constitutive de la signalisation des intégrines, et ceci en l'absence d'adhésion avec la matrice cellulaire (Avizienyte et al. 2002). Enfin SRC favorise la dissémination métastatique *via* la formation de la niche métastatique (Hikita et al. 2019; Imjeti et al. 2017). Ce processus permet l'adhésion et la survie des cellules disséminées dans le tissu colonisé (Vanharanta et Massagué 2013). Dans ce contexte, SRC promeut la biogenèse d'exosomes tumoraux qui vont délivrer des composants importants de cette niche, dont des facteurs de croissance, d'adhésion et composants de la matrice extracellulaire nécessaires à l'adhésion et la croissance de ces cellules tumorales circulantes (Oskarsson, Batlle, et Massagué 2014).

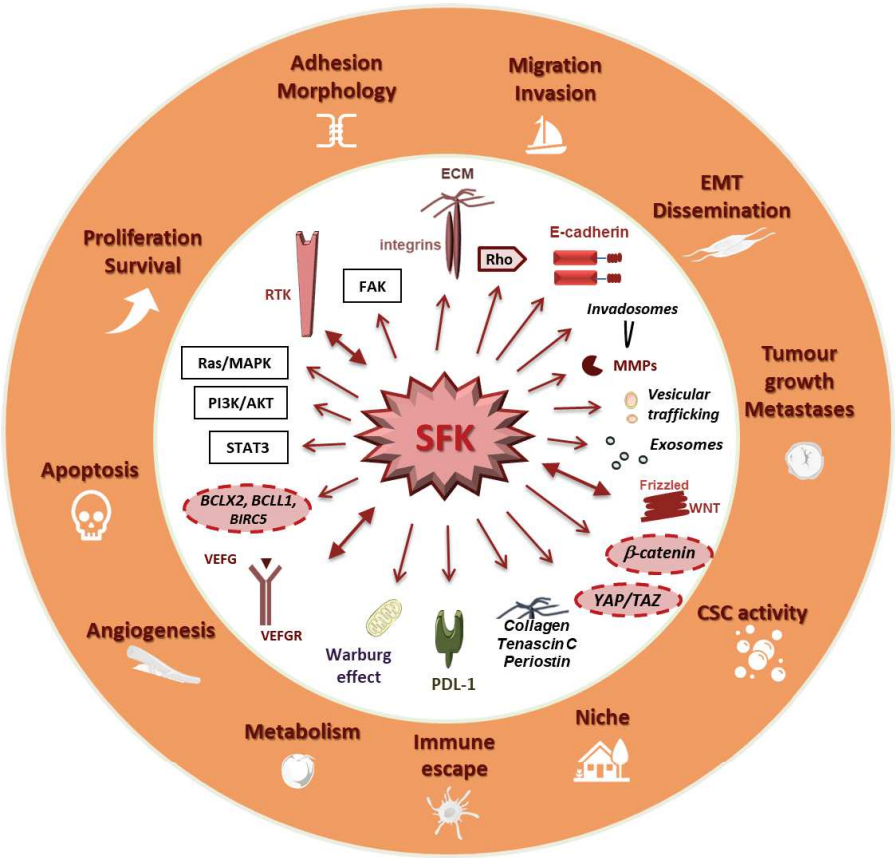


Figure 18 : Modèle résumant la signalisation SFK dans le CCR (*adaptée de Sirvent et al. 2020).* Les processus moléculaires et cellulaires activés par une activité excessive des SFK dans le CCR sont mis en évidence.

6. Mécanismes de dérégulation des SFK dans le CCR

Bien que SRC joue un rôle important dans le développement du CCR, les mécanismes de dérégulation des SFK dans ces tumeurs sont mal connus, essentiellement parce qu'à la différence des autres oncogènes, SRC est rarement muté dans ces cancers. En fait ses mécanismes de dérégulation ne sont pas d'origine génétique. J'aborderai donc ci-dessous les principaux mécanismes reliés à l'activation aberrante de SRC dans les CCR **(Figure 19)**.

6.1. Mutations somatiques

En 1999, Irby et *al.* ont reporté une mutation activatrice induisant une troncation de SRC au niveau du résidu 530, dans 12% des biopsies analysées issues de patients

atteints d'un CCR à un stade avancé. Cette mutation était absente chez les patients atteints d'un CCR à un stade précoce. Cependant, d'autres équipes n'ont pas réussi à confirmer ces résultats (Bénistant et al. 2000; Daigo et al. 1999; Laghi et al. 2001; Nilbert et Fernebro 2000). Une étude plus récente, basée sur un large panel de biopsies de CCR, révèle une fréquence de mutation gain de fonction d'environ 1% (Greenman et al. 2007), en accord avec les données disponibles à ce jour sur le site de génomique du cancer cBioportal (2.9% selon www.cBioportal.org). Toutes ces données démontrent que les mutations somatiques des SFK ne définissent donc pas le mécanisme majeur de l'activation tumorale de SRC.

6.2. Surexpression

Bolen et *al.* ont montré que le niveau d'expression de SRC était cinq à huit fois plus élevé dans les polypes précancéreux que dans la muqueuse normale, avec des niveaux encore plus élevés dans l'adénocarcinome (Bolen et al. 1987). Cette surexpression était associée à une faible survie des patients. De manière intéressante, l'expression de SRC est augmentée dans les adénomes des souris transgéniques $APC^{Min/+}$ (Carothers et al. 2006), suggérant une implication de la voie Wnt/β-caténine dans la dérégulation de l'expression de SRC. Cependant, la surexpression de SRC peut être également due à une augmentation du nombre de copies de *c-src* que l'on peut retrouver dans 15% des CCR (Arcaroli et al. 2010). La régulation des SFK peut également impliquer des mécanismes épigénétiques *via* la perte d'expression du miRNA : mi-129-1-3p (Okuzaki et al. 2020).

6.3. Inactivation de Csk

La surexpression seule de la protéine SRC n'est pas suffisante pour induire une activité tumorale, ceci en raison des mécanismes de régulation enzymatique. Plusieurs mécanismes de dérégulation de son activité participent à son activation oncogénique,

dont l'inactivation de la kinase Csk. Csk est le régulateur négatif majeur des SFK (Okada 2012). De manière surprenante, son expression et son activité sont fortement augmentées dans les tumeurs de patients atteints de CCR (Bénistant et al. 2001). Cependant, le recrutement de Csk à la membrane plasmique, qui est absolument nécessaire à la phosphorylation inhibitrice des SFK, est altéré dans les CCR, expliquant ainsi l'incapacité des cellules tumorales à réguler les SFK. Cette rétention cytosolique de Csk est en partie attribuée à une perte d'expression de la protéine transmembranaire Cbp/PAG, qui est impliquée dans son recrutement à la membrane plasmique (Oneyama et al. 2008; A. Sirvent et al. 2010). L'inactivation de Cbp/PAG n'est toutefois observée que dans environ 50% des CCR, suggérant l'existence de mécanismes additionnels d'inactivation de Csk.

6.5. Dérégulation de phosphatases

La déphosphorylation de la Tyr530 régulatrice par des phosphatases peut également contribuer à la dérégulation des SFK. De nombreuses phosphatases sont impliquées dans cette déphosphorylation dont CD45, PTPα, PTPλ, PTP1B, SHP1 et SHP2 (Bjorge, Jakymiw, et Fujita 2000). Cependant, leur rôle dans la dérégulation des SFK dans les CCR n'est que peu documenté. La phosphorylation aberrante de la Tyr419 activatrice de SRC peut également participer à sa dérégulation. En accord avec cette hypothèse, la phosphatase PTPL1, qui est impliquée dans la déphosphorylation de cette Tyr, est inactivée dans les cellules de CCR et cette perte de fonction participe à la croissance cellulaire dépendante de SRC (Palmer et al. 2002). D'un point de vu mécanistique, la perte d'expression de la protéine adaptatrice LIM par une modification épigénétique ne permet plus l'association entre PTPL1 et SRC (Zhang et al. 2009). La Tyr419 est donc maintenue phosphorylée et SRC reste activé.

6.6. Association des SFK avec des RTK

Le dialogue réciproque entre SRC et les RTK participe également à l'activité aberrante de SRC observée dans les CCR. Dans un contexte cellulaire normal, les SFK interagissent avec les RTK activés suite à la liaison de leur ligand, ce qui conduit à leur activation transitoire et à la phosphorylation de substrats en aval de la voie dépendante de SRC (Bromann, Korkaya, et Courtneidge 2004). Dans les CCR, la dérégulation de SRC permet une interaction directe et soutenue avec les RTK souvent surexprimés dans ces cellules tumorales. En conséquence, l'interaction dépendante de SH2-pTyr devrait permettre la stabilisation de SRC en conformation ouverte et active conduisant à une dérégulation maximale de l'enzyme (Bromann, Korkaya, et Courtneidge 2004). De manière intéressante, ce mécanisme de dérégulation n'est pas nécessairement dépendant de la présence de facteurs de croissance. Cette hypothèse a été confirmée au laboratoire par une analyse de phosphoprotéomique quantitative. Dans les cellules de CCR SW620 exprimant un faible niveau de SRC endogène, la surexpression de SRC induit des propriétés oncogéniques très significatives. L'analyse du phosphoprotéome associé à SRC a révélé la phosphorylation d'un cluster de RTK, dont MET et EphA2 (Leroy et al. 2009). Ces récepteurs sont nécessaires à la fonction oncogénique de SRC d'une part (invasion et croissance cellulaires), et d'autre part elles participent au maintien de l'activité maximale de SRC. Nous proposons l'hypothèse selon laquelle la dérégulation de SRC induit un rétrocontrôle positif où SRC phosphoryle des RTK qui, en retour, augmentent l'activité catalytique de SRC, accentuant ainsi son pouvoir oncogénique. En résumé, l'activation oncogénique des SFK dans les CCR fait intervenir divers mécanismes moléculaires d'origine génétique, épigénétique et post-traductionnels. La combinaison de ces différents mécanismes

devrait induire une activité oncogénique de SRC maximale malgré l'absence de mutations somatiques « gain de fonction » du gène correspondant.

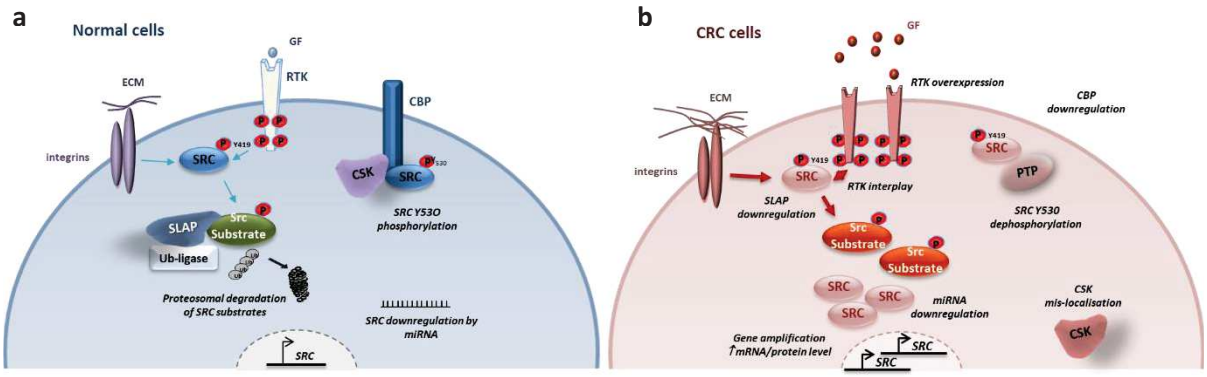


Figure 19 : Mécanismes sous-jacents à l'activité tumorale SFK dans les cellules CCR (*adaptée de Sirvent et al. 2020).*
Dans les cellules épithéliales intestinales normales **(a)**, l'expression et l'activité de SRC sont fortement régulées. Plusieurs mécanismes sont impliqués dans la dérégulation de SRC dans les cellules de CCR **(b)** : (i) la surexpression du gène SRC *via* amplification, augmentation de la transcription ou stabilisation protéique, (ii) l'inactivation de son régulateur négatif Csk dû à la perte d'expression de l'adaptateur CBP/PAG, (iii) la suractivation/surexpression des récepteurs en amont, (iv) la dérégulation de phosphatases et (v) la stabilisation anormale des substrats *via* l'inactivation de SLAP.

7. SRC, une potentielle cible thérapeutique dans le traitement du CCR

L'accumulation de résultats obtenus dans des modèles expérimentaux de CCR suggère que les SFK pourraient être des cibles attractives dans les CCR avancés (L. C. Kim, Song, et Haura 2009; Martellucci et al. 2020) en raison de leurs rôles dans la dissémination des cellules CCR et dans l'activité CSC, qui sont les principales causes de rechute tumorale et de progression métastatique. En conséquence, plusieurs inhibiteurs compétitifs de l'ATP ont été développés, dont le dasatinib (BMS354825), le saracatinib (AZD0530), le bosutinib (SKI-606), le KX2-391 et le XL228.35-4 (Martellucci et al. 2020). Ces inhibiteurs réduisent la croissance tumorale et le développement de métastases dans des modèles précliniques chez la souris. Cependant, ils n'ont pas donné de résultats significatifs chez les patients, que ce soit en monothérapie ou en combinaison avec des thérapies ciblées (Isakoff et al. 2014; Reddy et al. 2015). Les mécanismes complexes de régulation et d'hyperactivation de

SRC dans les CCR discutés ci-dessus peuvent expliquer l'absence d'effet anticancéreux de ces médicaments, en particulier le manque de stratification des patients, d'efficacité et de sélectivité des médicaments, entraînant une toxicité significative. De nouvelles stratégies thérapeutiques seront nécessaires pour mieux cibler la signalisation SRC dans le CCR.

C. La Protéine Sérine-Thréonine Kinase mTOR

En 1964, lors d'une excursion sur l'île de Pâques, Surendra Nath Sehgal et son groupe ont isolé un nouveau macrolide à forte activité antifongique, qu'ils ont nommé « rapamycine » en référence à son lieu d'origine. Des études ultérieures sur la rapamycine lui ont attribué des propriétés immunosuppressives, antitumorales et neuroprotectrices, générant une excitation clinique significative (Vézina, Kudelski, et Sehgal 1975). Pendant plus de 20 ans son mécanisme d'action est resté insaisissable et ce n'est qu'en 1990 que Schreiber et ses collègues ont démontré un premier mécanisme d'action *via* sa liaison à la prolyl-isomérase FKBP12 inhibant ainsi la croissance cellulaire (Bierer et al. 1990, 506). Le mécanisme d'action complet a été élucidé en 1994, lorsque trois groupes, en utilisant la purification par affinité biochimique du complexe FKBP12-rapamycine, ont identifié la kinase mTOR (mechanistic target of rapamycin), comme cible centrale de FKBP12 (Brown et al. 1994; Sabatini et al. 1994; Sabers et al. 1995). Cette découverte a également révélé une homologie entre mTOR et les cibles de la rapamycine isolé à partir d'un criblage chez la levure, à savoir les protéines TOR1 et TOR2. Depuis, mTOR est connue comme un régulateur central de la croissance cellulaire. Dans ce chapitre, j'aborderai les voies de signalisation régulées par mTOR, son rôle dans la physiopathologie intestinale et les stratégies thérapeutiques anti-tumorales associées.

1. Structure

La protéine mTOR est une protéine à activité sérine-thréonine kinase atypique de la petite famille des PI3K-related kinases (PIKK) comprenant les membres ATM, ATR, DNA-PK, SMG1 et TRRAP (Keith et Schreiber 1995). Structurellement, mTOR contient en C-terminal un domaine kinase présentant une forte similitude avec le domaine kinase de PI3K et en N-terminal de nombreux domaines d'interaction protéique HEAT (huntingtine, facteur d'élongation 3, protéine phosphatase 2A, TOR1). mTOR dispose également de domaine d'homologie FAT (FRAP, ATM et TTRAP), FATC (FAT C-terminal) et FRB (FKBP12/rapamycin-binding) **(Figure 20)**. En complexe avec la rapamycine, le domaine FRB inhibe mTOR de manière allostérique en raison de sa forte proximité avec le site de liaison à l'ATP du domaine kinase. Chez les mammifères, mTOR existe sous forme de deux complexes macro-protéiques appelés mTOR complexe 1 (mTORC1) et 2 (mTORC2). Ces complexes se distinguent non seulement par leurs composants mais également par leur sensibilité à la rapamycine, par leurs substrats et par leurs fonctions. L'existence d'un troisième complexe mTORC3 suggérée par l'équipe de Gérard C. Grosveld (Harwood et al. 2018) et l'identification récente d'un complexe mTOR/GIT1/β-PIX dans les astrocytes de souris (Smithson et Gutmann 2016) suggèrent que la composition moléculaire et la fonction des complexes mTOR pourraient être plus diversifiées que communément admis.

1.1. mTORC1

mTORC1 est composé de mTOR, LST8 (mammalian lethal with SEC13 protein 8), Raptor (regulatory-associated protein of mTOR), et de deux sous-unités protéiques inhibitrices que sont le domaine proline-rich AKT substrate of 40 kDa (PRAS40) et le domaine DEP domain-containing mTOR-interacting protein (DEPTOR) **(Figure 20)** (G.

Y. Liu et Sabatini 2020). mTORC1 est actif sous forme dimérique *via* un arrangement antiparallèle des domaines HEAT de mTOR et l'interface mTOR-Raptor (Aylett et al. 2016). Raptor stabilise le dimère, régule sa localisation subcellulaire et le recrutement de substrats spécifiques contenant un motif TOS (TOR signalisation) (Nojima et al. 2003). Le rôle de LST8 dans la régulation de mTORC1 n'est pas clair à ce jour. Des données structurales ont tout d'abord suggéré que LST8 puissent stabiliser le domaine kinase de mTOR en conformation active (H. Yang et al. 2013), alors qu'*in vivo* LST8 n'est pas essentiel pour l'activité mTORC1 (Guertin et al. 2006; Hwang et al. 2019).

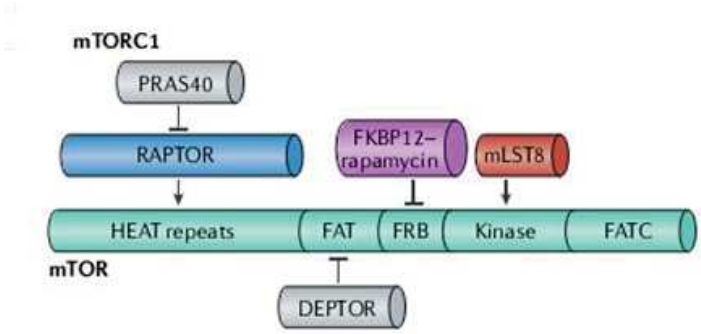


Figure 20 : Structure de mTORC1 (*adaptée de Liu et Sabatini 2020).*
La structure modulaire de la kinase mTOR est annotée avec des sites de liaison pour les autres sous-unités de mTORC1. mTOR lie LST8, un composant central du complexe et DEPTOR, un inhibiteur endogène de l'activité mTORC1. Raptor, la sous-unité définissant mTORC1, lie mTOR *via* ses répétitions HEAT et est nécessaire pour la localisation lysosomale du complexe. Raptor recrute également PRAS40, un inhibiteur de l'activité mTORC1 régulé par l'insuline.

1.2. mTORC2

Dans sa globalité, le complexe mTORC2 a une organisation structurelle similaire à celle de mTORC1 **(Figure 21)** (G. Y. Liu et Sabatini 2020). Comme pour mTORC1, mTORC2 est composé de mTOR, LST8, DEPTOR et à, la place de Raptor, qui marque la spécificité du complexe mTORC1, on retrouve la protéine d'échafaudage Rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR) (D. D. Sarbassov et al. 2004). Rictor s'est révélée être essentielle à l'intégrité et la stabilisation du complexe mTORC2 mature.

En effet, la déplétion de cette sous-unité est associée à une perturbation de l'assemblage de mTORC2 et à une perte drastique de son activité. Par ailleurs, deux autres sous-unités confèrent au complexe mTORC2 son unicité. La première, Sin1, codée par le gène MAPKAP1 (mitogen-activated protein kinase-associated protein 1), a été découverte par son interaction avec Rictor (Frias et al. 2006). Cette protéine est cruciale pour l'activité mTORC2 en permettant : (i) le recrutement de substrats spécifiques *via* son domaine CRIM, (ii) l'adressage de mTORC2 à la membrane plasmique *via* un domaine d'homologie de la pleckstrine se liant aux phospholipides, et (iii) la régulation de l'activité de la kinase de mTORC2 (Yuan et Guan 2015). La seconde, PROTOR 1/2 (protein associated with Rictor 1 or 2) joue un rôle d'assistance à l'assemblage de mTORC2 (Pearce et al. 2007). De manière intéressante, LST8, bien que se liant de manière stable au domaine kinase de mTOR dans les deux complexes, s'est révélée essentielle à la signalisation mTORC2, sans doute *via* son rôle important dans l'interaction entre Rictor et mTOR (Guertin et al. 2006; Hwang et al. 2019). Enfin, la composition et l'architecture uniques du complexe mTORC2 sont à l'origine de sa spécificité de régulation et de phosphorylation. Par exemple, l'analyse structurale par CryoEM de mTORC2 explique l'insensibilité du complexe à la rapamycine (Stuttfeld et al. 2018). En particulier la région C-terminale de Rictor interfère avec la liaison de FKBP12-rapamycine au domaine mTOR FRB. Il est important de mentionner que malgré cette insensibilité, un traitement prolongé à la rapamycine peut inhiber la voie de signalisation mTORC2 (Dos D. Sarbassov et al. 2006). Cela peut être dû à l'épuisement du pool cellulaire mTORC2 car toutes les molécules de mTOR néosynthétisées sont progressivement piégées par le complexe rapamycine-FKBP12, empêchant la liaison de mTOR avec Rictor et donc l'assemblage de mTORC2.

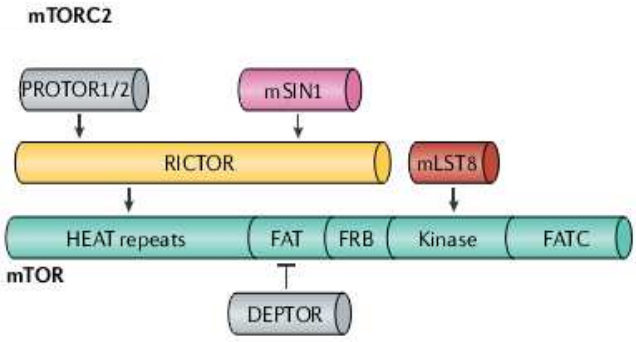


Figure 21 : Structure de mTORC2 (*adaptée de Liu et Sabatini 2020).*
La structure modulaire de la kinase mTOR est annotée avec des sites de liaison pour les autres sous-unités de mTORC2. Ces composants incluent LST8, DEPTOR et Rictor la sous-unité définissant mTORC2. En tant que protéine d'échafaudage, Rictor recrute PROTOR1/2 et Sin1 au complexe.

2. Fonctions de la signalisation mTOR

Les complexes mTOR jouent un rôle clé dans le contrôle de l'équilibre entre anabolisme et catabolisme en réponse aux conditions environnementales. Je passe ici en revue les principaux substrats critiques de mTORC1/mTORC2, les processus cellulaires déclenchés en aval et comment ils contribuent à leurs fonctions cellulaires.

2.1. Rôles de mTORC1

La fonction de mTORC1 est d'intégrer les diverses informations reçues via l'insuline, les facteurs de croissances, les acides aminés, le stress, l'énergie et d'induire, en réponse, la production appropriée de protéines, de lipides, de nucléotides et d'ATP tout en limitant la perte de composants cellulaires par autophagie. En accord avec cette fonction, l'inhibition de l'activité mTORC1 conduit à une diminution de la taille des cellules et à une réduction de la prolifération.

a. mTORC1 et la machinerie de la traduction :

mTORC1 active la traduction cellulaire *via* l'activation de S6K1 et l'inhibition de 4EBP1 (4E-binding protein 1) par phosphorylation **(Figure 22)** (Sabatini et al. 1994). La phosphorylation de 4EBP1 par mTORC1 induit sa dissociation avec eIF4E, provoquant

la levée d'inhibition de la synthèse des protéines médiée par 4EBP1 (Gingras et al. 1999). L'activation de S6K1 améliore également la synthèse des protéines en activant eIF4B, un régulateur positif de la traduction cap-dépendante (Holz et al. 2005), et en dégradant l'inhibiteur de eIF4A PDCD4 (programmed cell death 4) (Dorrello et al. 2006). Pour faire face à une synthèse accrue des protéines, mTORC1 favorise également la biogenèse des ribosomes en induisant la transcription de l'ARN ribosomal, grâce à la phosphorylation, *via* S6K1, des régulateurs UBF52 (upstream binding factor 52) (Hannan et al. 2003), TIF-1A (transcription initiation factor 1A) et MAF1 (C. Mayer et al. 2004; Michels et al. 2010).

b. mTORC1 et le métabolisme :

mTORC1 favorise également la synthèse lipidique pour soutenir la biogenèse de nouvelles membranes cellulaires, *via* l'expression de gènes impliqués dans la synthèse *de novo* de lipides et de cholestérol. Sur le plan mécanistique, mTORC1 *via* la phosphorylation de SK61, induit la translocation nucléaire du facteur de transcription SREBP1/2 (sterol regulatory element binding protein 1/2) et l'exclusion nucléaire de son inhibiteur, la Lipine 1 **(Figure 22)** (Düvel et al. 2010; Peterson et al. 2011). mTORC1 favorise également la synthèse des nucléotides nécessaires à la réplication de l'ADN et à la biogenèse des ribosomes *via* l'expression de MTHFD2, un composant clé du cycle tétrahydrofolate mitochondrial qui fournit des unités à un carbone pour la synthèse des purines (Ben-Sahra et al. 2016). De plus, S6K1 active la carbamoyl-phosphate synthétase (CAD) par phosphorylation, un composant essentiel de la voie de synthèse de pyrimidine **(Figure 22)** (Ben-Sahra et al. 2013). Enfin, puisque l'accumulation de biomasse exige de vastes réserves énergétiques, mTORC1 reprogramme le métabolisme énergétique cellulaire *via* l'expression du facteur de transcription HIF1α (hypoxia inducible factor 1α) et l'expression des enzymes

glycolytiques tel que la phospho-fructo kinase (PFK) et favorise la glycolyse par rapport à la phosphorylation oxydative **(Figure 22)** (Düvel et al. 2010).

c. mTORC1 et le renouvellement protéique

Afin d'optimiser l'apport protéique cellulaire, mTORC1 inhibe le catabolisme protéique, dont l'autophagie. Pour cela, mTORC1 induit la phosphorylation de deux facteurs clés de l'autophagie, ULK1 (unc-51-like autophagy-activating kinase 1) et ATG13 **(Figure 22)** (Hosokawa et al. 2009).

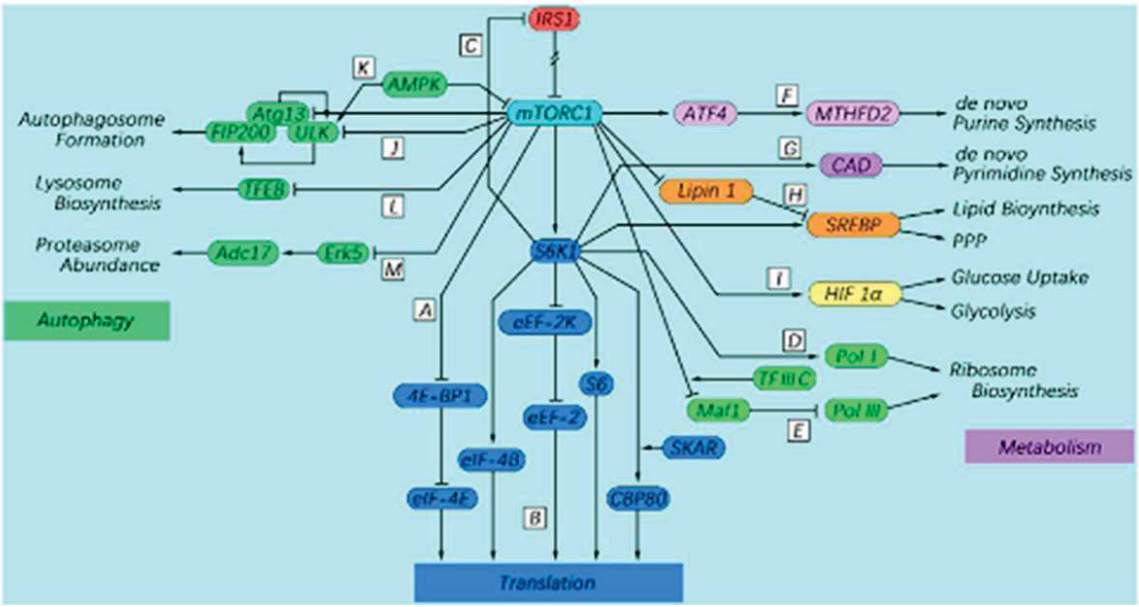


Figure 22 : Cibles en aval de la signalisation mTORC1 (*adaptée de Chen et Zhou 2020).* Les axes mTORC1-4EBP1 (A) et mTORC1-S6K1 (B), favorisent la traduction. L'axe S6K-IRS1 induit une boucle de rétrocontrôle négative (C). L'axe mTORC1-S6K1-Pol I favorise la biosynthèse des ribosomes (D) et mTORC1-S6K1-Pol III celle des ribosomes (E). L'axe mTORC1-ATF4-MTHFD2 induit la synthèse de novo de la purine (F), mTORC1-S6K1-CAD celle de la pyrimidine (G). L'axe mTORC1-SREBP favorise la synthèse des lipides et la voie du pentose phosphate (H). L'axe mTORC1-HIF1α favorise le métabolisme des glucides (I). L'axe du complexe mTOC1-Atg13 FIP200 inhibe la formation d'autophagosomes (J) et AMPK favorise la formation d'autophagosomes (K). L'axe mTORC1-TFEB inhibe la biosynthèse des lysosomes (L) et l'axe mTORC1-Erk 5Adc17 contrôle l'abondance du protéasome (M).

2.2. Rôles de mTORC2

Bien que sa fonction soit moins bien caractérisée, mTORC2 régule la motilité et la survie cellulaires *via* la phosphorylation des kinases de type AGC, dont PKB (protéine

kinase B, également appelée AKT), PKC (protéine kinase C) et SGK1 (kinases 1 induites par le sérum et les glucocorticoïdes) **(Figure 23)**.

a. mTORC2 et la réorganisation du cytosquelette/motilité :

Le premier substrat direct de mTORC2 a été découvert par hasard, la PKCα, qui régule la réorganisation du cytosquelette et donc la motilité cellulaire, bien que le mécanisme de ce processus ne soit pas clairement décrit (Jacinto et al. 2004; D. D. Sarbassov et al. 2004). Plus récemment, il a également été démontré que le mTORC2 phosphoryle plusieurs autres membres de la famille PKC, dont PKCδ, PKCζ, ainsi que PKCγ et PKCε, qui régulent tous divers aspects du remodelage du cytosquelette et de la migration cellulaire (Gan et al. 2012; X. Li et Gao 2014; Thomanetz et al. 2013).

b. mTORC2 et la survie, la prolifération et la croissance cellulaires :

mTORC2 est un activateur essentiel de la kinase AKT, impliquée dans la survie cellulaire (D. D. Sarbassov et al. 2005). mTORC2 phosphoryle la T450 d'AKT au cours de sa traduction pour assurer le repliement correct de la kinase. En réponse aux facteurs de croissance, mTORC2 phosphoryle la S473 d'AKT qui en coopération avec la phosphorylation de la T308 par PDK1 induit l'activation maximale d'AKT. AKT adapte le métabolisme cellulaire par inhibition phospho-dépendante des facteurs de transcription FoxO1/3a et des kinases NAD et GSK3β (Guertin et al. 2006; Hoxhaj et al. 2019). L'inactivation GSK3β augmente le taux de glucose libre pour assurer le métabolisme cellulaire. Enfin, AKT soutient la signalisation dépendante de mTORC1 *via* la phosphorylation de TSC2, un inhibiteur majeur de mTORC1 (Inoki et al. 2002). En plus d'AKT, mTORC2 active SGK1 pour induire la survie cellulaire (García-

Martínez et Alessi 2008). A l'échelle moléculaire, SGK1 induit la stabilisation de la ligase E3 MDM2 qui bloque alors la signalisation pro-apoptotique en ubiquitinant p53.

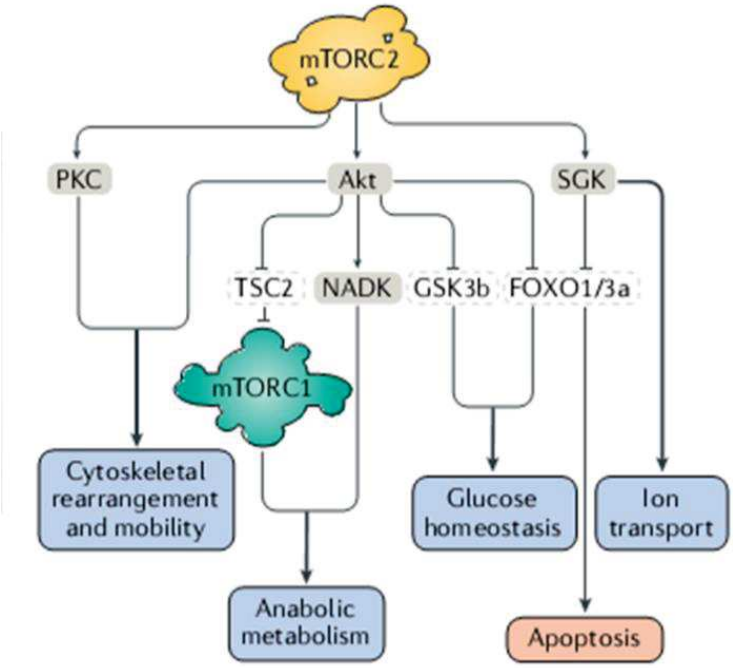


Figure 23 : Cibles en aval de la signalisation mTORC2 (*adaptée de Liu et Sabatini 2020).* mTORC2 active la famille des protéines kinases AGC (PKC, AKT et SGK1) et régule ainsi le réarrangement du cytosquelette, le métabolisme, le transport ionique et favorise la survie cellulaire.

3. Mécanismes de régulation de la signalisation mTOR

3.1. Régulation de mTORC1

En général, mTORC1 lance un programme anabolisant consommateur en ressource, il est donc activé que lorsque l'énergie, les facteurs de croissance et les éléments constitutifs macromoléculaires sont abondants. Les cellules doivent donc adapter l'activité mTORC1 en réponse aux oscillations de la disponibilité des nutriments, stimulés par l'alimentation ou le jeûne. Ces facteurs extracellulaires régulent l'activité mTORC1 *via* le complexe TSC (hétérotrimérique tuberous sclerosis complex) composée de TSC1, TSC2 et TBC1D7 **(Figure 24)** (Dibble et al. 2012). Dans des conditions de jeûne, ce complexe maintient le régulateur lysosomal Rheb sous forme

GDP inactif via son activité GAP (GTPase-activating protein) (Tee et al. 2003). A l'inverse, lors de l'alimentation, les facteurs de croissance vont déclencher l'activation de la voie de signalisation PI3K-PDK1-AKT et ainsi provoquer la levée de l'inhibition de la protéine de Rheb *via* la dissociation du complexe TSC de la surface lysosomale (Demetriades, Doumpas, et Teleman 2014). En parallèle, un milieu riche en acides aminés active le complexe Rag GTPases pour induire le recrutement de mTORC1 aux lysosomes et son activation par Rheb **(Figure 24)** (Rogala et al. 2019). Les facteurs de croissance peuvent utiliser une voie alternative d'activation de mTORC1 *via* la dissociation de 14-3-3 dépendante de l'inhibiteur PRAS40.

A l'inverse, dans des conditions de pénurie d'énergie ou d'oxygène, mTORC1 est inhibé par un mécanisme dépendant de TSC. Par exemple, l'épuisement des réserves d'ATP cellulaire active la kinase AMP-dépendante (AMPK) qui peut alors soit inhiber mTORC1 directement *via* la phosphorylation de Raptor ou indirectement en activant TSC2 (Gwinn et al. 2008; Inoki, Zhu, et Guan 2003). Par ailleurs, le stress cellulaire comme l'hypoxie ou les dommages à l'ADN induisent l'expression p53-dépendante des gènes codant pour AMPKβ, PTEN et TSC2, qui peuvent tous atténuer l'activité mTORC1 pour ralentir la prolifération et protéger l'intégrité du génome **(Figure 24)** (Feng et al. 2007)**.**

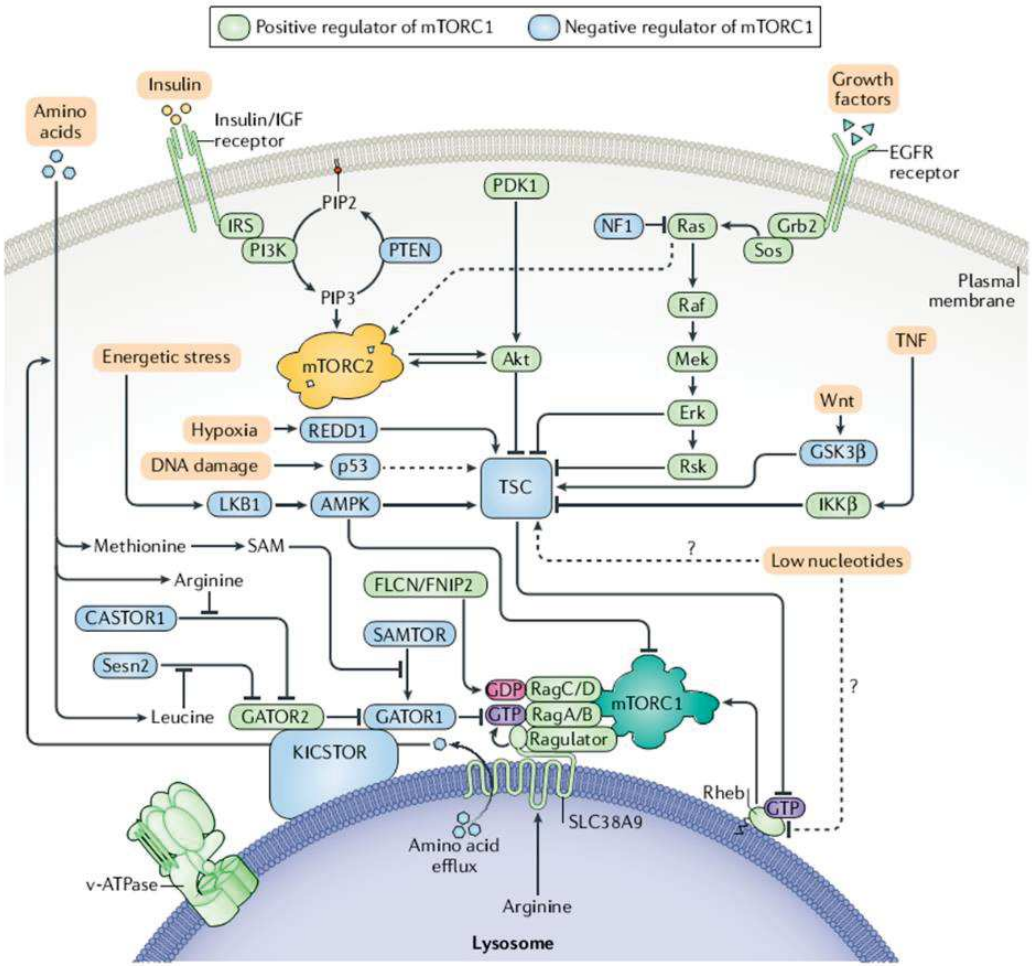


Figure 24 : Régulateurs en amont de la voie de signalisation mTOR (*adaptée de Liu et Sabatini 2020).*
mTORC1 et mTORC2 intègrent des informations environnementales pour garantir leur propre activation. mTORC1 se relocalise vers le lysosome en s'ancrant sur les Rag GTPases, qui ne peuvent recruter mTORC1 qu'en présence d'acides aminés. Une fois localisé à la surface lysosomale, mTORC1 peut alors être activé par la petite GTPase Rheb dans son état lié au GTP. La charge GTP de Rheb est favorisée par stimulation aux facteurs de croissance et bloquée par un stress énergétique ou une hypoxie. On pense que mTORC2 est principalement régulé par des facteurs de croissance. Bien qu'on ne sache pas clairement où l'activation de mTORC2 se produit, le domaine d'homologie de la pleckstrine de Sin1 peut recruter mTORC2 vers la membrane plasmique.

3.2. Régulation de mTORC2

La régulation de mTORC2 est beaucoup moins comprise que celle de mTORC1, en partie parce qu'il est difficile de démêler la régulation de mTORC1 de celle de mTORC2 dû aux interconnections et rétrocontrôles qu'il existe entre ces deux voies. Il est généralement admis que les facteurs de croissance sont les principaux signaux pour

activer mTORC2 **(Figure 24)**. Notamment, l'activation PI3K par ces facteurs de croissance va permettre : (i) le recrutement membranaire de Sin1 *via* son domaine PH, (ii) la levée d'inhibition de ce domaine sur la kinase mTOR et donc *in fine* l'activation de mTORC2. Son recrutement à la membrane permet alors l'activation maximale d'AKT (Gan et al. 2011; Yuan et Guan 2015, 1). En outre, un second modèle suggère que mTORC2 est retrouvé constitutivement à la membrane *via* son composant Sin1 (Fu et Hall 2020). L'activation partielle d'AKT par PDK1 induit la phosphorylation de Sin1 en Thr86 résultant en l'activation maximale de mTORC2 (Humphrey et al. 2013; G. Yang et al. 2015), qui en retour va pouvoir activer AKT pleinement *via* sa phosphorylation en Ser473, suggérant ainsi l'existence d'une boucle d'auto-amplification **(Figure 25)**. Par ailleurs, des études récentes suggèrent l'implication de petites GTPases de la famille Ras dans l'activation de mTORC2 *via* l'interaction avec Sin1 (Khanna et al. 2016; Kovalski et al. 2019). Cependant, il n'est pas clair si l'activation directe de mTORC2 par Ras-GTP est en aval des facteurs de croissance ou de PI3K. Récemment, plusieurs études font état d'un nouveau mécanisme de régulation de mTORC2 par ubiquitination de ses composants (Y. Jiang et al. 2019). Notamment, la poly-ubiquitination de LST8 et de Rictor en lysine K63, définit un mécanisme majeur de régulation de mTORC2. Mécanistiquement, les facteurs de croissance entrainent la déubiquitination de LST8 et de Rictor par la deubiquitinase OTUD7B (protéine 7B contenant le domaine OTU) et USP9X (ubiquitin-specific protease 9X) respectivement ce qui favorise la formation de mTORC2 et son activation (Agrawal et al. 2012; Bin Wang et al. 2017). D'un autre côté, l'E3-ligase et le suppresseur de tumeur FBXW7 induisent la dégradation ubiquitine-dépandente de mTOR et Rictor *via* un mécanisme dépendant de leur phosphorylation par GSK3β (Koo et al. 2015; Mao et al. 2008).

Enfin, la localisation subcellulaire de mTORC2 joue un rôle essentiel dans sa fonction (Ebner et al. 2017). En effet, l'activité de mTORC2 a été retrouvée à la membrane plasmique, dans les mitochondries et dans les vésicules endosomales. De plus, cette étude suggère que l'activité globale de mTORC2 à la membrane plasmique est constitutivement active et que seule une sous-population spatialement distincte est activable par les facteurs de croissance. Enfin, plusieurs études importantes ont révélé une activation de mTORC2 aux ribosomes pour la phosphorylation et l'activation des kinases AGC, telles que PKC et AKT, au cours de leur traduction (Oh et al. 2010; Zinzalla et al. 2011). Ces données suggèrent que l'activation de mTORC2 implique de multiples localisations et différents mécanismes et soulèvent d'autres questions, notamment de savoir si les signaux environnementaux, tels que les facteurs de croissance, régulent l'activité de mTORC2, et si oui, de savoir par quels mécanismes.

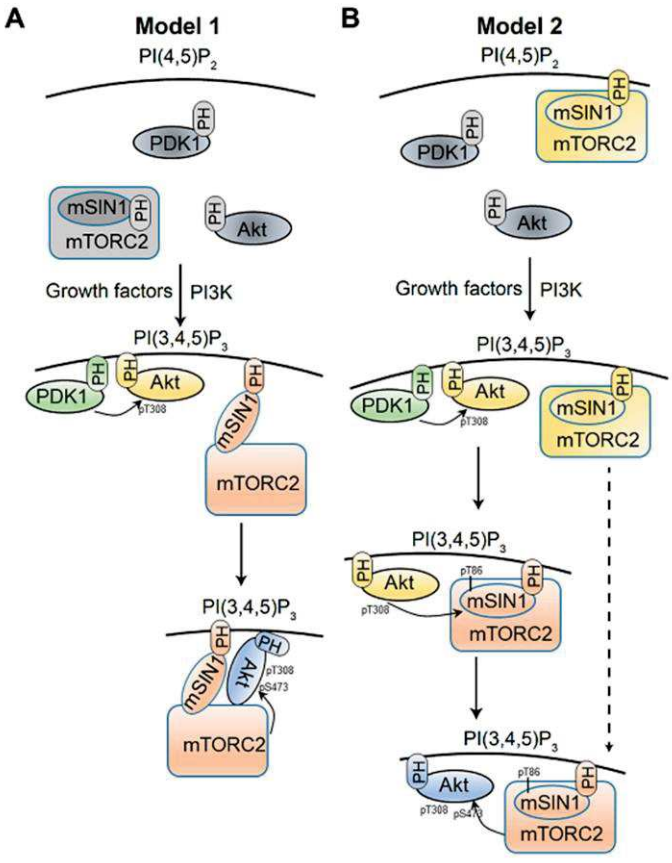


Figure 25 : Les facteurs de croissance induisent la phosphorylation d'AKT sur la Ser473 via mTORC2 (*adaptée de Fu et Hall 2020).*
Dans les deux modèles, en l'absence de facteurs de croissance, PDK1 et AKT sont localisés au niveau du cytoplasme. Lors de la stimulation du facteur de croissance, le PI(4,5)P2 est converti en PI(3,4,5)P3 *via* PI3K au niveau de la membrane plasmique, et PDK1 et AKT sont recrutés *via* leur domaine PH, conduisant à la phosphorylation d'AKT sur Thr308 par PDK1. Dans le modèle 1 (**A**), le PI(3,4,5)P3 recrute mTORC2 sur la membrane plasmique et active directement mTORC2 vers AKT Ser473 *via* la libération d'une conformation inhibitrice. Dans le modèle 2 (**B**), mTORC2 réside en permanence au niveau de la membrane plasmique. AKT Thr308 phosphoryle Sin1 sur Thr86, qui booste l'activité mTORC2. mTORC2 phosphoryle ensuite AKT sur la S473, conduisant à l'activation complète d'AKT.

3.3. Crosstalks connus entre mTORC1 et mTORC2

Vu que mTORC1 et mTORC2 utilisent des composants communs, il n'est pas surprenant que leurs activités soient coordonnées. Par exemple, au cours d'une réponse cellulaire anabolique, mTORC1 régule négativement mTORC2 *via* une boucle de rétrocontrôle négative. Ainsi, pour atténuer l'activité de la voie de signalisation PI3K/AKT, mTORC1 induit d'une part la dégradation du récepteur à l'insuline IRS1 par S6K1 (Harrington et al. 2004) et d'autre part il stabilise le régulateur négatif de l'activité catalytique de ce récepteur, Grb10 (growth factor bound-receptor protein 10) **(Figure 26)** (Yu et al. 2011). S6K1 peut également phosphoryler Sin1 en Thr86 et Thr389 pour inhiber l'intégrité de mTORC2, bien que des études complémentaires soient nécessaires pour confirmer l'existence de cette boucle de rétrocontrôle négatif **(Figure 26)** (P. Liu et al. 2013). A l'inverse, en réponse à un stress énergétique, le capteur d'énergie AMPK inhibe mTORC1, supprimant donc le rétrocontrôle négatif de mTORC2. De plus, AMPK peut augmenter l'activité de mTORC2 par phosphorylation directe de mTOR et de Rictor **(Figure 26)** (Kazyken et al. 2019). Ainsi, l'augmentation de l'activité mTORC2 peut permettre aux cellules de s'adapter à de faibles niveaux d'énergie cellulaire pour assurer leur survie.

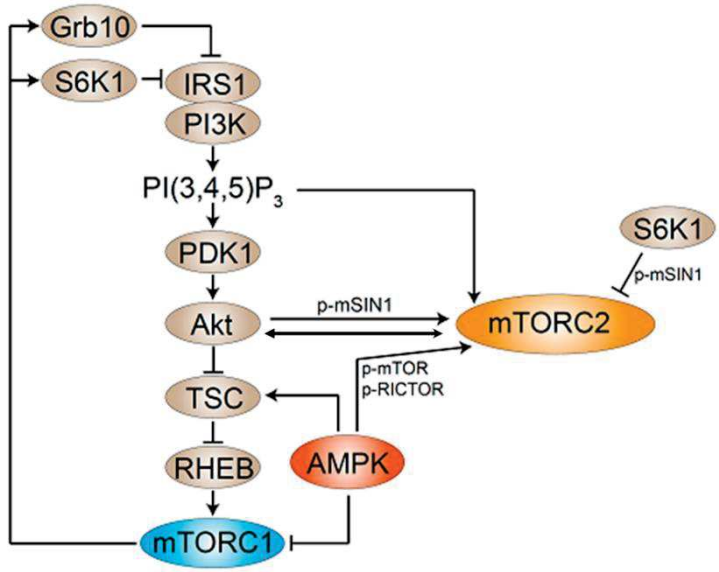


Figure 26 : Crosstalks connus entre mTORC1 et mTORC2 (*adaptée de Fu et Hall 2020).*
L'AMPK régule positivement l'activité de mTORC2. mTORC1 régule néga tivement l'activité de mTORC2 *via* S6K1.

4. Rôles de mTOR dans l'homéostasie intestinale

La létalité embryonnaire précoce induite par la suppression des gènes codant pour mTOR, Rictor et Raptor a grandement ralenti l'étude de la signalisation mTOR *in vivo.* Ainsi à ce jour, les fonctions de mTOR ont été largement déduites d'études basées sur des lignées cellulaires, mais récemment la déplétion conditionnelle des composants mTOR dans les organismes modèles a généré des questions intéressantes sur les fonctions physiologiques de mTOR dans des domaines tels que la régulation homéostatique dans les tissus adultes, la neurogenèse et la biologie des cellules souches. A ce titre, le rôle de mTOR dans l'épithélium intestinal des mammifères reste toujours mal défini. Néanmoins, quelques études ont démontré le rôle prépondérant de la signalisation mTOR dans la régulation de l'homéostasie intestinale. Ainsi, à travers l'utilisation de souris KO conditionnelles pour mTOR, Raptor et Rictor spécifiquement dans l'intestin, il a été suggéré que mTORC1, en contribution avec mTORC2 joue un rôle important dans la morphologie crypte/villosité particulièrement *via* la régulation de la maturation terminale des cellules sécrétrices, des cellules de Paneth et de la différenciation des entérocytes (Barron et al. 2017). Néanmoins, suite aux effets modestes relevés par le KO spécifique de Rictor, il est suspecté un rôle plus modeste du complexe mTORC2 dans ce processus. Inversement, l'activation de mTORC1 par ablation spécifique de TSC2 dans les IEC s'est avérée favoriser l'activité prolifération et la différenciation des entérocytes dans l'intestin grêle et le côlon de souris (Kotani et al. 2020; Setiawan et al. 2019). En revanche, l'étude montre que cette activation de mTORC1 n'affecte pas le nombre de cellules sécrétrices de mucus, ni le nombre de cellules de Paneth, alors qu'elle perturbe le bon positionnement des cellules Paneth à la base de la crypte. Ces résultats suggèrent que l'activité mTORC1 n'est pas essentielle pour la différenciation de ces cellules, mais est importante pour

leur migration et leur positionnement adéquat le long de l'axe Crypte-Villosité (Setiawan et al. 2019).

De manière surprenante, la déplétion de mTOR/Rictor/Raptor dans l'intestin de souris révèle que mTOR n'est pas essentiel pour la prolifération et la survie des cellules de la crypte homéostatique (Sampson et al. 2016). Au contraire, l'ablation de TSC2 dans les IEC du côlon réduit la population d'ISC Lgr5^{+} et la signalisation Wnt dans le côlon, suggérant que l'activation de mTORC1 contrecarre la signalisation Wnt dans l'épithélium colique (Kotani et al. 2020). Cette notion est cohérente avec l'observation selon laquelle TSC1/2 est nécessaire pour le maintien des ISC chez la drosophile (Quan et al. 2013). Cette contradiction de phénotype entre les souris KO TSC1/2 et mTOR/Raptor sur l'homéostasie intestinale adulte est vraisemblablement la conséquence indirecte de l'activité excessive de mTORC1 qui, en favorisant continuellement le renouvellement des IEC, pourrait convertir les ISC en IEC progéniteurs, et ainsi diminuer le pool de ISC. Enfin, les complexes mTORC1 et mTORC2 semblent être importants pour la régénération de l'épithélium intestinal suite à des lésions où l'inactivation génétique de ces complexes est associée à une atrophie épithéliale intestinale et une diminution de l'activité des ISC et des cellules progénitrices (Sampson et al. 2016). A l'échelle moléculaire, mTOR stimule la régénération épithéliale intestinale en aval de Wnt/Myc en favorisant la traduction des messagers nécessaires à ce processus de réparation.

5. Rôles de mTOR dans la tumorigenèse colique

Étant donné l'importance de l'activité mTOR pour la prolifération des IEC, l'activation aberrante de mTORC1/2 participe probablement à la tumorigenèse intestinale (Francipane et Lagasse 2014). L'importance de la voie mTORC1 dans la formation des polypes intestinaux a été démontrée à partir d'un modèle murin de polypose

adénomateuse familiale (APCΔ716) (Fujishita et al. 2008). Ces études montrent que mTORC1 stimule l'instabilité chromosomique par la formation d'un pont anaphasique, améliorant ainsi à la fois l'initiation et la progression tumorales. Cette activité tumorale a été également observée sur des adénomes intestinaux de patients et a permis de confirmer que la dérégulation de la signalisation mTORC1 constitue un événement précoce dans le processus de tumorigenèse en participant à la progression des cellules normales vers un phénotype néoplasique. En accord avec cette hypothèse, l'inhibition pharmacologique de mTORC1 diminue la formation de polypes et réduit la mortalité chez les souris APCΔ716 (Fujishita et al. 2008). En plus de l'initiation tumorale, plusieurs rapports suggèrent un rôle de mTOR dans la progression tumorale colorectale. Ainsi, l'inhibition de l'expression de mTORC2 réduit la formation de tumeurs intestinales dans un modèle de xénogreffes de cellules cancéreuses chez la souris immunodéprimée. Enfin, cette dérégulation participe également à l'induction de l'EMT nécessaire à la dissémination des cellules tumorales et à la formation de métastases. Mécanistiquement, mTORC1 et mTORC2 régulent l'EMT, la motilité et les métastases des CCR *via* les GTPases RhoA et Rac1 (Gulhati et al. 2011, 2011). En accord avec un rôle important dans cette pathologie, l'inhibition pharmacologique (utilisant la rapamycine) et génétique (utilisant l'interférence ARN) de mTORC1 (Raptor) et mTORC2 (Rictor) réduisent significativement la migration et l'invasion cellulaires ainsi que l'occurrence des métastases *in vivo*.

6. Mécanismes de dérégulation de mTOR dans le CCR

6.1. Dérégulation de mTOR

Le gène mTOR est situé sur le chromosome 1p36.22 et ce locus est fréquemment amplifié ou muté dans le cancer chez l'homme. Cependant, dans les cancers du côlon, la prévalence à la fois du gain et de la perte de variation du nombre de copies n'est

pas significativement élevée, suggérant que ces altérations ne peuvent contribuer qu'à une très faible fraction des CCR. Une analyse détaillée de la base de données COSMIC (Catalogue Of Somatic Mutations in Cancer, UK) a révélé qu'une surexpression du gène mTOR est tout de même observée dans 2.85% d'une cohorte de 351 échantillons d'adénocarcinomes. De manière cohérente, une corrélation positive entre un stade de malignité plus élevée et un niveau d'expression plus élevé de mTOR est couramment observée. Notamment, le taux de la protéine mTOR est significativement élevé dans les CCR primaires de stade IV et ce profil de surexpression est maintenu dans les métastases distantes (Gulhati et al. 2011). Il semble que les mutations mTOR se produisent plus fréquemment dans les tumeurs des tissus à forte capacité d'auto-renouvèlement tels que le CCR. Ainsi, la prévalence des mutations mTOR est de 6.37% (244/3830) dans le CCR (Murugan 2019). Par ailleurs, une étude se basant sur les données publiques de séquences génomiques a indiqué que 33 mutations mTOR pourraient contribuer à l'hyperactivation de la signalisation mTOR dans divers types de cancers dont le CCR. La plupart de ces mutations se trouvent dans six régions distinctes au niveau de la région C-terminale de mTOR (Grabiner et al. 2014). La présence de ces clusters suggère qu'il y a un avantage sélectif à acquérir des mutations dans certaines régions de mTOR. La caractérisation fonctionnelle *in vitro* des mutations récurrentes montre qu'elles permettent l'activation des substrats respectifs de la signalisation mTORC1 et mTORC2. Les mutations dans le domaine kinase et proche de la boucle d'activation pourraient déréguler le complexe. Par ailleurs, les mutations dans le domaine FAT (L1460P et C1483Y) diminuent la liaison de mTOR à l'inhibiteur DEPTOR, entraînant ainsi l'hyperactivation des deux complexes mTORC1/2 (Murugan 2019).

6.2. Activation des composants des complexes mTORC1/2

Bien que les gènes associés aux composants des deux complexes sont peu mutés dans le CCR, les différents composants sont fréquemment surexprimés (Alqurashi et al. 2013; Gulhati et al. 2011), ce qui est étroitement associé à la progression du CCR. Par exemple, une augmentation de l'ARNm et de la protéine Rictor sont associées à un mauvais pronostic dans le CCR. La surexpression de Rictor semble être médiée, en partie, par la dérégulation de l'expression de certains microARNs. Par exemple, la perte du cluster miR-424/503 est associée à une expression accrue de Rictor dans les tissus cancéreux du côlon (Oneyama et al. 2013). La réexpression du miR-424/503 provoque une diminution d'expression de Rictor et une diminution de la tumorigénicité et de l'activité invasive de ces cellules. Raptor est également surexprimé dans les CCR mais les mécanismes associés ne sont pas clairement identifiés. Enfin, LST8 et Sin1 sont également surexprimés dans le CCR (Kakumoto et al. 2015; Q. Wang et al. 2017). Les mécanismes associés ne sont pas décrits, mais il est possible que l'incorporation de ces composants dans un complexe actif prévienne leurs dégradations. D'autre part, plusieurs mutations du gène LST8 ont récemment été identifiées mais leurs rôles fonctionnels n'ont pas été rapportés.

6.3. Activation de la signalisation en amont de mTOR

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, la dérégulation des voies de signalisation se trouvant en amont de mTOR: Wnt/β-caténine, p53, Ras/MAPK, PI3K/AKT, DCC sont impliquées dans la carcinogenèse colorectale et dans la progression tumorale.

7. Les inhibiteurs de mTOR en thérapie anticancéreuse

mTOR est devenu une cible thérapeutique attractive en oncologie, bien que l'intérêt pour le CCR n'ait pas été encore démontré. Il existe à ce jour trois générations d'inhibiteurs de mTOR (Y. Chen et Zhou 2020).

7.1. Première génération d'inhibiteurs de mTOR

L'effet anti-tumoral de la rapamycine dans le CCR a été démontré *in vitro* et dans divers modèles murins. Malheureusement, son hydrophobicité et sa faible biodisponibilité en font un agent anti-tumoral peu optimal. En conséquence, une série d'inhibiteurs allostériques de mTOR (appelés rapalogues) a été développée comme le temsirolimus, l'evérolimus, le ridaforolimus et l'ABI-009 (nanoparticule liée à l'albumine et à la rapamycine) **(Figure 27)**. Cependant, bien que le temsirolimus et l'évérolimus soient approuvés pour le traitement du carcinome rénal métastatique et des tumeurs neuroendocrines pancréatiques, plusieurs essais cliniques n'ont, à ce jour, pas réussi à démontrer d'efficacité significative pour le traitement du CCR métastatique en monothérapie. En particulier, les effets du temsirolimus étaient limités chez les patients atteints de CCR métastatiques KRAS mutés. Ainsi, l'efficacité du traitement par rapalogue en monothérapie est modeste, bien que non surprenant étant donné que certaines études précliniques relatent que la rapamycine n'inhibe qu'un sous-ensemble de substrats de mTORC1. De plus, les rapalogues contrecarrent les boucles de rétrocontrôle, augmentant ainsi la signalisation PI3K et la voie mTORC2 qui favorisent la tumorigénicité.

7.2. Deuxième génération d'inhibiteurs de mTOR

Des inhibiteurs de mTOR de deuxième génération ont été développés avec pour objectif d'inhiber le site catalytique de mTOR. Ces analogues de l'ATP ont montré de meilleurs effets anticancéreux que les rapalogues **(Figure 27)**. Par exemple, NVP-BEZ235, un double inhibiteur de la signalisation PI3K et mTOR, démontre une activité anti-cancéreuse supérieure dans un modèle de souris génétiquement modifiées de CCR sporadiques et dans de modèles de xénogreffes de cellules de CCR chez la souris immunodéprimée (Blaser et al. 2012; Roper et al. 2011). Néanmoins, bien qu'une résistance innée soit observée chez de nombreux patients, la combinaison de ces inhibiteurs avec des EGFRi semble prévenir une résistante induite. Malgré cela, ces inhibiteurs n'ont pas démontré leur efficacité dans le CCR métastatique, sans doute à cause de leur manque de spécificité, de leur toxicité et de l'acquisition fréquente de résistances induites. En effet, sont en cause les nombreuses interconnexions que la voie mTOR entretient avec d'autres voies de signalisation qui donnent lieu à des boucles compensatrices permettant aux cellules tumorales d'échapper aux stimuli anti-tumoraux. Une meilleure compréhension de l'activité oncogénique de mTOR est donc nécessaire pour la conception de molécules anti-cancéreuses plus efficaces dans le CCR.

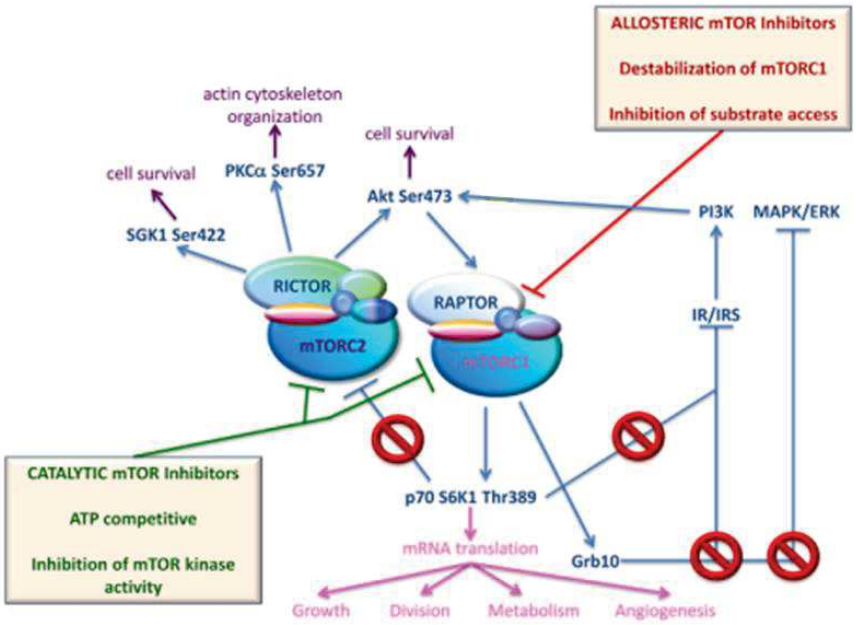


Figure 27 : Inhibiteurs de mTOR dans les cancers humains (*adaptée de Francipane et Lagasse 2014).*
Les inhibiteurs allostériques de mTOR (rapalogues) ne parviennent pas à inhiber la signalisation de mTORC2 et libèrent la boucle de rétrocontrôle médiée par mTORC1 sur mTORC2. Les inhibiteurs catalytiques de mTOR inhibent à la fois mTORC1 et mTORC2, et bloquent la voie de signalisation oncogénique PI3K/AKT/mTOR.

III. LE CONTROLE DE LA SIGNALISATION ONCOGENIQUE DES SFK PAR LA PROTEINE ADAPTATRICE SLAP

A. Les protéines adaptatrices

1. Généralités

Les protéines adaptatrices ou adaptateurs sont des composants essentiels de la signalisation pTyr-dépendante. Ces protéines ne possèdent pas d'activité enzymatique propre mais agissent comme des plateformes moléculaires qui coordonnent les événements de signalisation. Elles fonctionnent comme des protéines d'échafaudage qui permettent des interactions spécifiques avec une ou plusieurs protéines de signalisation effectrices pour réguler leur localisation et/ou leur activité. Ces protéines sont classées en trois grandes familles : (i) les protéines d'échafaudage qui régulent un grand nombre de protéines effectrices, (ii) les protéines transmembranaires qui ancrent les effecteurs de signalisation à la membrane plasmique, et (iii) les petits adaptateurs cytoplasmiques qui se lient à deux partenaires **(Figure 28)** (Buday et Tompa 2010).

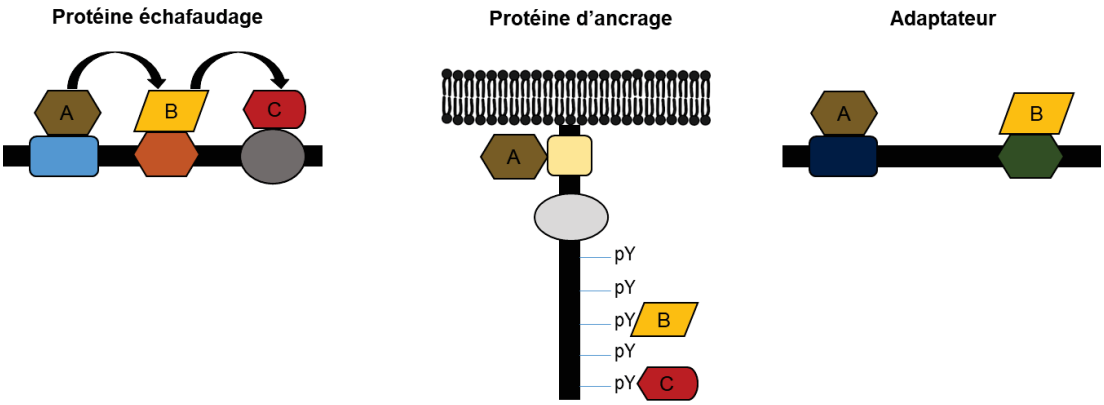


Figure 28 : Les protéines adaptatrices *(adaptée de Buday et Tompa 2010)*
On distingue trois catégories de protéines adaptatrices : (i) les protéines d'échafaudage qui rapprochent plus de deux protéines de signalisation (ici A, B, C) formant ainsi des complexes multi-protéiques, (ii) les protéines d'ancrage situées au niveau de la membrane plasmique recrutant des effecteurs (ici A, B, C) grâce à la présence dans leur séquence de multiples résidus Tyr phosphorylables et (iii) les adaptateurs simples connectant seulement deux partenaires ensemble (ici A, B).

D'un point de vue fonctionnel, les protéines adaptatrices peuvent réguler positivement ou négativement la transduction du signal **(Figure 29)**. Dans la suite de ce manuscrit, je m'intéresserai plus particulièrement aux petits adaptateurs cytoplasmiques qui régulent les voies de signalisation dépendantes des PTK.

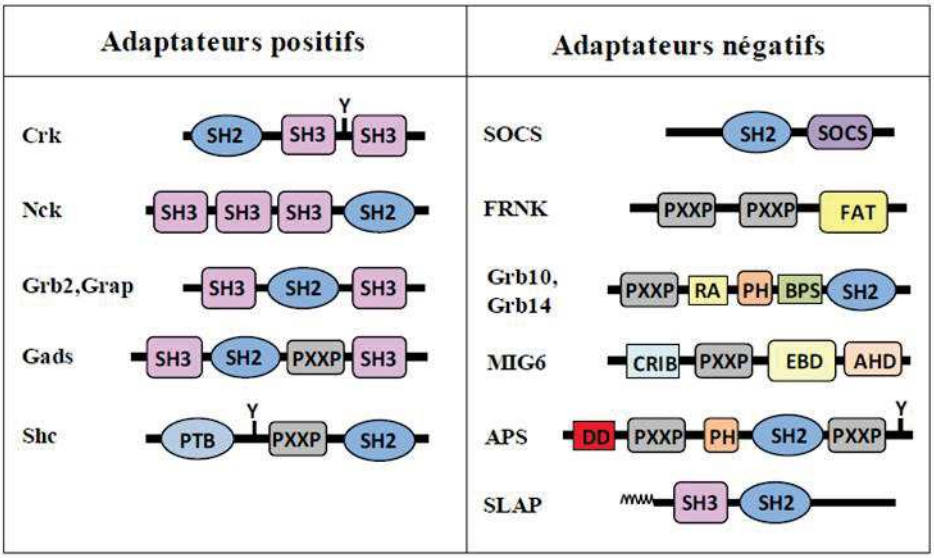


Figure 29 : Liste non exhaustive d'adaptateurs régulant positivement ou négativement des voies de signalisation dépendantes des PTK.
Les structures des différents adaptateurs positifs et négatifs avec leurs domaines ou motifs d'interaction sont représentés. SH2, domaine *SRC homology 2* ; SH3, domaine *SRC homology 3* ; PTB, domaine *phosphotyrosinebinding* ; Y, résidu Tyr phosphorylable ; PXXP, région riche en proline ; SOCS, domaine SOCS box ; FAT, domaine *focal adhesion targeting* ; RA, domaine *Ras association* ; PH, domaine *pleckstrin homology* ; BPS, région *between PH and SH2* ; CRIB, *Cdc42/Rac interactive binding region* ; EBD, *ErbB binding domain* ; AHD, *Ack1 homology domain* ; DD, domaine de dimérisation.

2. Les adaptateurs positifs

2.1. Introduction

Le premier adaptateur identifié est Crk, suite à la découverte du produit transformant du rétrovirus de sarcome aviaire CT10 (B. J. Mayer, Hamaguchi, et Hanafusa 1988). A la suite de cette découverte, plusieurs adaptateurs ont été identifiés : DAPP1, Grb2, Nck, SHB, SH3BP2, SHC, SH2D1-5, SLP76 et STAP (B. A. Liu et Nash 2012). Historiquement, notre compréhension des mécanismes par lesquels ces adaptateurs régulent la signalisation cellulaire a été illustrée par l'exemple de Grb2 (van der Geer,

Hunter, et Lindberg 1994). Par son domaine SH3 N-terminal, Grb2 est constitutivement associé au domaine C-terminal riche en proline de Sos, le facteur d'échange de la GTPase Ras. L'activation des RTKs permet le recrutement membranaire du complexe Grb2-Sos *via* l'interaction de Grb2-SH2 avec le récepteur phosphorylé pour activer la petite GTPase Ras membranaire sous forme Ras-GTP. Ras active alors la voie de signalisation MAPK conduisant à la prolifération ou la migration cellulaires. La découverte de l'adaptateur Grb2 a ainsi permis de trouver le lien entre les récepteurs aux facteurs de croissance et l'activation de la voie Ras/MAPK **(Figure 30)**. Ce mécanisme, très conservé au cours de l'évolution, joue un rôle crucial dans la croissance cellulaire. En ce sens, l'invalidation du gène *Grb2* chez la souris a révélé un rôle critique de Grb2 au cours de l'embryogenèse (Cheng et al. 1998).

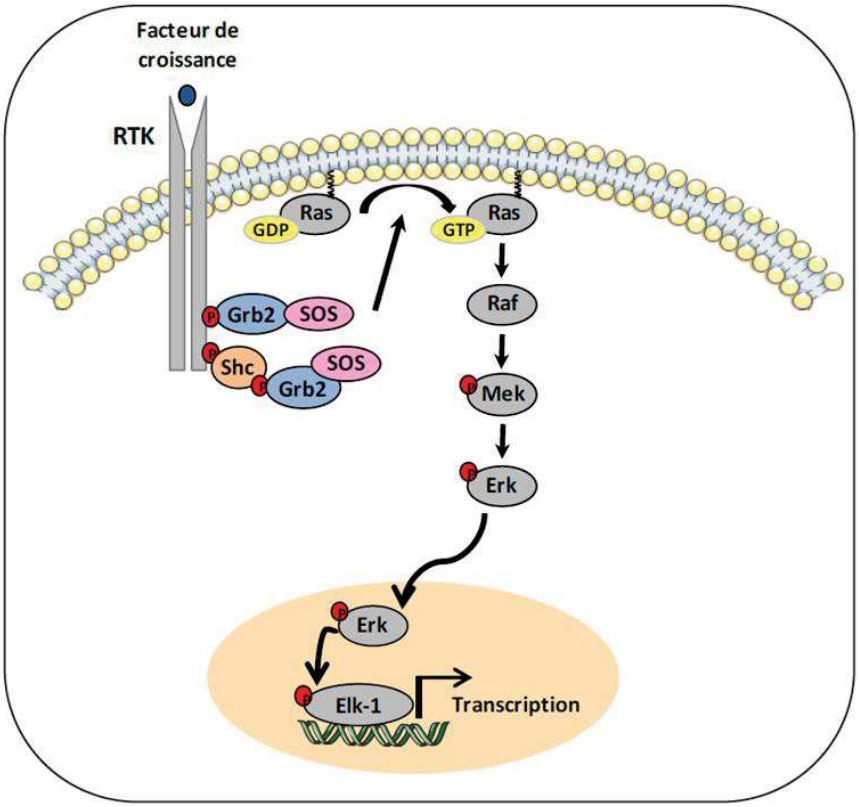


Figure 30 : Mécanisme d'activation de la voie Ras/MAPK par l'adaptateur positif Grb2.
Grb2 est lié constitutivement au facteur d'échange Sos. En réponse aux facteurs de croissance, les RTK sont activés et phosphorylés sur Tyr permettant ainsi l'interaction avec l'adaptateur Grb2 soit directement soit *via* un autre adaptateur comme Shc. Le recrutement de Sos, par l'intermédiaire de Grb2, à la membrane permet l'activation de Ras qui peut alors activer la voie MAPK.

3. Les adaptateurs négatifs

3.1. Présentation des adaptateurs négatifs

Peu après la découverte de Grb2, un nouveau groupe de petits adaptateurs régulant négativement les réponses cellulaires dépendantes des PTK a été identifié. L'un des premiers exemples était l'adaptateur CIS (cytokine inducible SH2-domain containing protein), découvert lors de la recherche de nouveaux gènes induits par les cytokines (Yoshimura et al. 1995). CIS est composé de 257 acides aminés qui contient un domaine SH2 homologue à celui du facteur de transcription STAT5 (Signal transducer and activator of transcription 5). L'expression ectopique de CIS inhibe la croissance des cellules hématopoïétiques BaF3 stimulée à l'interleukine 3 (IL-3) et à l'érythropoïétine dénotant ainsi un rôle négatif de CIS dans la transduction du signal (Yoshimura et al. 1995). Depuis cette découverte, de nombreuses autres protéines avec des propriétés semblables ont été identifiées. Je m'intéresserai plus particulièrement à celles qui inhibent les voies de signalisation dépendantes des PTK. Les différents adaptateurs de cette famille, la nature des voies de signalisation inhibées ainsi que leur mode de fonctionnement sont résumés dans le **tableau 4**. À l'exception des membres de la famille SOCS (Suppressor of cytokine signaling), ces adaptateurs sont apparus tard au cours de l'évolution, dans un but de régulation fine de la signalisation intracellulaire. Ils définissent principalement des boucles de rétrocontrôle, comme l'ont révélées des expériences de perte de fonction chez la souris, combinées à des études biochimiques. Ils régulent ainsi négativement la signalisation des PTK selon trois mécanismes d'action distincts qui impliquent : (i) l'inhibition directe de l'activité des PTK, (ii) la dégradation de composants spécifiques de la signalisation pTyr *via* le recrutement de facteurs d'ubiquitination et (iii) la

compétition avec des protéines de signalisation pour la liaison au récepteur activé, dont les CTKs. J'illustrerai ces mécanismes à travers l'exemple de SOCS.

Adaptateur négatif	PTK régulée	Mécanisme de régulation
SOCS/CIS	**JAK**	Inhibition de l'activité catalytique Compétition Dégradation *via* le système ubiquitine/protéasome (Illustration de ces mécanismes Figure 32)
FRNK	**FAK**	Compétition *(Richardson et al. 1997)*
Grb10/Grb14	**InsR** **IGFR**	Inhibition activité catalytique Compétition (Ceccarelli et Sicheri 2009; Holt et Siddle 2005)
MIG6	**EGFR**	Inhibition de l'activité catalytique *(Gotoh 2009)*
APS	**PDGFR** **InsR**	Dégradation *via* le système ubiquitine/protéasome *(Ahmed, Smith, et Pillay 2000; Yokouchi et al. 1999)*
SLAP/SLAP2	**SFK**	Compétition Dégradation *via* le système ubiquitine/protéasome (Illustration de ces mécanismes Figures 37 et 39)

Tableau 4 : Exemple d'adaptateurs négatifs et leurs modes de fonctionnement.

3.2. La régulation de la voie JAK/STAT par SOCS

Les protéines adaptatrices de la famille SOCS sont apparues tôt au cours de l'évolution avec l'apparition de composants de signalisation JAK/STAT qui sont des transducteurs majeurs de la signalisation des cytokines et des interférons (Endo et al. 1997; Naka et al. 1997). Chez les mammifères, il existe huit membres SOCS (SOCS1–7 et CIS) présentant une structure modulaire similaire, à savoir un domaine N-terminal de séquence et de longueur variable, un domaine SH2 central homologue à ceux des STAT, et une boîte SOCS qui interagit avec l'Elongine et la Culline pour conférer une activité E3 ligase. SOCS1 et SOCS3 possèdent une région inhibitrice de kinase (KIR) dans leur domaine N-terminal (**Figure 31**).

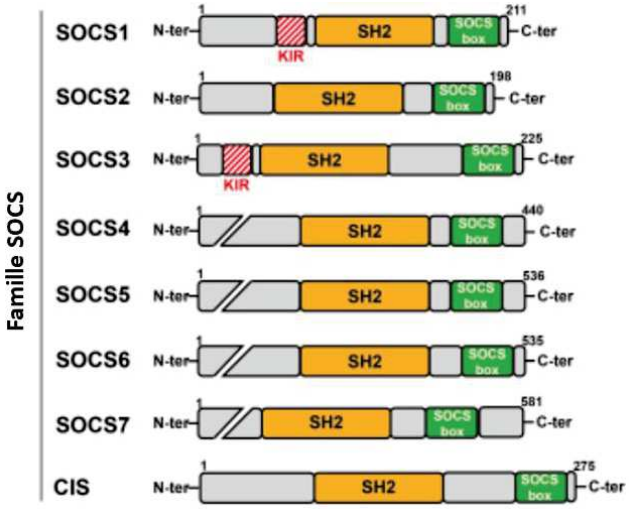


Figure 31: Structure des adaptateurs de la famille SOCS.
Les membres de la famille SOCS sont constitués d'une région N-terminale variable, d'un domaine SH2 et d'un domaine C-terminal nommé SOCS box. SOCS1 et SOCS3 possèdent également une région inhibitrice de kinase (KIR).

Ces adaptateurs inhibent la signalisation cellulaire par les mécanismes suivants (**Figure 32**) :

- (i) Inhibition directe de l'activité kinase de JAK (i.e. SOCS1 et SOCS3). Ce mécanisme d'inhibition fait intervenir leur domaine SH2 et leur région inhibitrice KIR qui agît comme pseudo-substrat (Sasaki et al. 1999; Yasukawa et al. 1999). Cependant, le mécanisme d'inhibition est significativement différent entre ces deux adaptateurs. Par exemple, SOCS1 interagit avec la boucle d'activation de Jak2 phosphorylée *via* son domaine SH2 et bloque l'accès à l'ATP et aux substrats *via* son domaine KIR (Giordanetto et Kroemer 2003). SOCS3 bloque cette activité *via* son domaine KIR après association aux récepteurs de cytokines via son domaine SH2 (Babon et al. 2012). Il semblerait donc que le recrutement de SOCS1 par JAK soit direct tandis que celui de SOCS3 nécessite son recrutement au récepteur.

- (ii) Dégradation de JAK : SOCS1 et 3 induisent la dégradation des JAK via leur domaine « SOCS box » (van de Geijn, Gits, et Touw 2004). Ce domaine permet le recrutement du complexe E3 ubiquitine ligase composé d'Elongin B et C, cullin-2/5 et ringbox ½, pour dégrader les récepteurs des cytokines JAKs et des effecteurs

spécifiques du récepteur, dont IRS1/2 dans le cas du récepteur à l'insuline et MAL dans le cas des récepteurs Toll-Like.

- (iii) Mécanisme de compétition avec STAT pour la liaison au récepteur : CIS inhibe le recrutement des STAT au récepteur phosphorylé via son domaine SH2 qui est très homologue à celui des STAT. Par exemple, CIS inhibe la liaison de STAT5 au récepteur à l'erythropoïétine (Epo) bloquant ainsi son activation par JAK (Matsumoto et al. 1997).

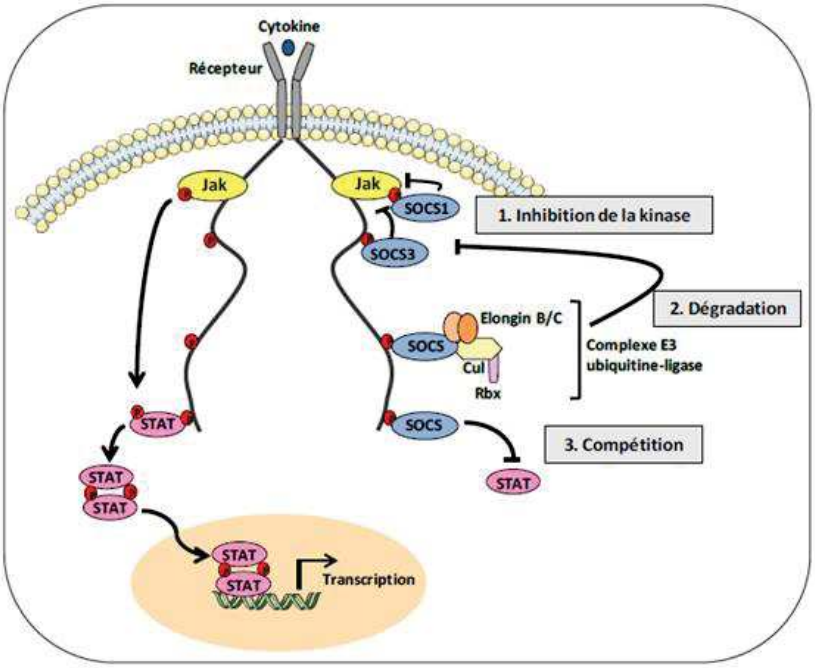


Figure 32 : Mécanismes d'inhibition de la voie Jak/STAT par les adaptateurs négatifs SOCS (*adaptée de Piessevaux et al. 2008)*.
A gauche, la liaison de la cytokine à son récepteur entraîne une oligomérisation des récepteurs menant à l'activation par autophosphorylation des PTK Jak associées. Les Jaks phosphorylent des résidus Tyr des domaines cytoplasmiques des récepteurs créant ainsi des sites de liaison pour le recrutement d'effecteurs tels que les STAT. La phosphorylation des STAT par Jak permet leur dimérisation et leur translocation au noyau pour activer des gènes cibles.
A droite, les adaptateurs SOCS inhibent la voie de signalisation Jak/STAT par 3 mécanismes : (1) l'inhibition directe de l'activité kinase de Jak ; (2) la dégradation de Jak grâce à la formation d'un complexe E3 ubiquitine ligase et (3) La compétition pour la liaison au récepteur activé avec l'effecteur STAT.

B. Inhibition des voies dépendantes des SFK par SLAP

1. La famille des adaptateurs SLAP

1.1. Présentation de SLAP

Au vu de l'émergence de cette nouvelle classe d'adaptateurs, il était attendu qu'un tel adaptateur négatif puisse exister pour les SFK. C'est en 1995 que Dixit et *al.* publient le clonage du gène codant pour une protéine adaptatrice ayant une forte homologie de structure avec SRC, appelé SLAP pour SRC-Like adaptor protein (A. Pandey, Duan, et Dixit 1995). Celui-ci a été identifié par criblage double hybride d'une banque d'ADNc issue de cerveau embryonnaire de souris avec le domaine cytoplasmique du RTK EphA2 (A. Pandey, Duan, et Dixit 1995). Le gène SLAP est issu de la duplication de SRC et code pour une protéine adaptatrice de 276 acides aminés (B. A. Liu et Nash 2012). Ainsi, comme les SFK, SLAP possède une séquence N-terminale unique déstructurée avec un site de myristoylation, suivie de domaines SH3 et SH2 présentant respectivement 50% et 51% d'identité avec ceux des SFK. En revanche, SLAP ne possède pas de domaine catalytique mais contient à la place un domaine C-terminal unique **(Figure 33)** (Naudin, Chevalier, et Roche 2016).

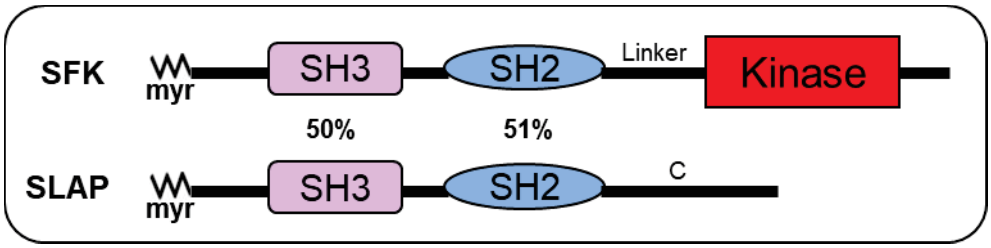


Figure 33 : Structure de l'adaptateur SLAP.
Comme les SFK, SLAP possède un site de myristoylation (myr) en N-terminal, suivi des domaines SH3 et SH2. En revanche, SLAP ne possède pas de domaine kinase mais possède à la place un domaine C-terminal unique.

- Région N-terminale : Cette courte région déstructurée composée de 24 acides aminés possède un site de myristoylation (Gly2) impliqué dans la localisation à la membrane (G. Manes, Bello, et Roche 2000). Une analyse de séquence lui suggère un site de liaison aux domaines SH3 avec des propriétés de dimérisation qui restent à être vérifier expérimentalement.

- Domaine SH3 : Bien que les domaines SH3 de SRC et de SLAP soient très homologues (50% d'homologie), plusieurs acides aminés importants pour la surface de liaison des ligands ne sont pas conservés dans le domaine SH3 de SLAP. En effet, les résidus Tyr90, Asp99, Asp117 et Tyr136 sont remplacés respectivement par les résidus Thr (ou Ser pour la séquence humaine), Pro, Gly et Cys (G. Manes, Bello, et Roche 2000). En revanche, on retrouve un Trp en position 58, qui est le résidu clé de l'interaction avec le motif poly-proline du ligand, et une proline en position 73 qui est conservée dans tous les domaines SH3 fonctionnels. Ces différences structurales importantes suggèrent une spécificité de liaison au domaine SH3 de SLAP qui n'est pas partagée avec ceux des SFK. Cette hypothèse a été validée pour Sam68, Shc et la sous-unité régulatrice p85α des PI3K de type I. Actuellement, peu de partenaires du domaine SH3 de SLAP ont été identifiés **(Tableau 5).**

- Domaine SH2 : Il présente une forte homologie de séquence avec SRC-SH2 qui suggère l'interaction avec des partenaires communs. Cependant, une analyse fine des séquences peptidiques retenues par le SH2 de SLAP montre une interaction préférentielle avec une séquence consensus de type pY[E/D/A/S]X[P/V/L/I] (X. Chen et al. 2009). Ces résultats prédisent malgré tout une différence de liaison du domaine SH2 de SLAP en comparaison avec celui de SRC (pYEEI). Plusieurs partenaires du domaine SH2 de SLAP identifiés sont listés dans le **tableau 5.**

- Extrémité C-terminale : A la place d'un domaine kinase, SLAP contient un domaine C-terminal unique de 104 acides aminés. Ce domaine contient une région hydrophobe (riche en Leu) qui est impliquée dans l'interaction de SLAP avec l'E3-ubiquitine ligase c-Cbl. De plus, on trouve une région fortement chargée (riche en résidus Arg, Lys, Glu et Asp) qui permettrait l'homodimérisation de SLAP et l'activation de son partenaire Cbl (Tang et al. 1999).

Protéine	Type cellulaire	Méthode d'identification	Référence
c-Cbl	Levure Jurkat Cos-7	Criblage double hybride GST-pulldown Co-IP	(Myers et al. 2006) (A. Sirvent et al. 2008) (Tang et al. 1999)
CD3ζ (TCRζ)	Jurkat	GST-pulldown Co-IP	(Tang et al. 1999) (Myers, Dragone, et Weiss 2005)
CSF1R	BMMs (macrophages)	Co-IP GST-pulldown	(H.-J. Kim et al. 2010)
EPHA2	Levure HEK293T	Criblage double hybride GST-pulldown	(A. Pandey, Duan, et Dixit 1995)
EpoR	Erythroblastes HEK293T	Co-IP	(Lebigot et al. 2003)
FLT3	Cos-1	Co-IP	(Kazi et Rönnstrand 2012, 3)
GM-CSFRα	BM-DC	GST-pulldown	(Liontos et al. 2011)
Igα (CD79a)	BAL-17	GST-pulldown Co-IP	(Dragone, Myers, White, Gadwal, et al. 2006) (Dragone, Myers, White, Sosinowski, et al. 2006)
KIT	Cos-1 P815	Co-IP	(Kazi et al. 2014)
LAT	Jurkat Cos-7	GST-pulldown Co-IP	(Tang et al. 1999) (Tomasz Sosinowski et al. 2000)
Lck	Jurkat	GST-pulldown Co-IP	(Tomasz Sosinowski et al. 2000)
PDGFR	NIH3T3 Cos-7	Co-IP GST-pulldown	(Manes, Bello, et Roche 2000) (Serge Roche et al. 1998)
SLAP	Cos-7	Co-IP	(Tang et al. 1999)
SLP-76	Jurkat	GST-pulldown Co-IP	(Tomasz Sosinowski et al. 2000)
SYK	Jurkat Cos-7	GST-pulldown Co-IP	(Tang et al. 1999)
UBE4A	HT29, SW620	Co-IP	(Naudin et al. 2014)
V-abl	V-abl NIH3T3	Co-IP	(Swaminathan, Feshchenko, et Tsygankov 2007)
Vav	Jurkat	GST-pulldown Co-IP	(Tomasz Sosinowski et al. 2000)
ZAP-70	Jurkat	GST-pulldown Co-IP	(Tang et al. 1999) (Tomasz Sosinowski et al. 2000)

Tableau 5: Interacteurs connus de SLAP.

1.2. Présentation de SLAP2

Trois équipes de recherche indépendantes ont mis en évidence l'existence d'un deuxième membre de la famille SLAP nommé SLAP2. SLAP2 a été identifié par la recherche bio-informatique de nouvelles protéines à domaine SH2 ou SH3 (Loreto, Berry, et McGlade 2002; Akhilesh Pandey et al. 2002) et par un screening fonctionnel visant à trouver de nouvelles protéines inhibant l'activation lymphocytaire (Holland et al. 2001). SLAP2 est une protéine de 261 acides aminés dont la séquence présente environ 35% d'identité avec celle de SLAP (Kazi, Kabir, et Rönnstrand 2015). Tout comme SLAP, SLAP2 est composé d'une séquence N-terminale, suivie de domaines SH3 et SH2 et d'un domaine C-terminal unique dépourvu d'activité enzymatique **(Figure 34)**. Il existe deux transcrits pour SLAP2. Ces isoformes de 28 kDa ou 25 kDa se traduisent par deux sites alternatifs d'initiation de la traduction aux fonctions inconnues, bien qu'il soit possible qu'elles interagissent avec différents complexes de signalisation intracellulaires.

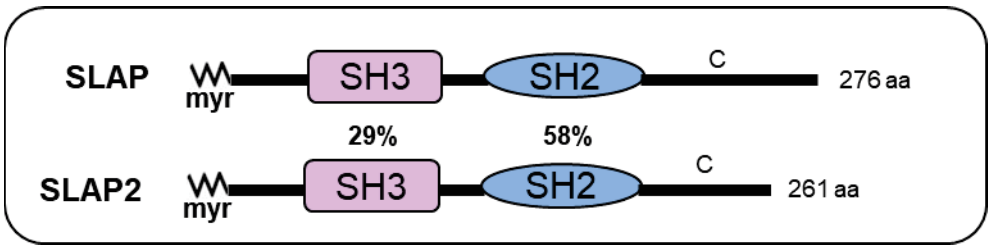


Figure 34 : Comparaison structure de l'adaptateur SLAP et SLAP2.
SLAP et SLAP2 possèdent un site de myristoylation (myr) en N-terminal, un domaine C-terminal unique et des domaines SH3 et SH2.

- Région N-terminale : L'isoforme de SLAP2 de 28 kDa possède dans sa région N-terminale un site de myristoylation semblable à celui de SLAP permettant sa localisation à la membrane plasmique et aux vésicules intracellulaires, dont les endosomes. En revanche, le deuxième isoforme de SLAP2 de 25 kDa ne possède pas

de site de myristoylation et semble localisé principalement dans le noyau (Loreto, Berry, et McGlade 2002).

- Domaines SH3 et SH2 : Les domaines SH3 et SH2 de SLAP2 présentent respectivement 29% et 58% d'homologie avec ceux de SLAP **(Figure 34)**. Les résidus clés du domaine SH3 pour l'interaction avec des motifs poly-proline de ligand (Trp68 et Pro83) ainsi que la séquence FXXR du domaine SH2 pour l'interaction avec des partenaires pTyr sont conservés (A. Pandey, Duan, et Dixit 1995).

Plusieurs partenaires du domaine SH2 de SLAP2 ont été identifiés et certains sont communs avec ceux de SLAP **(Tableau 6).** Cependant, contrairement à SLAP, aucun ligand du domaine SH3 de SLAP2 n'a été découvert à ce jour.

- Extrémité C-terminale : Cette région présente 29% d'homologie avec celle de SLAP et s'associe avec l'E3-ubiquitine ligase Cbl. En revanche, la région C-terminale de SLAP2 est plus courte que celle de SLAP et ne possède pas les acides aminés chargés impliqués dans la dimérisation de la protéine (Akhilesh Pandey et al. 2002).

Protéine	Type cellulaire	Méthode d'identification	Référence
c-Cbl	Jurkat BJAB Plaquettes	Criblage double hybride GST-pulldown Co-IP	(Akhilesh Pandey et al. 2002) (Loreto, Berry, et McGlade 2002) (G. A. Manes et al. 2006)
CD3ζ (TCRζ)	Jurkat	GST-pulldown Co-IP	(Akhilesh Pandey et al. 2002)
CSF1R	HEK293T Macrophages FD-fms	Co-IP GST-pulldown	(G. A. Manes et al. 2006) (Swaminathan, Feshchenko, et Tsygankov 2007) (Pakuts et al. 2007)
LAT	Plaquettes Jurkat, Cos-7	GST-pulldown Co-IP	(Loreto, Berry, et McGlade 2002) (Sugihara et al. 2010)
SYK	Plaquettes	GST-pulldown Co-IP	(Sugihara et al. 2010)
ZAP-70	Jurkat	GST-pulldown Co-IP	(Akhilesh Pandey et al. 2002) (Loreto, Berry, et McGlade 2002)

Tableau 6 : Interacteurs connus de SLAP2.

2. Expression

L'expression tissulaire de SLAP n'a pas été caractérisée dans le détail. Cependant une première analyse en Northern-blot indique que SLAP est fortement exprimé dans le tissu lymphoïde (thymus, rate, ganglions lymphatiques) et à un degré moindre dans les poumons et le cerveau (A. Pandey, Duan, et Dixit 1995; Tomasz Sosinowski et al. 2000). Les données d'expression de RNAseq et l'analyse de microarray dépeignent également une faible expression de SLAP dans d'autres tissus (cœur, foie, rein et muscle squelettique). L'expression de SLAP2 est souvent corrélée à l'expression de SLAP, il est en effet fortement exprimé dans le système hématopoïétique (thymus, rate, lymphocytes circulants) et faiblement dans le poumon (Loreto, Berry, et McGlade 2002). En revanche, l'expression de SLAP2 n'a pas été détectée jusqu'alors dans d'autres tissus tels que le foie, le côlon, l'intestin, le cœur, ou le cerveau. En résumé, ces données suggèrent que SLAP et SLAP2 sont exprimés de manière abondante dans le tissu hématopoïétique mais à la différence de SLAP2, dont l'expression semble restreinte à ce tissu, SLAP présente une expression tissulaire plus étendue.

3. Le rôle de SLAP dans la signalisation dépendante des PTK

Puisque SLAP est myristoylé et se localise à la membrane cellulaire, il n'est pas surprenant que SLAP, *via* son domaine SH2, puisse interagir à la membrane avec plusieurs RTK, y compris EphA2, FLT3, KIT, PDGFR, d'une manière dépendante de la phosphorylation sur tyrosine. En outre, SLAP semble interagir également avec plusieurs tyrosine kinases cytoplasmiques telles que SYK, ZAP-70. Etant donné sa forte homologie de séquence avec SRC, un rôle inhibiteur de cet adaptateur dans la signalisation dépendante des SFK a été suggéré. Cette hypothèse a été vérifiée expérimentalement dans l'activation du TCR et du BCR et dans la réponse

mitogénique aux facteurs de croissance que je décrirai plus en détail dans la suite de ce manuscrit. J'aborderai également l'interconnexion de SLAP avec les différents partenaires identifiés en termes de régulation des voies de signalisations associées ainsi que l'incidence de cette interaction sur les fonctions physiologiques.

3.1. SLAP et la régulation de la voie de signalisation du TCR

a. Inhibition de l'activation des thymocytes par SLAP

SLAP régule l'activité des lymphocytes dans lesquels il est fortement exprimé. Dans les lymphocytes T, la signalisation du TCR est l'événement critique pour le développement des cellules T dans le thymus et leur activation (Wange et Samelson 1996). La signalisation du TCR est médiée par l'activation de la SFK Lck *via* la phosphorylation de motifs ITAM du complexe TCR-CD3. Ces pTyr permettent le recrutement SH2-dépendant des CTK Syk et ZAP-70, permettant l'activation de la phospholipase C et de la voie Ras/MAPK et l'induction d'IL2. SLAP régule négativement cette signalisation par association et dégradation Cbl-dépendante des substrats de Lck phosphorylés (SLP-76, ZAP-70, Syk, LAT, chaîne CD3 ζ, Vav et Lck) **(Figure 35)** (Myers et al. 2006; Tomasz Sosinowski et al. 2000; Tang et al. 1999). De plus, l'activation soutenue du TCR induit l'expression de SLAP pour exercer un rétrocontrôle. SLAP2 régule également la signalisation du TCR, sans doute par un mécanisme semblable (i.e. dégradation dépendante de substrats spécifiques de Lck *via* Cbl) bien que les mécanismes exacts de cette inhibition ne soient pas totalement élucidés (Loreto, Berry, et McGlade 2002).

b. Contrôle du développement des thymocytes par SLAP

SLAP joue un rôle central dans le développement des lymphocytes T. Leur développement est un processus multi-étapes se déroulant dans le thymus. Les

progéniteurs des thymocytes, provenant de la moelle osseuse sont au stade double négatif (DN) $CD4^-CD8^-$. Des réarrangements des gènes codant pour le TCR conduisent à l'expression du TCR, mais également de CD4 et de CD8. On dira alors que ces thymocytes sont au stade double positif (DP) $CD4^+CD8^+$. A ce stade, les thymocytes DP sont soumis à la sélection positive où seuls les thymocytes qui sont capables de se lier faiblement à un complexe peptide-CMH exprimé par les cellules épithéliales thymiques reçoivent un signal de survie. Selon la nature du CMH, les thymocytes DP perdent l'un des deux marqueurs, CD4 ou CD8, et deviennent simple positif (SP). Les thymocytes ayant survécu à la sélection positive vont subir la sélection négative où les lymphocytes reconnaissant fortement les peptides du soi présentés par le CMH sont éliminés. Un élément clé de ce processus est la faible expression du TCR à la surface des thymocytes DP pour empêcher un signal trop fort lors de la sélection positive conduisant à la mort cellulaire. L'analyse des thymocytes issus des souris *SLAP*$^{-/-}$ révèlent un rôle régulateur de SLAP dans la sélection des cellules DP (T. Sosinowski, Killeen, et Weiss 2001). D'un point de vu mécanistique, SLAP induit la dégradation de la chaîne ζ du TCR phosphorylé par LCK dans les thymocytes DP. Le mécanisme de dégradation mis en jeu implique l'interaction de SLAP avec Cbl, comme le suggère l'analyse des thymocytes issus de souris *SLAP*$^{-/-}$*; Cbl*$^{-/-}$(Murphy et al. 1998; Naramura et al. 1998; T. Sosinowski, Killeen, et Weiss 2001). De manière surprenante, des expériences d'immunofluorescence montrent une colocalisation entre SLAP et TCRζ au niveau de compartiments intracellulaires, probablement des endosomes (Myers et al. 2006). Le scénario probable serait donc que la phosphorylation de TCRζ par Lck permet son interaction avec le complexe SLAP/Cbl dans les endosomes pour induire sa dégradation. De manière intéressante, l'absence d'effet de l'invalidation de

SLAP2 dans les thymocytes suggère une fonction spécifique de SLAP2 dans ce processus biologique (T. Sosinowski, Killeen, et Weiss 2001).

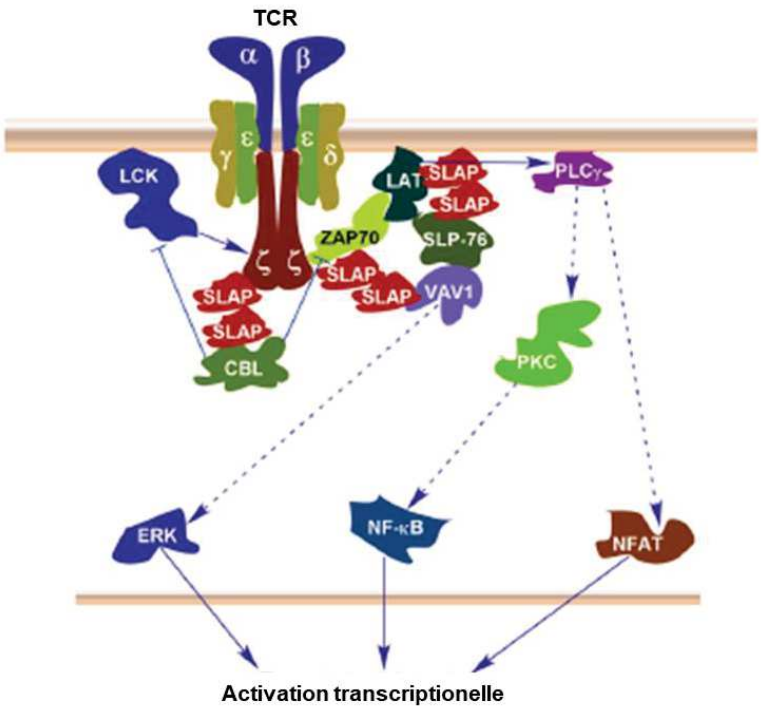


Figure 35 : Mécanismes d'inhibition de l'activation des lymphocytes T Lck-dépendante par les adaptateurs de la famille SLAP *(adaptée de Kazi, Kabir, et Rönnstrand 2015).* L'engagement du TCR conduit à l'activation de Lck qui phosphoryle les motifs ITAM du complexe TCR-CD3 permettant le recrutement de Syk et ZAP-70. Ces PTK activent alors plusieurs voies de signalisation, incluant les voies Ras/MAPK et PLCγ, qui mènent à l'activation des facteurs de transcription NFAT et AP-1 permettant la transcription de gènes, tels qu'IL-2. SLAP inhibe la signalisation du TCR dépendante de Lck par un mécanisme non compétitif en induisant la dégradation de substrats de Lck, tels que ZAP-70, *via* son interaction avec l'E3-ligase Cbl.

3.2. SLAP et la régulation de la voie de signalisation du BCR

A l'instar de ce que représente les TCR pour les lymphocytes T, les récepteurs aux lymphocytes B (BCR) sont essentiels pour le développement et la fonction des cellules B et à la sécrétion d'anticorps par les lymphocytes B matures. Sur le plan moléculaire, l'activation de BCR induit la phosphorylation de résidus Tyr sur les chaînes d'Ig, créant ainsi des sites de fixation pour la tyrosine kinase SYK. Ces événements activent en retour la signalisation AKT, NF-kB et NFAT conduisant *in fine* à l'activation transcriptionelle de gènes effecteurs **(Figure 36)**. En accord avec une fonction

importante de SLAP dans ce système cellulaire, les souris *SLAP*$^{-/-}$ présentent une augmentation du nombre de lymphocytes B dans la rate (Dragone, Myers, White, Sosinowski, et al. 2006; Myers et al. 2006). Ces lymphocytes B matures ont une expression du BCR à la membrane diminuée et répondent moins bien à la stimulation par l'antigène *in vitro*. A l'inverse, les cellules B immatures issues de la moelle osseuse présentent un taux élevé de BCR à la membrane. Ces données montrent que SLAP régule le développement et l'activité des lymphocytes B par un mécanisme semblable à celui décrit pour les lymphocytes T, à savoir une dégradation Cbl-dépendante de composants phosphorylés sur tyrosine de la signalisation du BCR, dont SYK et la sous-unité Igα du BCR **(Figure 36)** (Dragone, Myers, White, Sosinowski, et al. 2006; Kazi, Kabir, et Rönnstrand 2015; Myers et al. 2006).

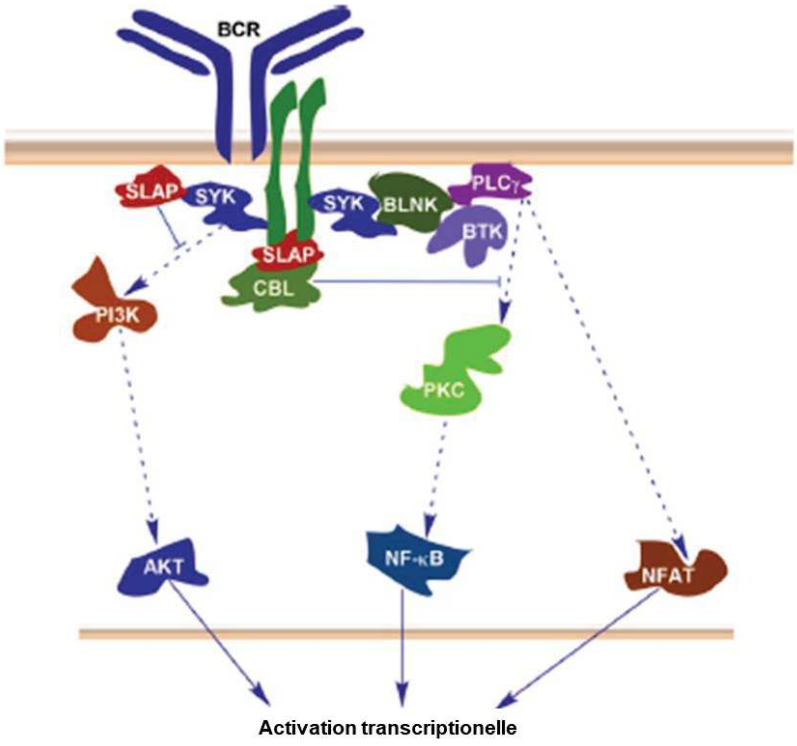


Figure 36 : Mécanismes d'inhibition de l'activation des lymphocytes B Lck-dépendante par les adaptateurs de la famille SLAP *(adaptée de Kazi, Kabir, et Rönnstrand 2015).* L'engagement du BCR conduit à l'activation de plusieurs voies de signalisation, incluant les voies PI3K/AKT, NF-κB et NFAT. SLAP inhibe la signalisation du BCR par un mécanisme non compétitif, en induisant la déstabilisation des composants intermédiaires de signalisation du BCR: SYK, Igα, *via* son interaction avec l'E3 ligase c-Cbl.

3.3. Régulation de la signalisation du PDGFR

a. Inhibition de la réponse mitogénique

L'inhibition de l'expression de SLAP dans les fibroblastes embryonnaires murins a révélé une fonction négative de cet adaptateur dans la réponse mitogénique induite par des facteurs de croissance, dont le PDGF (A. Sirvent et al. 2008). A l'échelle moléculaire, SLAP inhibe l'interaction de SRC avec le récepteur (i.e. Y579 et Y581 du PDGFR) par un mécanisme compétitif SH2-dépendant conduisant à l'inhibition de la signalisation SRC mitogénique **(Figure 37)**.

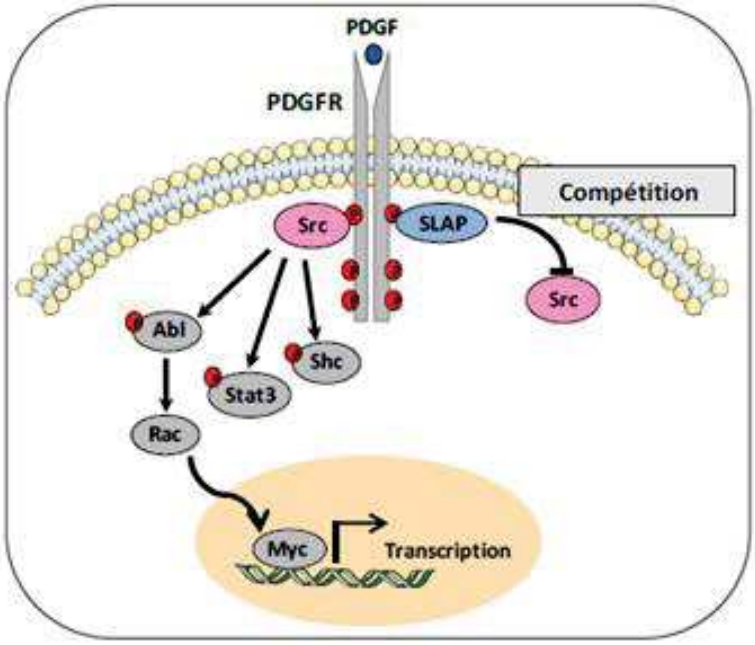


Figure 37 : Mécanisme d'inhibition de la mitogenèse SRC-dépendante en réponse au PDGF par l'adaptateur négatif SLAP.
SRC interagit, *via* son domaine SH2, avec le PDGFR activé au niveau de la pTyr579. Cette interaction conduit à l'activation de SRC qui va induire la transduction du signal en activant différents effecteurs, tels que Abl, STAT3 et Shc, qui vont permettre la réponse biologique : la mitogenèse. L'adaptateur SLAP inhibe la mitogenèse SRC-dépendante par un mécanisme de type compétitif puisque SLAP va s'associer, via son domaine SH2, au PDGFR activé au niveau de la pTyr579.

b. Inhibition de la réponse morphologique

En plus de la prolifération, le PDGF induit des changements morphologiques, dont la formation de ruffles circulaires dorsaux et latéraux. Tandis que les ruffles latéraux

contrôlent la migration directionnelle des cellules, les ruffles dorsaux sont liés à l'invasion et au métabolisme cellulaires (Suetsugu et al. 2003). Ce réarrangement du cytosquelette est régulé par la polymérisation de l'actine grâce à l'activation du complexe Arp2/3 et par la voie de signalisation Rac/WAVE1. Le laboratoire a montré que la formation des ruffles dorsaux induite par le PDGF implique également SRC *via* son activation par un second messager lipidique, la sphingosine-1-phosphate (S1P) (Veracini et al. 2006). SLAP inhibe cette réponse morphologique dépendante de SRC sans affecter la formation des ruffles latéraux (A. Sirvent et al. 2008). Cette nouvelle fonction de SLAP est associée à l'inhibition CBL-dépendante de l'activation de la petite GTPase Rac nécessaire au réarrangement du cytosquelette d'actine.

3.4. SLAP et la régulation de la voie de signalisation du récepteur aux CSF

a. Inhibition de l'activation des monocytes

Le facteur 1 de stimulation des colonies (également appelé macrophage CSF, M-CSF ou CSF-1) se lie au CSF-1R, codé par le proto-oncogène c-Fms, et régule la prolifération, la différenciation et la survie des macrophages selon un mécanisme dépendant de SRC. Etant donné que SLAP et SLAP2 sont exprimés de manière constitutive dans les monocytes humains et les macrophages de la moelle osseuse, il n'a pas été surprenant d'observer qu'ils agissent en tant que régulateurs négatifs de cette voie de signalisation CSF-1R SRC-dépendante. SLAP2 s'associe directement et de manière constitutive avec CSF-1R, à la différence de SLAP dont l'interaction est dépendante de l'activation du récepteur (Pakuts et al. 2007). Les causes moléculaires de cette différence ne sont pas connues, mais ces deux interactions induisent l'internalisation et la dégradation Cbl-dépendante du récepteur conduisant à une diminution de l'activation des macrophages (Figure 38).

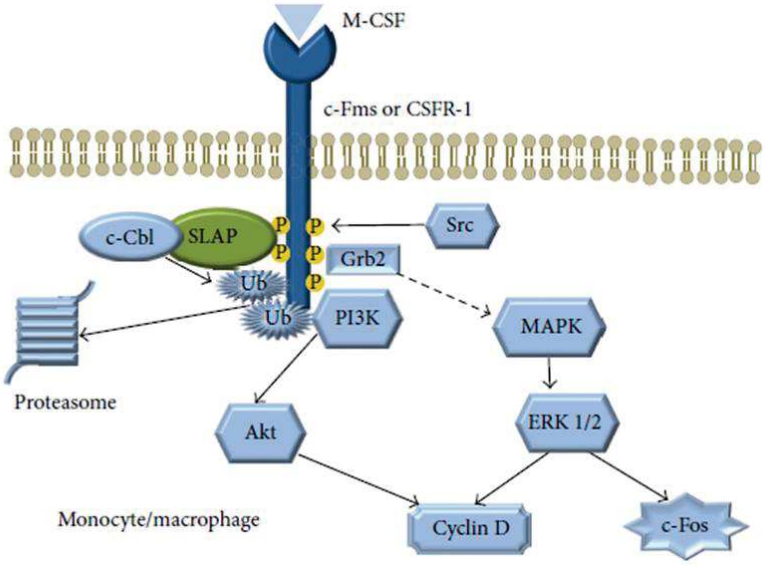


Figure 38 : Mécanismes d'inhibition de l'activation des monocytes/macrophages par les adaptateurs de la famille SLAP (adaptée de Marton et al. 2015).
SLAP inhibe la signalisation du M-CSF dans les monocytes/macrophages par un mécanisme non compétitif, en induisant la déstabilisation du récepteur CSF-1R, *via* son interaction avec l'E3-ligase Cbl.

b. Inhibition de l'activation des ostéoclastes

SLAP régule l'activité des ostéoclastes chez la souris par un mécanisme dépendant du récepteur au CSF-1 (H.-J. Kim et al. 2010). Les ostéoclastes sont les cellules responsables de la résorption osseuse qui joue un rôle prépondérant dans le développement et le maintien de l'homéostasie du tissu osseux. Ce sont des cellules multi-nucléés dérivées de précurseurs des monocytes/macrophages. CSF-1 joue un rôle important dans ce type cellulaire. Bien que les souris *SLAP*$^{-/-}$ présentent un phénotype osseux normal, l'analyse des ostéoclastes issus de ces souris révèlent une fonction de SLAP dans l'ostéoclastogenèse *in vitro*. En particulier, SLAP réduit la prolifération des précurseurs des ostéoclastes induits par le CSF-1 et l'apoptose des ostéoclastes matures sans altérer leur fonction de résorption (H.-J. Kim et al. 2010). Sachant que la dérégulation des ostéoclastes joue un rôle fondamental dans la

pathogenèse de l'ostéoporose, le ciblage de SLAP pourrait représenter une nouvelle stratégie dans le traitement de cette pathologie.

c. Inhibition de l'activation des cellules dendritiques

SLAP inhibe la maturation des cellules dendritiques induites par le récepteur au Granulocyte–macrophage colony-stimulating factor (CSF2 ou GM-CSF) (Liontos et al. 2011). De manière intéressante, les cellules dendritiques de la moelle osseuse de souris *SLAP*$^{-/-}$*;SLAP*$^{-/-}$ activées par le GM-CSF présentent un niveau élevé de récepteur GM-CSFRβ et une forte activation de sa signalisation intracellulaire. Cette dérégulation mène à une déficience de l'expression du CMH de classe II à la surface des CD matures ce qui affecte leur fonction. Ces cellules produisent effectivement moins d'IL-12 et de TNFα lors de la stimulation des lipopolysaccharides (LPS) entrainant alors une diminution du recrutement et de l'activation en aval des autres cellules immunitaires. Ces données suggèrent que SLAP est un régulateur négatif du GM-CSFR pour la production de CD matures fonctionnelles (Liontos et al. 2011). L'implication de Cbl dans la régulation de l'expression du GM-CSFR par SLAP n'a cependant pas été recherchée.

3.5. Régulation de l'activation des mastocytes par SLAP

SLAP joue un rôle important dans le contrôle de l'activité des mastocytes *via* l'inhibition de la CTK Syk (Park, Qiao, et Beaven 2009). L'expression de SLAP est induite lors de la stimulation des mastocytes par l'antigène et participe, en retour, à l'inhibition de sa signalisation. Cette boucle de régulation négative contrôlerait la production de cytokines et donc la réponse inflammatoire. De manière semblable, il a été montré une induction de SLAP dans des mastocytes RBL-2H3 traités à la dexaméthasone, ce qui est associé à une inhibition de la signalisation induite par l'antigène. L'inhibition de

l'expression de SLAP inhibe l'effet de la dexaméthasone *via* la phosphorylation de Syk et de ses cibles conduisant à une production accrue de cytokines IL-3 et MCP-1. De manière intéressante, l'analyse de la séquence du gène codant pour SLAP a révélé l'existence d'un élément de réponse aux glucocorticoïdes (ERG) (S.-K. Park et Beaven 2009). Ces résultats suggèrent que l'induction de SLAP contribue à l'activité immunosuppressive des glucocorticoïdes dans les mastocytes.

4. L'activité anti-oncogénique de SLAP dans le CCR

Les fonctions inhibitrices de SLAP dans la signalisation induite par les PTK lui suggère un rôle de suppresseur de tumeur dans le cancer. En accord avec cette hypothèse, la surexpression de SLAP inhibe la prolifération cellulaire induite par une forme oncogénique de SRC (i.e. SRC Y527F) (G. Manes, Bello, et Roche 2000). Cependant, SLAP n'agit pas comme un simple antagoniste de SRC, car il n'affecte pas le changement de cytosquelette d'actine induite par cet oncogène. Une étude récente montre que la mutation oncogénique D816V du RTK KIT prévient la dégradation SLAP-dépendante du récepteur et ce mécanisme doit participer à son activité cancéreuse (Kazi et al. 2014). Sur le plan moléculaire, KIT-D816V échappe à ce processus de dégradation par phosphorylation de SLAP sur 3 tyrosines C-terminales impliquées dans sa dimérisation. En accord avec cette hypothèse, l'expression d'une forme non phosphorylable de SLAP contrecarre la transformation cellulaire induite par cette forme oncogénique de KIT (Kazi et al. 2014).

Une autre fonction suppressive de tumeur de SLAP a été rapportée par le laboratoire dans le CCR. Bien que SLAP soit abondamment exprimé dans l'épithélium intestinal, son expression est fortement diminuée dans >50% des patients atteints de CCR. SLAP régule négativement l'initiation et la progression tumorales intestinales ainsi que la

formation de métastases. Un des mécanismes impliqué dans son activité anti-tumorale concerne la dégradation du récepteur d'adhésion EphA2, important pour la dissémination des cellules tumorales d'origine épithéliale et un substrat clé pour la fonction tumorale de SRC. Cette activité est médiée par son interaction avec le facteur d'ubiquitination UBE4A. De manière semblable à son activité dans le système immunitaire, SLAP définit une boucle de rétrocontrôle dépendante de SRC associée à une voie d'adhésion SRC/EphA2/AKT-dépendante **(Figure 39)**. De manière cohérente, l'inactivation de SLAP dans le CCR augmente considérablement le niveau de protéine EphA2 et amplifie la cascade de signalisation SRC/EphA2/AKT qui favorise l'invasion tissulaire des cellules tumorales. Ainsi, la stabilisation aberrante de substrats de SRC oncogéniques induite par l'inactivation de *SLA* définit un nouveau mécanisme important de l'activation tumorale de SRC dans le CCR.

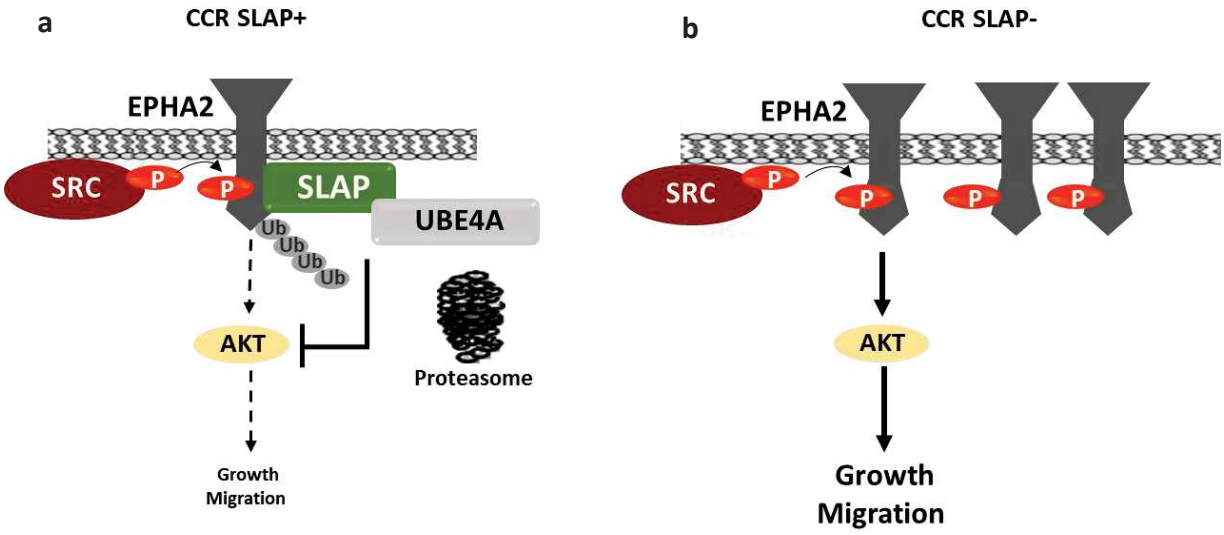


Figure 39 : SLAP induit la dégradation du RTK EphA2 de manière SRC-dépendante pour réguler la croissance et l'invasion des cellules de CCR.
Dans les cellules de CCR SLAP⁺ **(a)** la phosphorylation de SRC en Tyr594 d'EphA2 sur Tyr594 induit le recrutement de SLAP au récepteur d'adhésion EphA2 ce qui a pour conséquence de promouvoir la dégradation protéasomale d'EphA2, *via* UBE4A et limitant ainsi les propriétés tumorogéniques et métastatiques de SRC. L'absence de SLAP **(b)** stabilise EphA2 qui s'accumule à la membrane plasmique et favorise une activité pro-oncogénique.

5. Activité oncogénique de SLAP

De manière surprenante, la dérégulation de SLAP peut favoriser le développement tumoral, *via* la dégradation spécifique de récepteurs de différenciation cellulaire. Par exemple, une étude propose un rôle positif de SLAP dans la transformation cellulaire des érythroblastes induits chez la souris par le virus de Friend F-MuLV (Friend-murine leukemia virus) conduisant à une érythroleucémie (Lebigot et al. 2003). Le processus de transformation de ces cellules fait intervenir la surexpression du facteur de transcription FLI-1 (Friend leukemia integration 1) qui permet l'induction de la prolifération en réponse à l'EPO au lieu de la différenciation. En accord avec cette hypothèse, les érythroblastes transformés par FLI-1 présentent un taux élevé de SLAP. De plus, la surexpression de SLAP dans des érythroblastes bloquent la différenciation cellulaire induite par l'EPO. Ainsi, SLAP participerait au blocage de la différenciation des érythroblastes induit par FLI-1. De même, on retrouve une expression anormale de SLAP dans les sous-types de leucémie promyélocytaire aiguë (LPA) FLT3-ITD+, en accord avec une fonction protumorale de SLAP (Kazi et Rönnstrand 2012). FLT3 et son ligand (FL) jouent un rôle vital dans le système immunitaire ainsi que dans certains types de cancers. SLAP s'associe à FLT3 en réponse à une stimulation par FL. Bien que l'association avec SLAP induise une ubiquitination et une dégradation accélérée de FLT3, cet adaptateur augmente paradoxalement sa signalisation par un mécanisme inconnu.

Contexte d'étude

Contexte d'étude

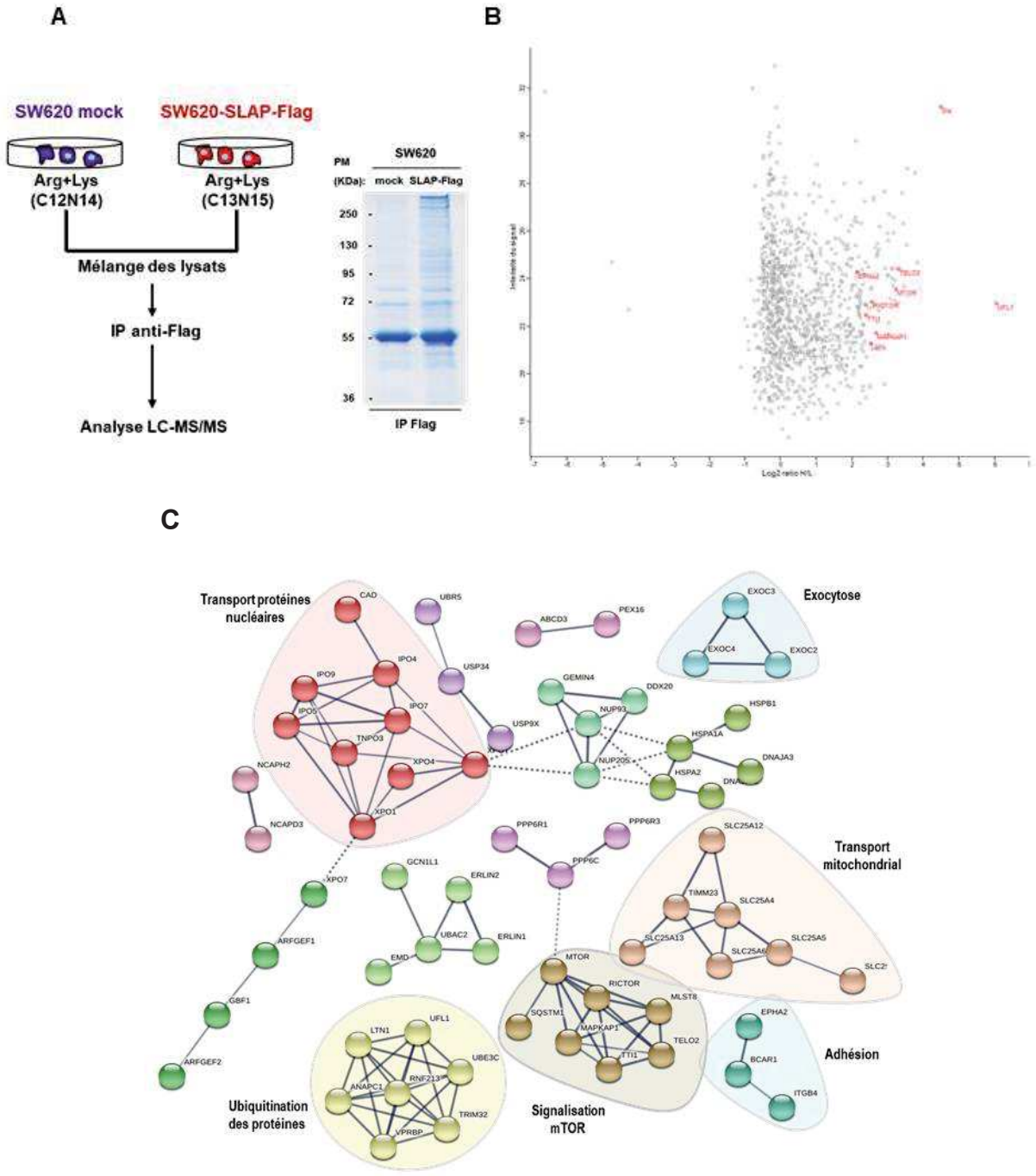
Comme nous l'avons vu dans cette introduction bibliographique, les protéines adaptatrices sont des acteurs importants dans les mécanismes permettant de réguler finement la transduction des signaux médiés par les PTK. Alors que l'activité tumorale des PTK dans les cancers était initialement supposée être activée par des mutations somatiques, il s'avère qu'un grand nombre de PTK, dont SRC, acquièrent une activité cancéreuse en absence d'altération génétique. Récemment, le laboratoire a identifié un nouveau mécanisme important de dérégulation de la signalisation oncogénique de SRC dans le CCR impliquant une perte d'expression de la protéine adaptatrice SLAP. Comme nous l'avons vu précédemment, une partie de l'activité anti-oncogénique de SLAP implique la dégradation du récepteur d'adhésion EphA2. Mais notre hypothèse est que, comme dans le système immunitaire, SLAP puisse avoir un rôle plus général et cibler de nombreux substrats oncogéniques pour médier ses fonctions anti-oncogéniques. En effet, grâce à une analyse d'interatomique, nous avons identifié plus d'une centaine d'interacteurs supplémentaires de SLAP dans les cellules de CCR, suggérant ainsi un rôle beaucoup plus large de cet adaptateur dans la transduction des signaux. De plus, cette analyse révèle que le régulateur de la survie/migration cellulaires mTORC2 est une cible proéminente de SLAP dans les cellules de CCR. Dans ce contexte, mon travail de thèse a été de caractériser l'implication de SLAP dans le contrôle de la signalisation oncogénique dépendante de mTORC2- dans le CCR. Ces travaux ont permis de révéler un mécanisme supplémentaire important par lequel SLAP contrôle négativement l'activité oncogénique et dévoile SLAP comme un biomarqueur potentiel de la réponse aux inhibiteurs de mTOR dans le CCR.

Résultats

1. SLAP interagit avec mTORC2 dans les cellules de CCR

Afin d'identifier les substrats oncogéniques ciblés par SLAP et reliés à ses fonctions anti-oncogéniques, j'ai tout d'abord cherché à caractériser les interacteurs de SLAP dans les cellules de CCR en utilisant une approche de protéomique quantitative de type SILAC (Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture). Pratiquement, SLAP taggué Flag a été transduit de manière stable par infection rétrovirale dans le lignée cellulaire SW620 (qui présente un très faible niveau de SLAP endogène). Les cellules SW620 surexprimant SLAP (SLAP-Flag) ont été cultivées en milieu lourd (L-Lysine-13C6,15N2 et L-**Arginine**-13C6,15N4) tandis que les cellules SW620 contrôles (mock) ont été cultivées en milieu léger (L-Lysine-12C6,14N2 et L-Arginine-12C6,14N4). L'interactome de SLAP a ensuite été purifié sur colonne anti-Flag, élué en tampon Laemmli avant d'être soumis à une analyse par spectrométrie de masse de type LC-MS/MS **(Figure 1A)**. Cette analyse a permis d'identifier environ 1500 protéines dont plus de 400 partenaires potentiels de SLAP présentant un ratio H/L>2 **(Figure 1B)**. Le traitement bio-informatique de ces données par des analyses de type STRING **(Figure 1C et Figure supplémentaire 1)** et KEGG **(Figure 1D)** indique que SLAP semble réguler majoritairement les processus cellulaires reliés au transport protéique (nucléaire, mitochondrial exocytose, endocytose), au transport des ARN, au processus d'adhésion, à la signalisation mTOR et à la modification post-traductionnelle des protéines par ubiquitination. De manière intéressante, on peut remarquer une forte interaction entre SLAP et la plupart des membres du complexe mTORC2 **(Figures 1B et 1E)**, un régulateur clé de la survie/migration cellulaires dont la dérégulation est impliquée dans la progression métastatique du CCR. Ainsi, SLAP interagit avec Sin1 (ratio H/L de 6.4), Rictor, (ratio H/L de 5.8), les sous-unités communes entre mTORC1 et mTORC2 que sont mTOR (ratio de 9.4) et LST8 (ratio H/L de 4.9) et enfin les

chaperonnes aidant à l'assemblage/maturation des complexes mTOR : Telo2 (ratio H/L de 9.8) et Tti1 (ratio H/L de 5.2). Cette interaction entre SLAP et les différents composants du complexe mTORC2 a été validée biochimiquement par des expériences de co-immunoprécipitation dans deux lignées cellulaires de CCR : SW620 et HT29 **(Figure 1F)**.



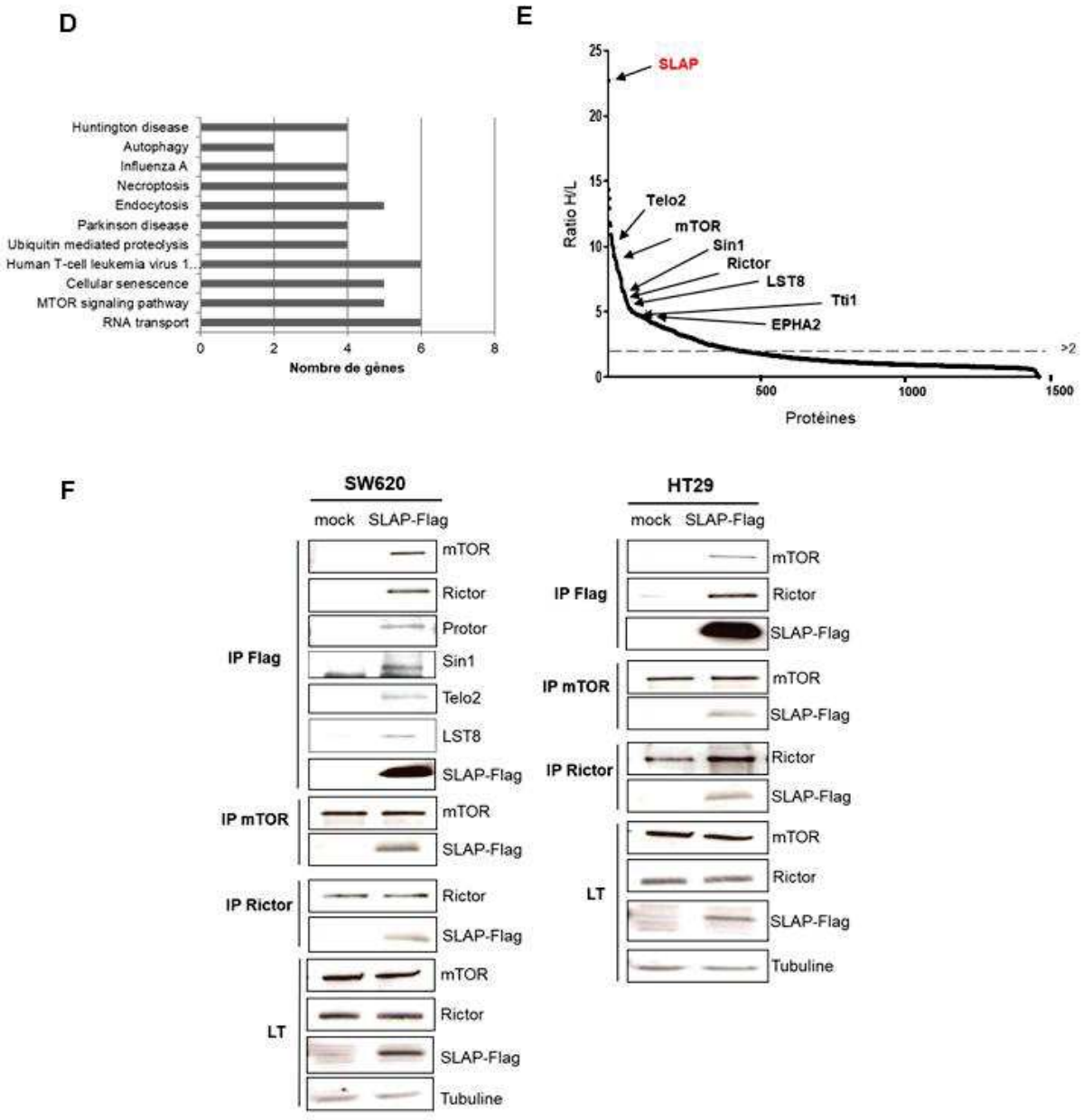
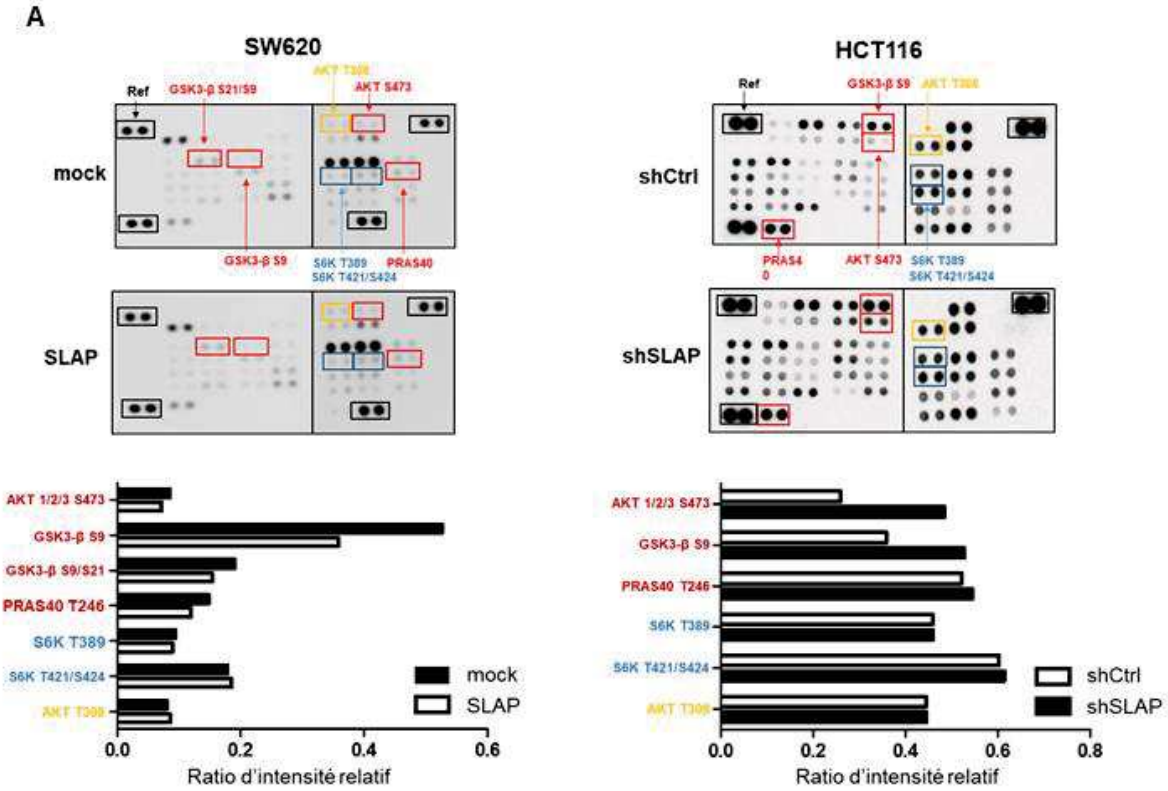


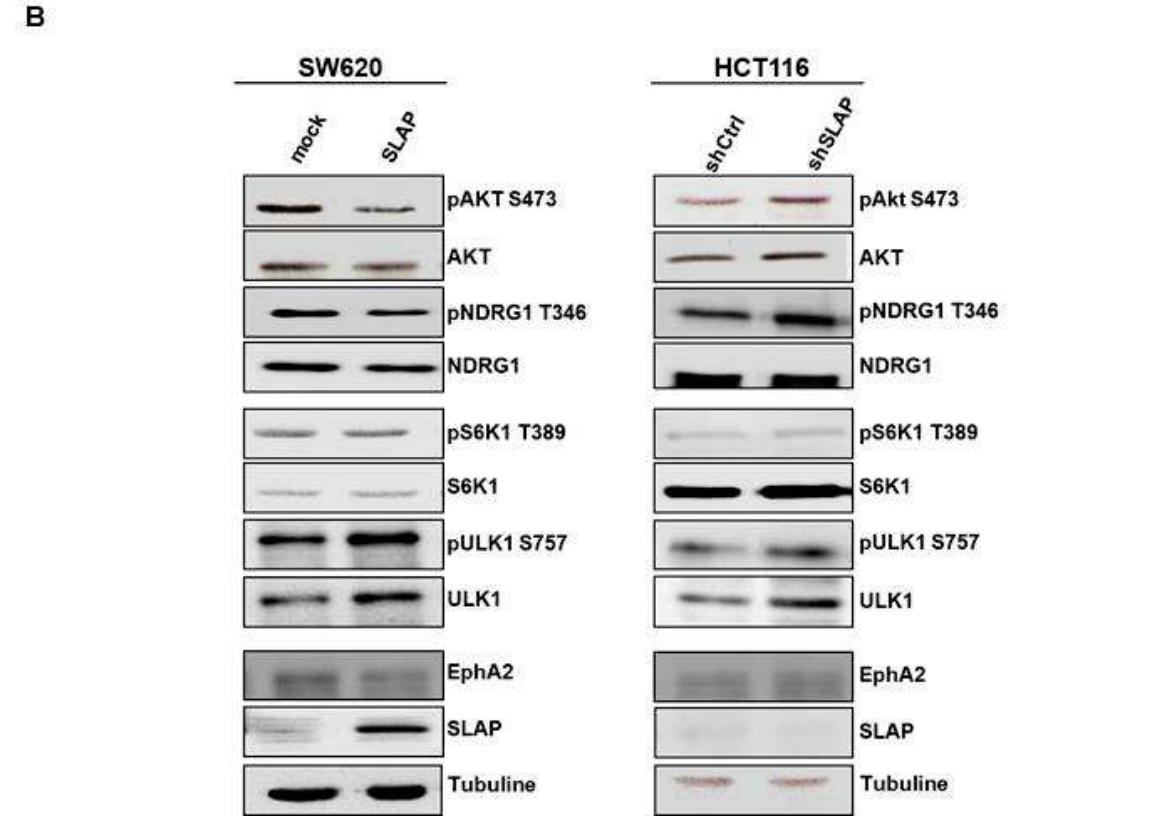
Figure 1: SLAP interagit avec mTORC2 dans les cellules de CCR.
(A) Représentation schématique de l'approche de protéomique quantitative de type SILAC mise en place afin d'identifier l'interactome de SLAP dans les cellules SW620 (panel de gauche) et profil global des protéines (coloration au bleu de Coomassie) après purification anti-Flag (panel de droite). **(B)** Graphe représentant l'intensité de signal des protéines identifiées en fonction du ratio Lourd sur Léger (H/L) en log2. Les protéines avec un ratio H/L>2 peuvent être considérées comme des partenaires potentiels de SLAP. **(C, D)** Analyse bio-informatique de type String (C) et KEGG (D) des interacteurs potentiels de SLAP identifiés avec un ratio H/L>4,5. **(E)** Graphe de quantification représentant les protéines identifiées après purification Flag en fonction de leurs ratios Lourd sur Léger (H/L). **(F)** Validation biochimique de l'interaction de SLAP avec le complexe mTORC2 dans les lignées de CCR SW620 (panel de gauche) et HT29 (panel de droite) surexprimant SLAP-Flag. Le taux de SLAP immunoprécipité avec un anti-Flag et le taux des composants de mTORC2 (mTOR, Rictor, PROTOR, Sin1, Telo2, LST8) associés sont montrés par Western-blot. Inversement, le taux de Rictor et de mTOR immunoprécipités avec respectivement un anti-Rictor et un anti-mTOR et le taux de SLAP associé sont également montrés. L'analyse par Western-blot à partir de lysat total (LT) montre le taux d'expression des protéines mTOR, Rictor, SLAP et de la Tubuline.

2. SLAP régule négativement la signalisation mTORC2/AKT

En parallèle de cette approche globale de protéomique, j'ai utilisé une approche de type « Phospho-kinase Array » afin d'identifier les voies de signalisation affectées par SLAP. Et en accord avec notre analyse d'interactomique, les résultats indiquent que SLAP régule négativement la signalisation mTORC2. En effet, la surexpression de SLAP dans la lignée SW620 induit une diminution du niveau de phosphorylation des substrats spécifiques de mTORC2 : AKT pS473, GSK3-β pS9/S21, PRAS40 pT246 **(Figure 2A, panel gauche)**. Inversement, l'inactivation de l'expression de SLAP par une approche shRNA dans la lignée HCT116 (de stade précoce qui exprime un fort niveau de SLAP endogène) augmente la phosphorylation d'AKT en S473 (facteur 1.8) et la phosphorylation de GSK3-β en S9 (facteur 1.5) **(Figure 2A, panel droit et Figure supplémentaire S2)**. Il est important de noter que SLAP ne semble pas moduler l'activité de mTORC1, ni la voie PI3K, puisqu'aucun changement significatif n'a été observé sur la phosphorylation des substrats cibles que sont S6K pT389, S6K pT421/S424 pour mTORC1 et AKT pT308 pour PI3K **(Figure 2A)**. Afin de confirmer cette spécificité dans les propriétés régulatrices de SLAP envers l'activité de mTORC2, je me suis dirigé vers une approche plus ciblée et j'ai évalué l'influence du niveau de SLAP sur la phosphorylation des substrats clefs des voies mTORC1 et de mTORC2 dans les cellules CCR. De manière cohérente, la surexpression de SLAP dans la lignée SW620 inhibe l'activité de mTORC2 (comme le révèle le niveau d'AKT pS473 et de NDRG1 pT346) sans affecter l'activité de mTORC1 (comme le révèle le niveau de S6K1 pT389 et de ULK1 pS757) **(Figure 2B, panel gauche)**. Inversement, l'inactivation de SLAP dans les cellules HCT116 augmente l'activité mTORC2 sans affecter l'activité mTORC1 **(Figure 2B, panel droit)**. Puisque la signalisation mTOR est régulée dans des conditions de stress, et activée en amont par des facteurs de

croissance, j'ai également mesuré ces événements de phosphorylation dans des conditions de déprivation et de stimulation en sérum ou insuline. De manière intéressante, la surexpression de SLAP dans les cellules conditions basales de culture (10% sérum) ou déprivées (0% sérum) entraine dans les deux cas une baisse de 40% de la phosphorylation d'AKT en Ser473 mais n'a pas d'effet sur la phosphorylation de S6K1 en T389 **(Figures 2C et 2D, panels gauches)**. A l'inverse, la déplétion de SLAP favorise la phosphorylation d'AKT en S473 et reste sans effet sur celle de S6K1 en T389 **(Figures 2C et 2D, panels droits)**. Comme attendu, l'ajout de sérum ou d'insuline induit l'activation de mTORC1 et mTORC2 et ce de manière dépendante du temps. De manière cohérente à ce que l'on a pu observer en condition basale de culture cellulaire et en condition de déprivation, alors que la surexpression de SLAP n'avait aucun effet sur la phosphorylation de S6K1 en T389, elle réduit la phosphorylation d'AKT en S473 et ce aux différents temps de stimulation utilisés **(Figures 2C et 2D, panels gauches)**. L'expérience inverse me confirme ces observations, puisque la déplétion de SLAP dans les cellules HCT116 est associée, quel que soit le temps de stimulation, à une plus forte phosphorylation en S473 d'AKT comparé aux cellules contrôles **(Figures 2C et 2D, panels droits)**. Cette fonction de régulation négative de l'activité mTORC2/AKT par SLAP a ensuite été confirmée *ex vivo* sur des échantillons de tumeurs issues de cellules SW620 contrôles ou surexprimant SLAP xénogreffées chez la souris immunodéprimée (Naudin et al. 2014). En effet, les tumeurs issues de cellules surexprimant SLAP, présentent une forte diminution du ratio pAKT S473/AKT total en comparaison avec celles issues des cellules contrôles **(Figure 2E)**. L'ensemble de ces résultats suggèrent donc que SLAP régule négativement la signalisation de mTORC2, sans affecter mTORC1, dans les cellules de CCR.


A
SW620
HCT116
Ref
GSK3-β S21/S9
AKT T308
AKT S473
mock
SLAP
shCtrl
shSLAP
GSK3-β S9
S6K T389
S6K T421/S424
PRAS40
AKT 1/2/3 S473
GSK3-β S9
GSK3-β S9/S21
PRAS40 T246
S6K T389
S6K T421/S424
AKT T308
mock
SLAP
shCtrl
shSLAP
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
Ratio d'intensité relatif


B
SW620
HCT116
mock
SLAP
shCtrl
shSLAP
pAKT S473
AKT
pNDRG1 T346
NDRG1
pS6K1 T389
S6K1
pULK1 S757
ULK1
EphA2
SLAP
Tubuline
pAkt S473

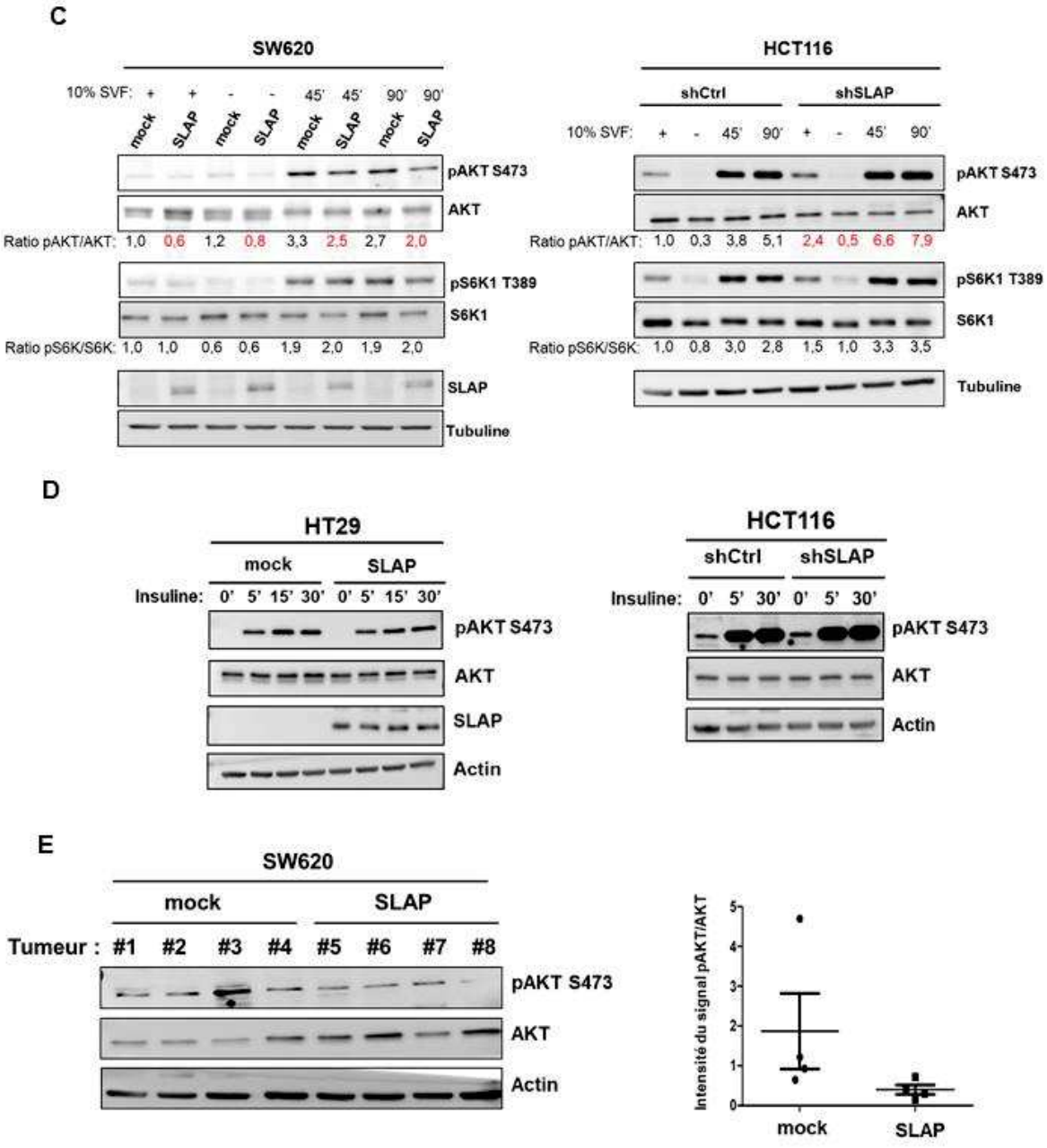


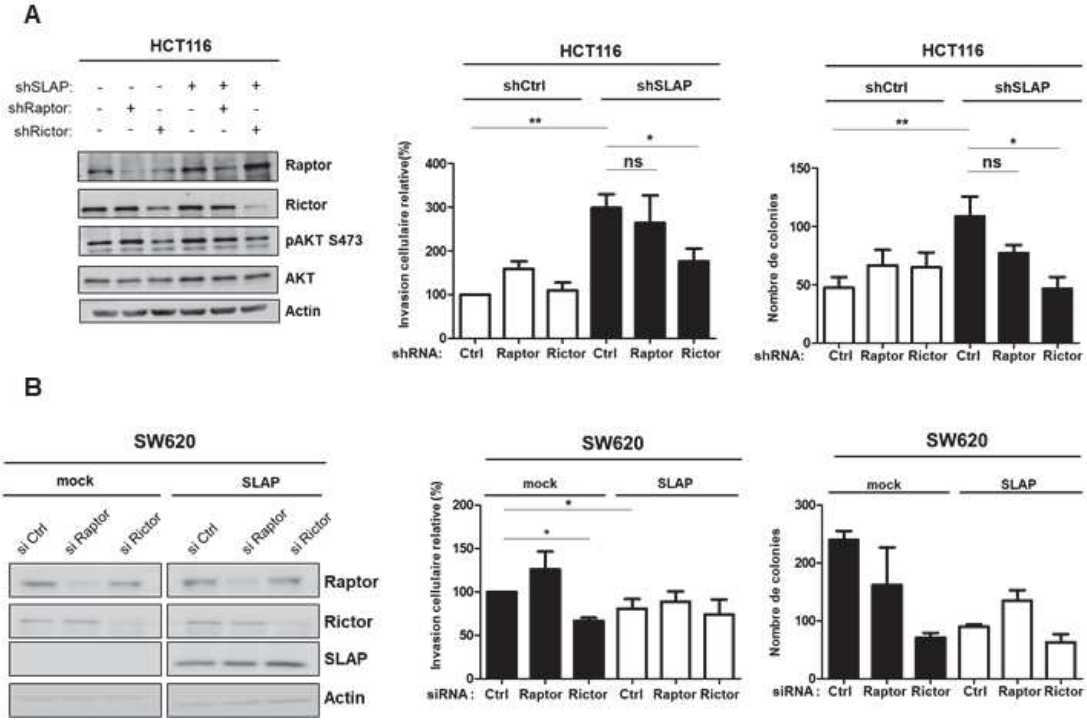
Figure 2 : SLAP régule négativement la signalisation mTORC2/AKT.
(A) Analyse de type Phospho-kinase Array des principales voies de signalisation régulées par SLAP dans les cellules SW620 surexprimant SLAP ou non (panel de gauche) et HCT116 déplétées en SLAP ou non (panel de droite). La quantification du différentiel de phosphorylation pour chacune des kinases a été réalisée *via* le logiciel ImageJ (panels du bas). **(B)** Analyse par Western-blot du niveau de phosphorylation et d'expression des substrats mTORC2 (AKT, NDRG1) et mTORC1 (S6K1, ULK1) dans les cellules SW620 surexprimant SLAP ou non (panel de gauche) et dans les cellules HCT116 déplétées en SLAP ou non (panel de droite). Le niveau d'expression de SLAP, de la Tubuline, d'EphA2 sont également montrés. **(C)** Analyse en condition de déprivation/stimulation au sérum (SVF). Les cellules de CCR indiquées ont été cultivées en présence de 10% SVF ou déprivées pendant 48h, puis restimulées pendant le temps indiqué avec du SVF (10% final). Les extraits protéiques ont été analysés par Western-blot avec des anticorps dirigés contre les protéines indiquées. **(D)** Analyse en condition de déprivation puis stimulation à l'Insuline. Les cellules de CCR indiquées ont été déprivées pendant 48h puis stimulées avec 100 nM d'insuline pendant le temps indiqué. Les extraits protéiques ont été analysés par Western-blot avec des anticorps dirigés contre les protéines indiquées. **(E)** Analyse par Western-blot du niveau de phosphorylation/d'expression d'AKT dans des extraits protéiques issus de tumeurs sous-cutanées de souris nudes xénogreffées avec des cellules SW620 surexprimant SLAP ou non (panel de gauche). L'intensité du signal pAKT/AKT a été quantifiée via le logiciel Image J (panel droit).

3. Les fonctions anti-oncogéniques de SLAP dépendent de la régulation de la signalisation mTORC2/AKT

Pour déterminer si le contrôle de l'activité mTORC2 par SLAP est essentielle pour l'activité anti-oncogénique de SLAP, la signalisation mTORC2 a été abrogée dans les cellules déplétés en SLAP en utilisant une construction rétrovirale shRNA-Rictor et celle de mTORC1 *via* un shRNA-Raptor **(Figure 3A, panel gauche)**. L'inhibition de mTORC2 et de mTORC1 par la déplétion respective de Rictor et de Raptor dans la lignée HCT116 shCtrl n'a pas d'effet majeur sur l'invasion cellulaire et la croissance en agar mou **(Figure 3A, panels du milieu et droit)**. En revanche, la déplétion de Rictor, mais pas de Raptor, dans les HCT116 shSLAP réduit de manière significative ces propriétés transformantes induitent par la perte d'expression de SLAP dans ces cellules avec une baisse d'environ 60% de leurs capacités invasives et de croissance **(Figure 3A, panels du milieu et droit)**. En concordance avec cela, j'ai confirmé que la déplétion de Rictor et de Raptor dans les cellules SW620 par une approche siRNA, avait des effets similaires à l'approche shRNA **(Figure 3B)**. A l'inverse, la surexpression de Rictor antagonise l'effet anti-invasif de SLAP dans les cellules HT29 **(Figure 3C)**, mais pas la surexpression de Raptor dans les cellules SW620 **(Figure 3D)**. Au niveau moléculaire, la surexpression de Rictor contrecarre également la capacité de SLAP à réduire la phosphorylation d'AKT sur Ser473 **(Figure 3C, panel gauche)**. J'ai ensuite voulu confirmer la contribution de la régulation de la signalisation AKT dans l'activité anti-oncogénique de SLAP. Je montre que l'inhibition pharmacologique d'AKT dans les cellules HCT116 contrecarre l'augmentation des propriétés transformantes induite par la déplétion de SLAP **(Figure 3E)**. Je note cependant que l'inhibition d'AKT diminue également drastiquement la croissance des

cellules contrôles **(Figure 3E, panel droit)**. Ce résultat n'est pas surprenant puisque AKT est un régulateur important de la croissance/survie cellulaires mais ne me permet donc pas de conclure sur un éventuel rôle d'AKT dans la croissance cellulaire induite par la déplétion de SLAP. En revanche, l'inhibition d'AKT, inhibe complètement l'invasion des cellules HCT116 déplétées en SLAP mais n'a pas d'effet sur les cellules HCT116 shCtrl **(Figure 3E, panel du milieu)**. Ce résultat démontre une spécificité d'inhibition d'AKT dans la signalisation dépendante de SLAP et révèle l'importance de l'activation d'une voie de signalisation dépendante d'AKT dans l'invasion cellulaire induite par la perte d'expression de SLAP.

Dans l'ensemble, ces données indiquent que la régulation négative de l'activité mTORC2/AKT par SLAP participe à ses fonctions anti-oncogéniques. De plus, ces résultats suggèrent que les cellules de CCR avec de faibles niveaux de SLAP vont présenter une importante activité oncogénique reliée à un niveau élevé d'activité mTORC2/AKT et peuvent ainsi devenir « dépendantes » de cette voie de signalisation.



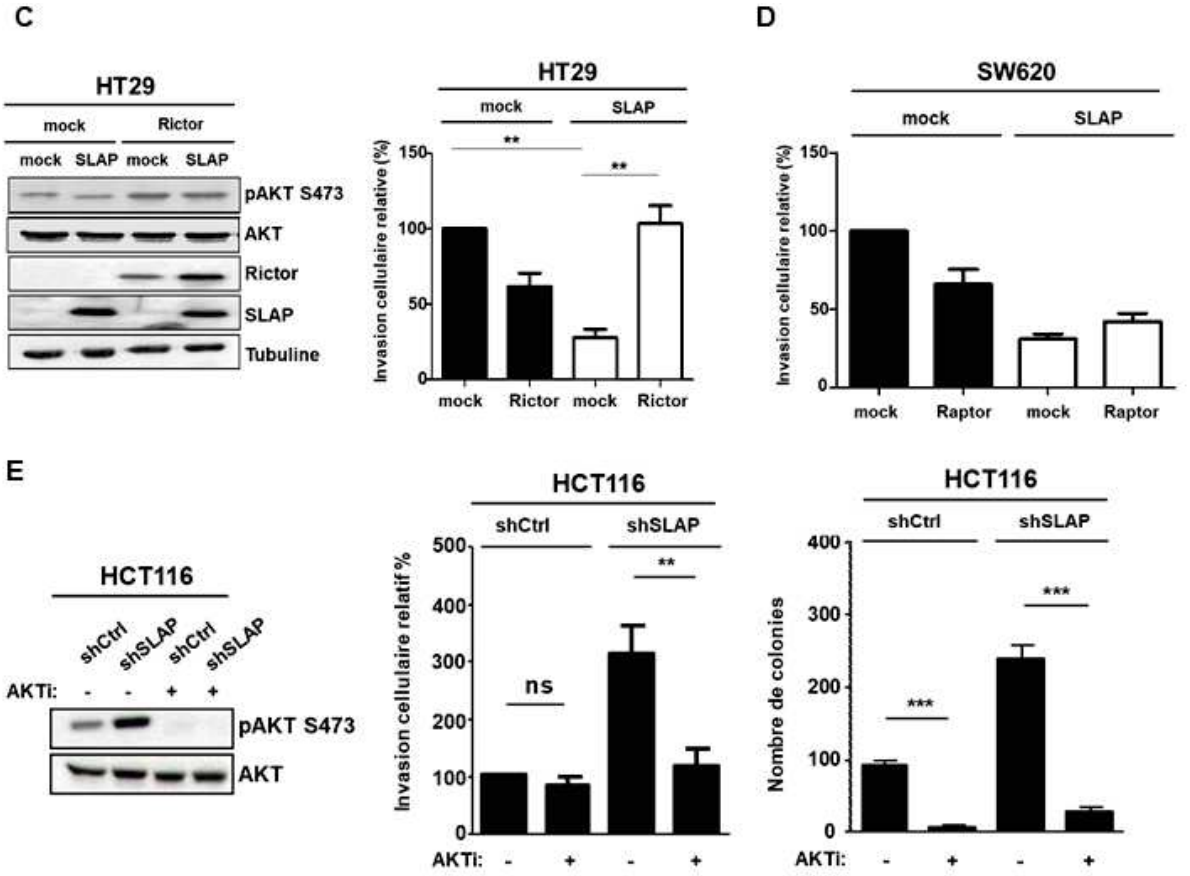
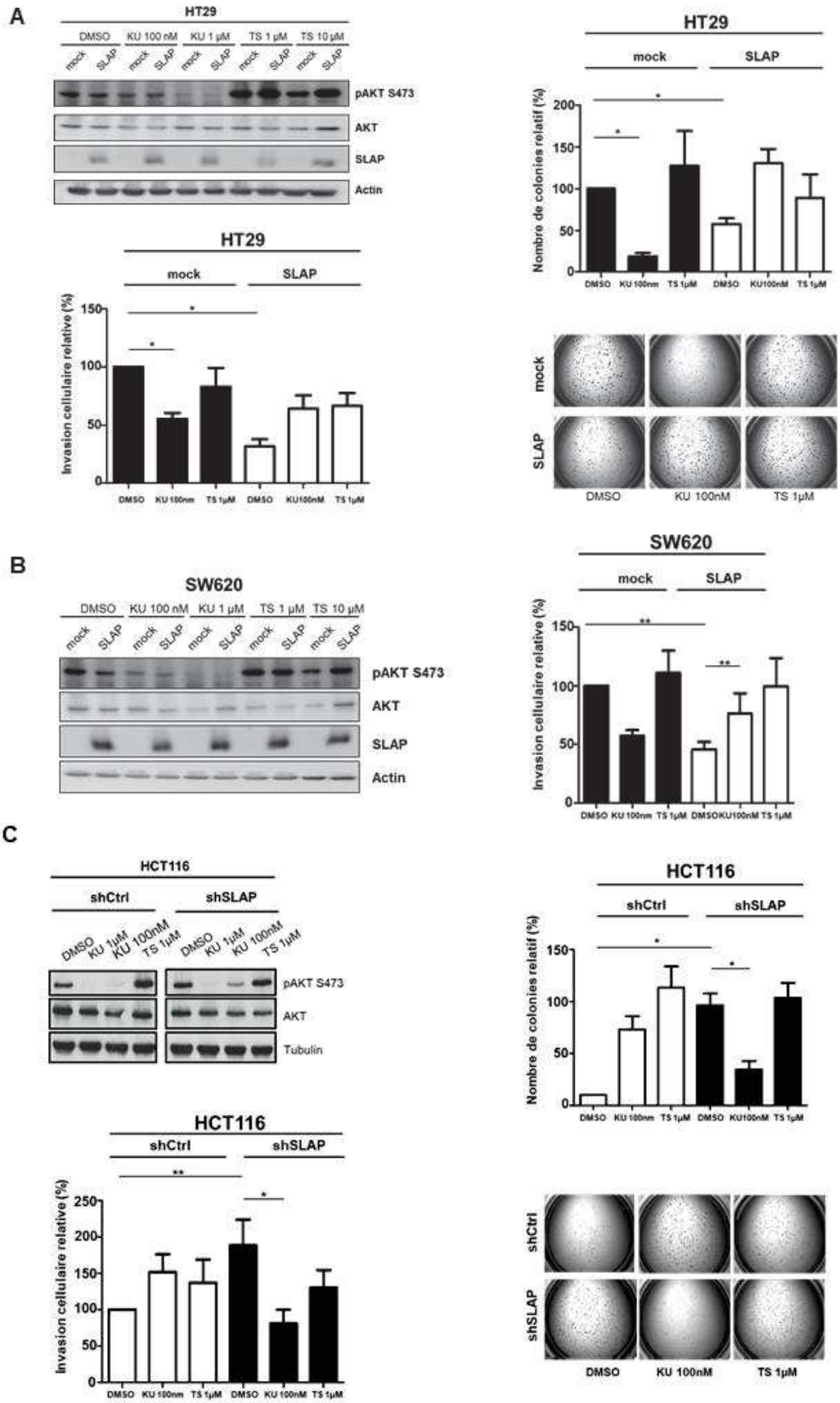


Figure 3 : Les fonctions anti-oncogéniques de SLAP dépendent de la régulation de la signalisation mTORC2/AKT.
(A, B) La déplétion de Rictor contrecarre les effets de SLAP**.** (A) Les cellules HCT116 contrôles (shCtrl) ou déplétées en SLAP (shSLAP) ont été infectées avec des rétrovirus exprimant un shRNA contrôle (shCtrl) ou un shRNA dirigé contre Rictor (shRictor) ou contre Raptor (shRaptor). (B) Les cellules SW620 contrôles (mock) ou surexprimant SLAP ont été transfectées avec un siRNA contrôle (siCtrl), ou des siRNA dirigés contre Rictor (siRictor) ou contre Raptor (siRaptor). (A, B) L'effet des shRNA ou siRNA a été validé par Western-blot avec les anticorps indiqués (panels de gauche). Les cellules indiquées ont été soumises à des tests d'invasion en chambre de Boyden (panels du milieu) et de croissance en agar mou (panels droits). **(C, D)** La surexpression de Rictor, mais pas de Raptor, restaure les effets anti-oncogéniques de SLAP. Les cellules HT29 (C, panels gauche et milieu) ou SW620 (D) contrôles (mock) ou surexprimant SLAP ont été infectées avec des rétrovirus exprimant une construction contrôle (mock), Rictor (C, panels gauche et milieu) ou Raptor (D). Les niveaux de Rictor, SLAP, pAKT S473 et AKT ont été détectés par Western-blot comme indiqué (C, panel gauche). Les cellules ont été soumises à un test d'invasion en chambre de Boyden (C, panels milieu et droit). **(E)** L'inhibition d'AKT contrecarre l'augmentation des capacités invasives et du nombre de colonies induites par la déplétion de SLAP. Les cellules HCT116 contrôles (shCtrl) ou déplétées en SLAP (shSLAP) ont été traitées avec un inhibiteur d'AKT (AKT ½) à 10µM pendant 2h ou avec du DMSO en contrôle. L'analyse par Western-blot montre la phosphorylation d'AKT sur la Ser473 ainsi que le taux d'AKT total (panel gauche). L'invasion relative des lignées indiquées a été déterminée dans un test en chambre de Boyden (panel du milieu) et le nombre de colonies par test de croissance en agar mou (panel de droite) après quantification via le logiciel Image J. Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le Student's *t*-test sur n≥3 expériences indépendantes ; ns (non significatif), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

4. SLAP désensibilise les cellules CCR aux inhibiteurs catalytiques de mTOR

J'ai ensuite cherché à déterminer si le niveau d'expression de SLAP pouvait influencer la sensibilité des cellules de CCR à l'inhibition pharmacologique de mTORC2. Comme aucun inhibiteur spécifique de mTORC2 n'est actuellement disponible, j'ai utilisé un inhibiteur catalytique de mTOR inhibant à la fois mTORC1 et 2, le Ku-0063794 (KU) et un inhibiteur spécifique de mTORC1, le temsirolimus (TS, un dérivé de la rapamycine), ceci dans le but d'avoir, indirectement, un indice de l'effet de l'inhibition spécifique de mTORC2. Par immunoblot, j'observe que le traitement des cellules HT29 et SW620 au TS entraine une hausse importante du niveau de phosphorylation d'AKT en S473 alors que le traitement des cellules au KU entraîne une diminution spécifique de cette phosphorylation dans les cellules contrôles, et cet effet est plus faible dans les cellules surexprimant SLAP **(Figures 4A et 4B, panel haut gauche)**. Au niveau fonctionnel, j'observe une forte baisse (environ 50-80%) de l'invasion cellulaire **(Figure 4A, panel bas gauche et 4B, panel droit)** et du nombre de colonies après le traitement KU dans les HT29 et SW620 contrôles **(Figure 4A, panel droit)**. La surexpression de SLAP rend ces cellules non seulement résistantes au KU mais de manière surprenante elle semble également potentialiser leurs propriétés oncogéniques. Le TS n'a, quant à lui, démontré aucun effet sur les cellules HT29 et SW620 contrôles **(Figures 4A et 4B)**, suggérant que l'effet observé lors du traitement au KU dans ces cellules pourrait être attribué à l'inhibition de la signalisation mTORC2. A l'inverse, l'augmentation des capacités invasives et de croissance en agar mou induites par la déplétion de SLAP (approches shRNA et siRNA) dans les cellules HCT116 est contrecarrée par le traitement au KU **(Figures 4C et 4D)**. Le traitement au TS des cellules HCT116 shCtrl

(exprimant SLAP) a pour effet d'exacerber ces capacités transformantes. Enfin, j'ai montré en utilisant un ensemble de 7 lignées cellulaires de CCR que le niveau d'inhibition de la phosphorylation d'AKT en Ser473 provoqué par le KU (traitement à 100nM pendant 1h) est inversement corrélé au niveau d'expression de SLAP endogène dans ces cellules **(Figure 4E)**. En effet, dans les cellules HCT116 présentant un fort niveau endogène de SLAP, le traitement KU a pour effet d'augmenter cette phosphorylation d'AKT S473. Au contraire, dans les cellules DLD1, ayant une faible expression de SLAP endogène, le KU induit une baisse drastique de cette phosphorylation (≈80%). Au niveau fonctionnel, j'ai également démontré que les effets anti-oncogéniques (inhibition de l'invasion et de la croissance en agar mou) du KU sont également inversement corrélés au niveau d'expression endogène de SLAP dans les 6 lignées cellulaires de CCR testées **(Figure 4F et Figure supplémentaire S3)**. Ensemble, ces résultats suggèrent que le niveau d'expression de SLAP pourrait permettre de prédire la sensibilité des cellules de CCR aux inhibiteurs catalytiques de mTOR.


A
HT29
DMSO
KU 100 nM
KU 1 µM
TS 1 µM
TS 10 µM
mock
SLAP
pAKT S473
AKT
SLAP
Actin
HT29
mock
SLAP
Invasion cellulaire relative (%)
DMSO
KU 100nm
TS 1µM
KU100nM
HT29
Nombre de colonies relatif (%)
mock
SLAP
DMSO
KU 100nM
TS 1µM
B
SW620
pAKT S473
AKT
SLAP
Actin
SW620
Invasion cellulaire relative (%)
C
HCT116
shCtrl
shSLAP
DMSO
KU 1µM
KU 100nM
TS 1µM
pAKT S473
AKT
Tubulin
HCT116
Invasion cellulaire relative (%)
HCT116
Nombre de colonies relatif (%)
shCtrl
shSLAP
DMSO
KU 100nM
TS 1µM

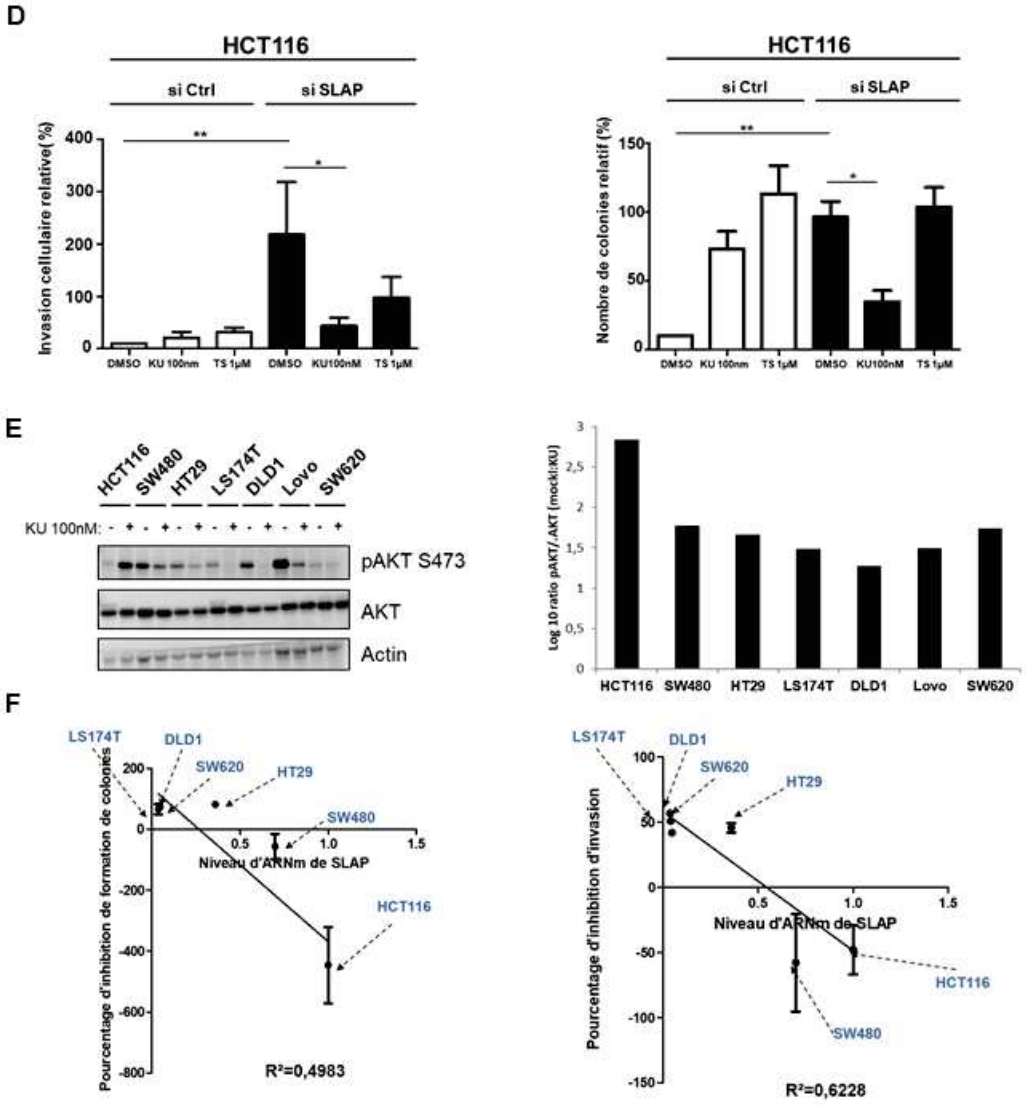


Figure 4 : SLAP désensibilise les cellules de CCR aux inhibiteurs catalytiques de mTOR.
(A, B) La surexpression de SLAP réduit la sensibilité au Ku-0063794. Les cellules HT29 (A) et SW620 (B) mock et surexprimant SLAP, ont été traitées avec le Ku-0063794 (KU, inhibiteur catalytique de mTORC1/C2), le temsirolimus (TS, inhibiteur spécifique de mTORC1) à la concentration indiquée, ou le DMSO en contrôle pendant 1h. Les extraits protéiques ont été analysés par Western-blot avec des anticorps spécifiques dirigés contre les protéines indiquées (panels gauche). La sensibilité relative aux inhibiteurs de mTOR a été mesurée en utilisant des tests d'invasion en chambre de Boyden (A, panel en bas, gauche et B, panel droit) et de croissance en agar mou (A, panel droit). **(C, D)** La déplétion de SLAP réduit la sensibilité au KU. Les cellules HCT116 contrôles (shCtrl) ou déplétées en SLAP (C, avec un shRNA SLAP ou D, avec un siRNA SLAP) ont été traitées pendant 1h avec le KU, le temsirolimus, ou le DMSO comme indiqué. Les extraits protéiques ont été analysés par Western-blot avec des anticorps spécifiques dirigés contre les protéines indiquées (panels gauche). La sensibilité relative aux inhibiteurs de mTOR a été mesurée en utilisant des tests d'invasion en chambre de Boyden (C, panel bas, gauche et D, panel gauche) et de croissance en agar mou (C et D, panels droits). **(E, F)** La réponse au KU est inversement proportionnelle au niveau d'expression de SLAP dans un panel de lignées de CCR. Western-blot (E, panel gauche) et quantification (E, panel droit) de la phosphorylation AKT en Ser473 sur le niveau total d'AKT total issu sur des extraits protéiques d'un panel de cellules de CCR (DLD1, Lovo, LS174T, SW620, HT29, SW480, HCT116) préalablement traitées avec le KU (100nM) pendant 1h. La sensibilité relative de ces diverses lignées de CCR au KU (100nM) a été évaluée en utilisant des tests d'invasion en chambre de Boyden (panel gauche) et de croissance en agar mou (panel droit). Le pourcentage d'inhibition est représenté en fonction du niveau d'expression du transcrit SLAP endogène. L'invasion cellulaire relative, le nombre de colonies relatif et le pourcentage d'inhibition d'invasion et de formation de colonies ont été calculés en utilisant le DMSO comme référence. Les analyses statistiques ont été réalisées sur n≥3 expériences indépendantes en utilisant le Student's *t*-test. ns (non significatif), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

5. Telo2 et LST8 sont les interacteurs majoritaires de SLAP au sein du complexe mTORC2

J'ai ensuite recherché le mécanisme moléculaire par lequel SLAP régule mTORC2. Pour se faire, mon premier objectif a été de mieux caractériser l'interaction entre SLAP et mTORC2 en explorant quel(s) composant(s) du complexe mTORC2 sont majoritairement impliqués dans cette interaction **(Figure 5A).** Pour ce faire, j'ai co-transfecté dans les cellules HEK293T les différents composants mTOR tagués Flag avec ou sans un SLAP tagué HA. L'immunoprécipitation de SLAP montre une interaction avec Telo2, Tti1, Rictor, LST8 et Sin1, confirmant les données de protéomique. Fait intéressant, aucune interaction n'a été observée entre SLAP et Raptor (spécifique à mTORC1) ce qui soutient l'hypothèse que SLAP interagisse spécifiquement avec le complexe mTORC2 **(Figure 5A, panel gauche)**. La quantification du niveau relatif d'interaction entre les composants-Flag et HA-SLAP (calculé en %, en rapportant le signal spécifique observé dans l'IP au niveau de surexpression dans 4% de lysat total ayant servi à l'IP), montre que respectivement 60% du Telo2 surexprimé et 35% du LST8 immunoprécipite avec SLAP **(Figure 5A, panel droit)**. Telo2 et LST8 semblent donc être les deux principaux partenaires d'interaction de SLAP avec le complexe mTORC2.

Ensuite, j'ai cherché quels domaines de SLAP sont nécessaires pour interagir avec ces composants mTORC2. Pour cette étude de structure-fonction, j'ai utilisé différents mutants de SLAP : le mutant du domaine SH2 (SLAP SH2*), le mutant du domaine SH3 (SLAP SH3*), le double mutant SH3*SH2* et le mutant N32 ne possédant plus le domaine C-terminal unique **(Figure 5B)**. Il est important de noter que la stabilité du domaine SH3 dépend du domaine SH2, et que la mutation du domaine SH3 suffit à

déstabiliser le domaine SH2 (Wybenga-Groot et McGlade 2013). Des lignées SW620 surexprimant ces différents mutants SLAP (ou un SLAP WT) ont été générées par infection rétrovirale, puis j'ai analysé l'effet de ces mutants sur l'interaction SLAP-Rictor, -mTOR, -Telo et -LST8 **(Figure 5C)**. En premier lieu, l'immunoprécipitation de SLAP confirme que SLAP WT interagit avec Rictor, mTOR, Telo2 et LST8 endogènes. De plus, les interactions entre SLAP-Telo2 et SLAP-LST8 (ainsi que SLAP-Rictor) sont dépendent du domaine SH2 et du domaine SH3. En effet, les niveaux de Telo2 et LST8 immunoprécipités sont plus faibles avec le mutant SH2 (respectivement 48% et 60%), le mutant SH3 (respectivement 59% et 43%) et avec le double mutant (respectivement 59% et 22%) comparé au niveau immunoprécipité avec SLAP WT. Enfin la queue N-terminale ne semble pas nécessaire à l'interaction SLAP-mTORC2, SLAP-Telo2 ou SLAP-LST8, comme suggéré par les niveaux de mTOR, Rictor, Telo2, LST8 associés au mutant N32.

Ensuite, pour confirmer de manière un peu plus directe les interactions SLAP-Telo2 et SLAP-LST8, j'ai effectué des expériences de pulldown en utilisant des GST-SLAP produites en bactéries avec des lysats de HEK293T transfectées surexprimant les protéines exogènes Telo2-Flag ou LST8-Flag **(Figures 5D)**. Plus spécifiquement, la production de la GST-SLAP mutée sur le domaine SH2 ayant été infructueuse, j'ai utilisé les constructions GST-SLAP N32 (SLAP ne possédant plus le domaine C-terminal unique) et GST-SLAP N3*2 (muté sur son domaine SH3, ce qui déstabilise également le domaine SH2). Les résultats confirment que SLAP interagit avec Telo2 mais de manière peu dépendante de la mutation du domaine SH3 **(Figure 5D, panel gauche)**. L'interaction SLAP-LST8 a également été confirmée et semble être dépendante du domaine SH3 compte tenu de la forte baisse du niveau d'interaction observée avec le mutant N3*2 **(Figure 5D, panel droit)**. Ces expériences de GST-

pulldowns suggèrent que les interactions entre SLAP et -LST8/-Telo2 peuvent être directes, mais nécessitent d'être confirmées avec les protéines recombinantes purifiées. En résumé, je montre que SLAP interagit majoritairement avec Telo2 et LST8 au sein du complexe mTORC2 et que cette interaction est dépendante des domaines SH2 et SH3 de SLAP.

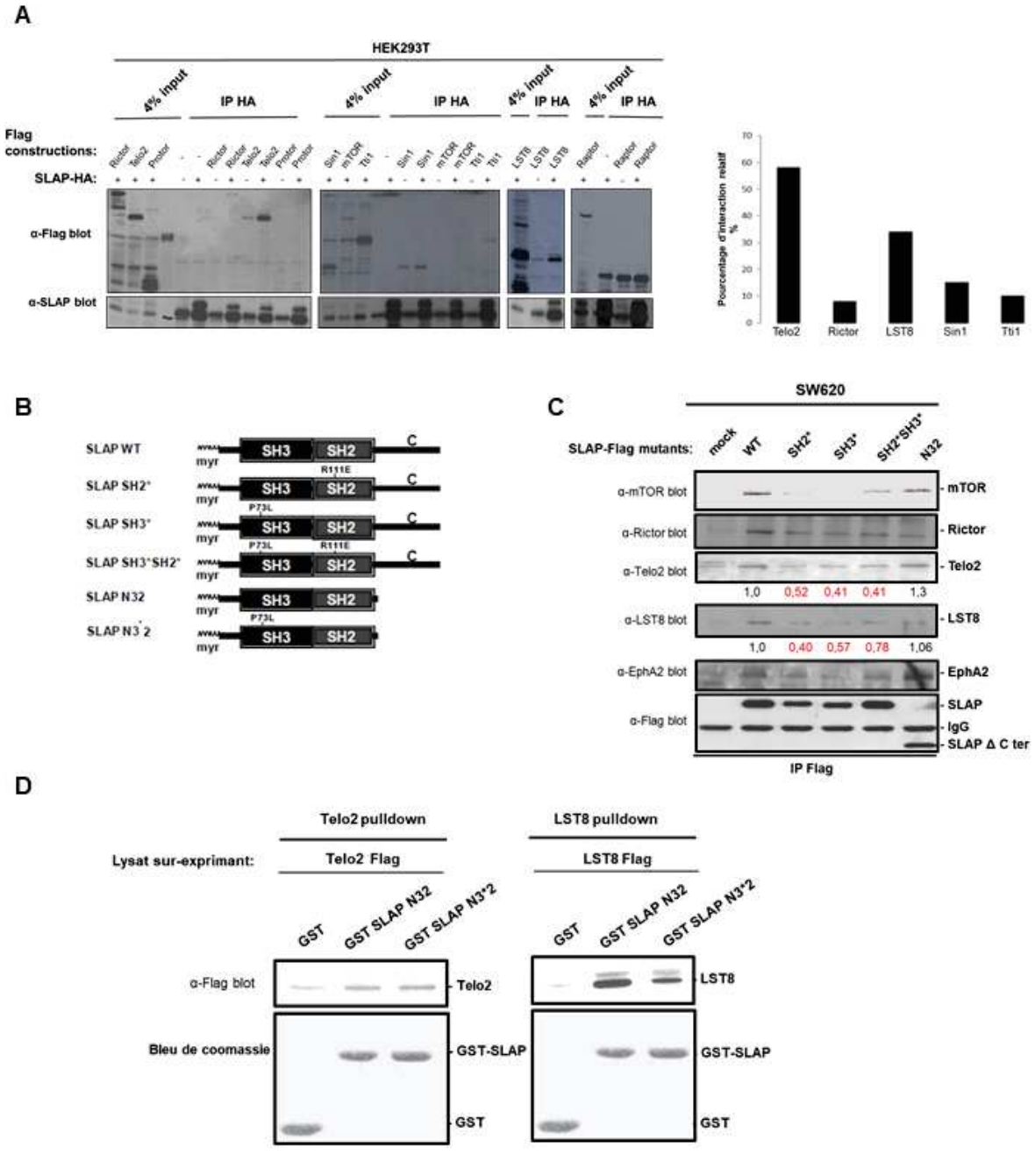


Figure 5 : Telo2 et LST8 sont les interacteurs majoritaires de SLAP au sein du complexe mTORC2.
(A) SLAP interagit majoritairement avec LST8 et Telo2. Les lysats de cellules HEK293T co-transfectées avec SLAP tagué HA (SLAP-HA) et les différents composants mTORC2 tagués Flag comme indiqué, ont été soumis à une immunoprécipitation avec des anticorps anti-HA. Le niveau de SLAP-HA immunoprécipité et le niveau de chaque composant mTORC2 associé à SLAP a été détecté par Western-blot (panel gauche). Le niveau relatif d'interaction (en %) entre les composants-Flag et HA-SLAP a été quantifié en utilisant ImageJ avec l'input (4% du lysat cellulaire total) servant de niveau d'expression basal (panel droit). **(B)** Représentation schématique des différents mutants SLAP utilisés. **(C, D)** L'interaction de SLAP avec Telo2 et LST8 est SH2-SH3 dépendante. Les cellules SW620 exprimant de manière stable les mutants SLAP-Flag indiqués ont été lysées et soumises à une immunoprécipitation anti-Flag. Les composants mTORC2 endogènes associés à SLAP ont été analysés par Western-blot (C). EphA2, un partenaire d'interaction de SLAP connu qui interagit avec son domaine SH2, a été utilisé comme contrôle positif. (D) Des expériences de GST-pulldown ont été réalisées en la GST seule (GST), une GST-SLAP WT (GST SLAP N32) ou un mutant GST-SLAP SH3 (GST SLAP N3*2) avec des lysats de cellules HEK293T surexprimant soit Telo2-Flag ou LST8-Flag. Les protéines soumises au pulldown ont été analysées par Western-blot et la coloration au bleu de Coomassie du gel montre des niveaux égaux de GST entre les échantillons.

6. Les propriétés anti-oncogéniques de SLAP dépendent du ciblage de LST8

J'ai ensuite cherché à comprendre la relevance de ces interactions SLAP-Telo2 et SLAP-LST8 sur l'activité anti-oncogénique de SLAP. Je me suis premièrement intéressé à caractériser ce lien entre Telo2 et SLAP et pour se faire j'ai analysé l'effet de la déplétion spécifique de ce composant du complexe TORC2. Puisque Telo2 est essentiel à la survie cellulaire, j'ai opté pour un système de dégron inductible, le AID (*Auxin Inducible Degron*). Ce système qui vient de la plante, permet une dégradation rapide, inductible et réversible d'une protéine d'intérêt à laquelle est fusionnée le dégron, suite à l'ajout d'une hormone de plante, l'auxine. La séquence du AID a été insérée au locus endogène du gène *TELO2*, à l'extrémité C-terminale de la phase ouverte de lecture, grâce à la technique du CRISPR/Cas9. En tirant profit de ce système, j'ai ainsi montré par des expériences de co-immunoprécipitation, que la délétion de Telo2 dans deux lignées cellulaires de CCR Telo2 AID (DLD1 et HCT116) surexprimant un SLAP-Flag n'affecte pas l'interaction de SLAP avec Rictor **(Figure 6A)**. De manière cohérente, la transduction rétrovirale de Telo2 n'a pas réussi à restaurer les propriétés transformantes des HT29 surexprimant SLAP **(Figure 6B)**. A la lueur de ces résultats, il semblerait que Telo2 ne soit pas la cible principale au sein du complexe mTORC2, responsable des propriétés anti-oncogéniques de SLAP.

Au vu de ces résultats négatifs concernant Telo2, je me suis donc logiquement dirigé vers le composant LST8. De manière intéressante, la déplétion de LST8 par une approche siRNA diminue l'interaction entre SLAP et Rictor après immunoprécipitation du Rictor endogène **(Figure 7A, panel gauche)** dans les cellules SW620 surexprimant

SLAP-Flag et de manière inverse après l'immunoprécipitation du SLAP-Flag dans les cellules HT29 **(Figure 7A, panel droit)**.

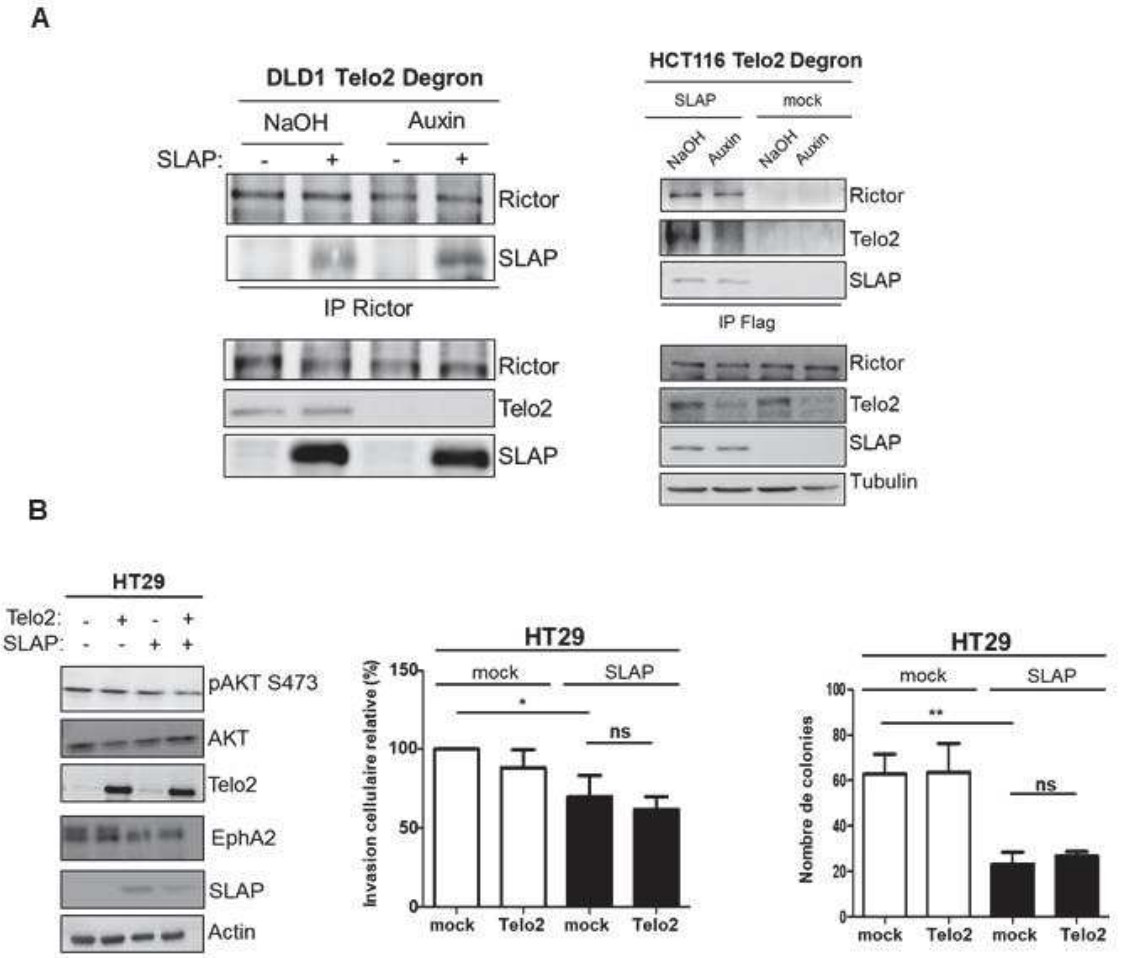
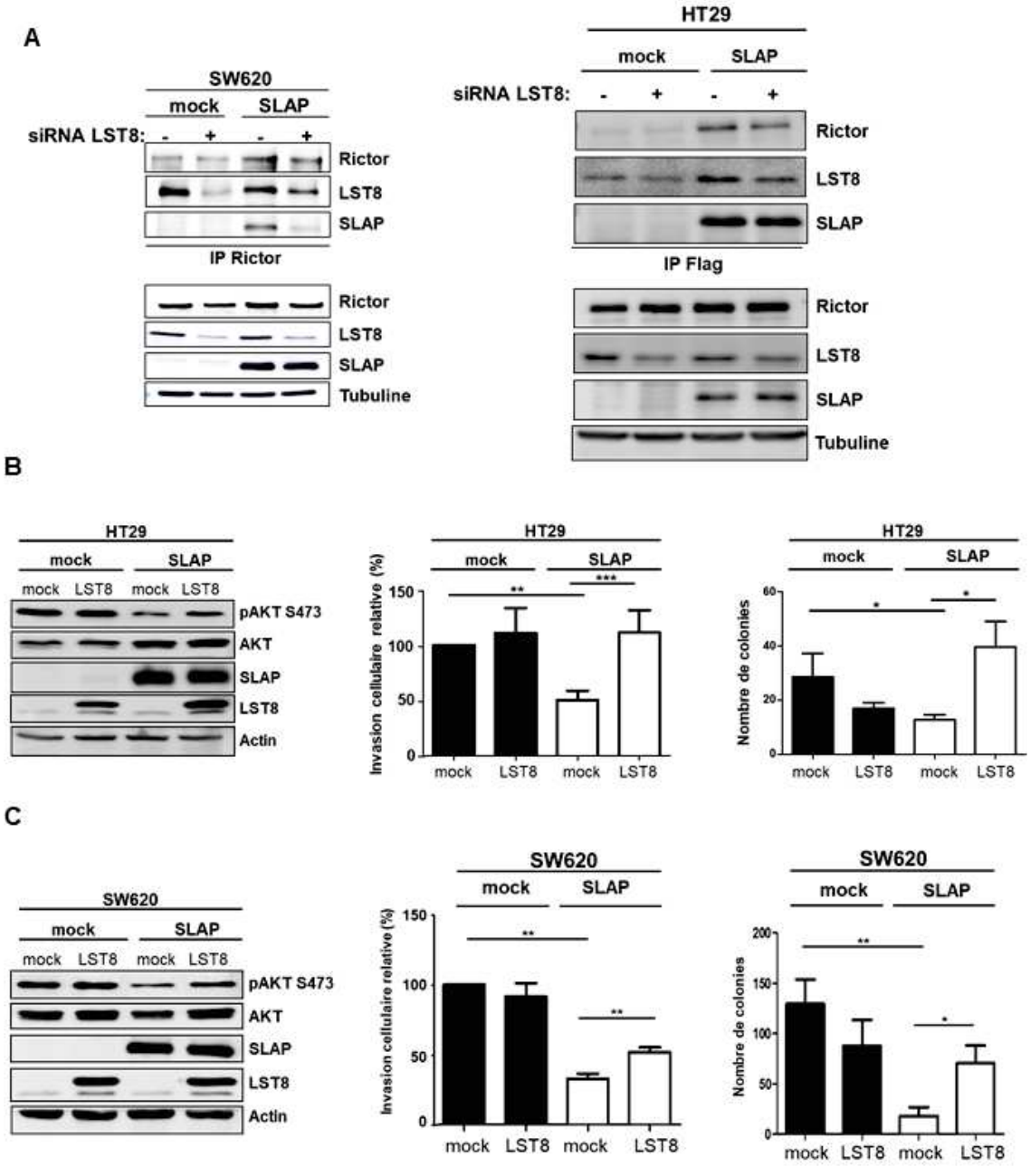


Figure 6 : Les propriétés anti-oncogéniques de SLAP sont indépendantes du ciblage de Telo2
(A) La déplétion de Telo2 ne modifie pas l'interaction entre SLAP et Rictor. Les cellules DLD1 (panel gauche) et HCT116 (panel droit) Telo2-dégron exprimant de manière stable soit SLAP-Flag soit un vecteur pMX vide (mock) ont été traitées pendant 2h avec du NaOH (en contrôle) ou de l'auxine pour induire la dégradation de Telo2. Les lysats ont ensuite été soumis à une immunoprécipitation anti-Rictor ou anti-Flag. Les niveaux de protéines indiquées associées à SLAP ou dans le lysat total ont été détectés par Western-blot. **(B)** La surexpression de Telo2 ne contrecarre pas les effets anti-oncogéniques de SLAP. Les cellules HT29 contrôles, surexprimant SLAP, Telo2 ou les deux ont été soumises à des tests d'invasion en chambre de Boyden (panel du milieu), de croissance en agar mou (panel droit) et les extraits protéiques correspondants ont été analysés par Western-blot avec des anticorps dirigés contre les protéines indiquées (panel gauche). L'invasion cellulaire relative a été calculée en utilisant le DMSO comme référence. Les analyses statistiques ont été réalisées sur n≥3 expériences indépendantes en utilisant le Student's t-test. ns (non significatif), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Ces résultats suggèrent que l'interaction de SLAP avec le complexe mTORC2 est dépendante de LST8. J'ai ensuite validé fonctionnellement l'importance de l'interaction entre SLAP et LST8 dans le contrôle des propriétés anti-oncogéniques exercées par

SLAP dans les cellules CCR. Plus précisément, j'ai montré que la surexpression de LST8 restaure les propriétés de transformation (invasion et croissance indépendante de l'ancrage) qui avaient été inhibées par la surexpression de SLAP dans les lignées SW620 et HT29 **(Figures 7B et 7C)**. Inversement, les effets oncogéniques induits par la déplétion de SLAP dans la lignée HCT116 **(Figure 7D)** peuvent être contrecarrés par la déplétion de LST8 par une approche siRNA. L'ensemble de ces résultats indique donc que l'activité anti-oncogénique de SLAP dans les cellules de CCR, liée au ciblage de mTORC2, est dépendante de LST8, mais pas de Telo2.



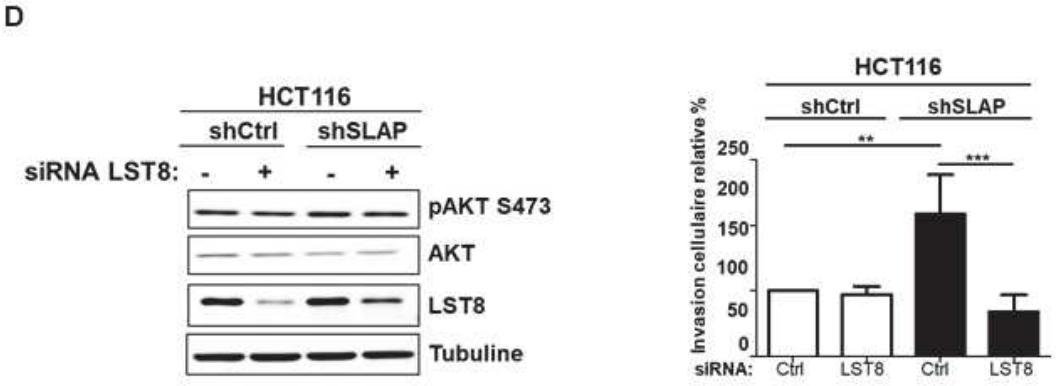


Figure 7 : Les propriétés anti-oncogéniques de SLAP sont dépendantes du ciblage de LST8.
(A) La déplétion de LST8 diminue l'interaction entre SLAP et Rictor. Les lysats de cellules SW620 (panel gauche) et HT29 (panel droit) exprimant de manière stable soit SLAP-Flag soit un vecteur pMX vide (mock) ont été respectivement soumis à une immunoprécipitation anti-Rictor ou anti-Flag. Les niveaux de protéines indiquées associées à Rictor ou à SLAP, ou dans le lysat total ont été détectés par Western-blot. **(B, C)** La surexpression de LST8 contrecarre les effets anti-oncogéniques de SLAP. Les cellules HT29 (B) ou SW620 (C) contrôle, surexprimant SLAP, LST8 ou les deux ont été soumises à des tests d'invasion en chambre de Boyden (panel du milieu), de croissance en agar mou (panel droit) et les extraits protéiques correspondants ont été analysés par Western-blot avec des anticorps dirigés contre les protéines indiquées (panels gauche). **(D)** La déplétion de LST8 restaure les capacités invasives des cellules déplétées en SLAP. Les cellules HCT116 contrôles (shCtrl) ou déplétées en SLAP (shSLAP) ont été transfectées avec un siRNA contrôle ou un siRNA dirigé contre LST8 pendant 48h puis ont été soumises à un test d'invasion en chambre de Boyden (panel droit). Les niveaux de LST8, AKT, pAKT S473 ont été obtenus par Western-blot sur le lysat total (panel gauche).

7. SLAP désorganise le complexe mTORC2 mature/actif

Les travaux précédemment publiés sur les fonctions régulatrices de SLAP impliquent souvent un mécanisme de dégradation *via* le protéasome. En effet, précédemment au laboratoire, j'ai montré que SLAP inhibe la tumorigenèse colique en induisant la déstabilisation/dégradation par le protéasome du substrat métastatique de SRC : EphA2 (Naudin et al. 2014). De même dans le système immunitaire, SLAP régule négativement l'activité et le développement lymphocytaire en induisant la dégradation de substrats de la tyrosine kinase Lck. Par ailleurs, il est connu que l'activité mTORC2 peut être inhibée par déstabilisation et/ou dégradation des composants de ce complexe dont LST8, Rictor, mTOR (Y. Jiang et al. 2019). J'ai donc d'abord recherché si l'inhibition de la signalisation mTORC2 médiée par SLAP, pouvait impliquer la déstabilisation d'un ou de plusieurs composants du complexe mTORC2. Alors que la

surexpression de SLAP dans les cellules SW620 et HT29 induit une diminution importante du niveau de d'EphA2, elle ne modifie pas le taux protéique global des différents composants de mTORC2, à savoir Telo2, mTOR, Sin1, Rictor, Tti1, LST8 **(Figure 8A).** J'ai également évalué si la surexpression de SLAP avait une incidence sur le niveau des différents composants associés au complexe mTORC2. L'analyse du niveau de chaque composant après immunoprécipitation de mTORC2 (*via* l'IP de son composant spécifique Rictor) montre que la surexpression de SLAP n'influence pas de manière significative le taux protéique global de chacun des composants au sein du complexe, même si elle semble légèrement diminuer le taux de LST8 et de Sin1 associé à Rictor **(Figure 8A)**. Pour aller un peu plus loin, j'ai également analysé l'effet de l'expression de SLAP sur la stabilité/demi-vie protéiques des différents composants de mTORC2 en traitant les cellules SW620 avec l'inhibiteur de la biosynthèse protéique, le cycloheximide (CHX) **(Figure 8B)**. Premièrement, j'ai observé que la demi-vie de ces composants est relativement longue, puisqu'en effet leurs niveaux protéiques restent inchangés même après 24h de traitement à la CHX. Par ailleurs, la surexpression de SLAP n'affecte pas leurs abondances et ce quel que soit le temps de traitement. Ces résultats suggèrent donc que SLAP n'induit pas la dégradation/la déstabilisation des membres du complexe mTORC2.

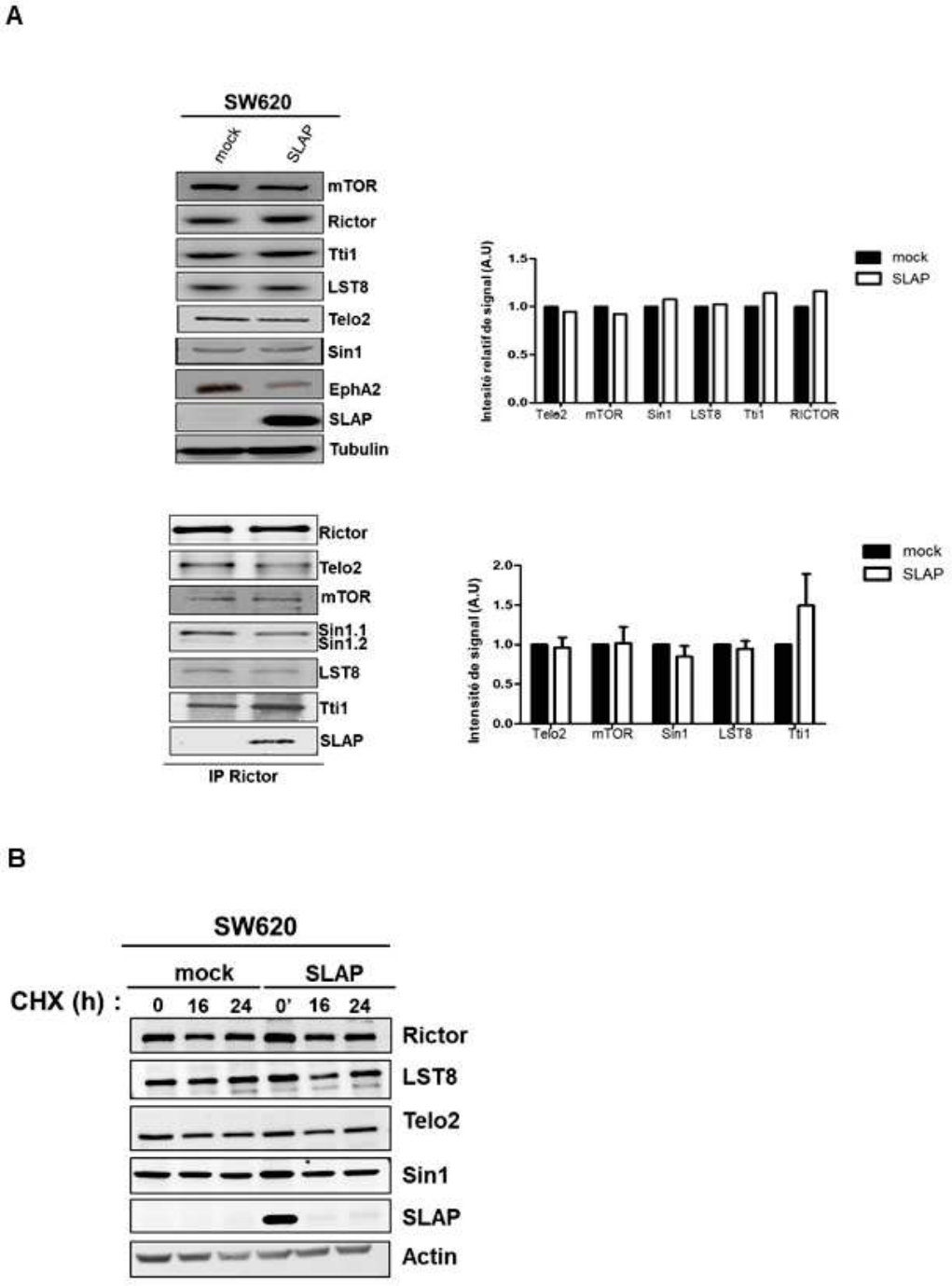
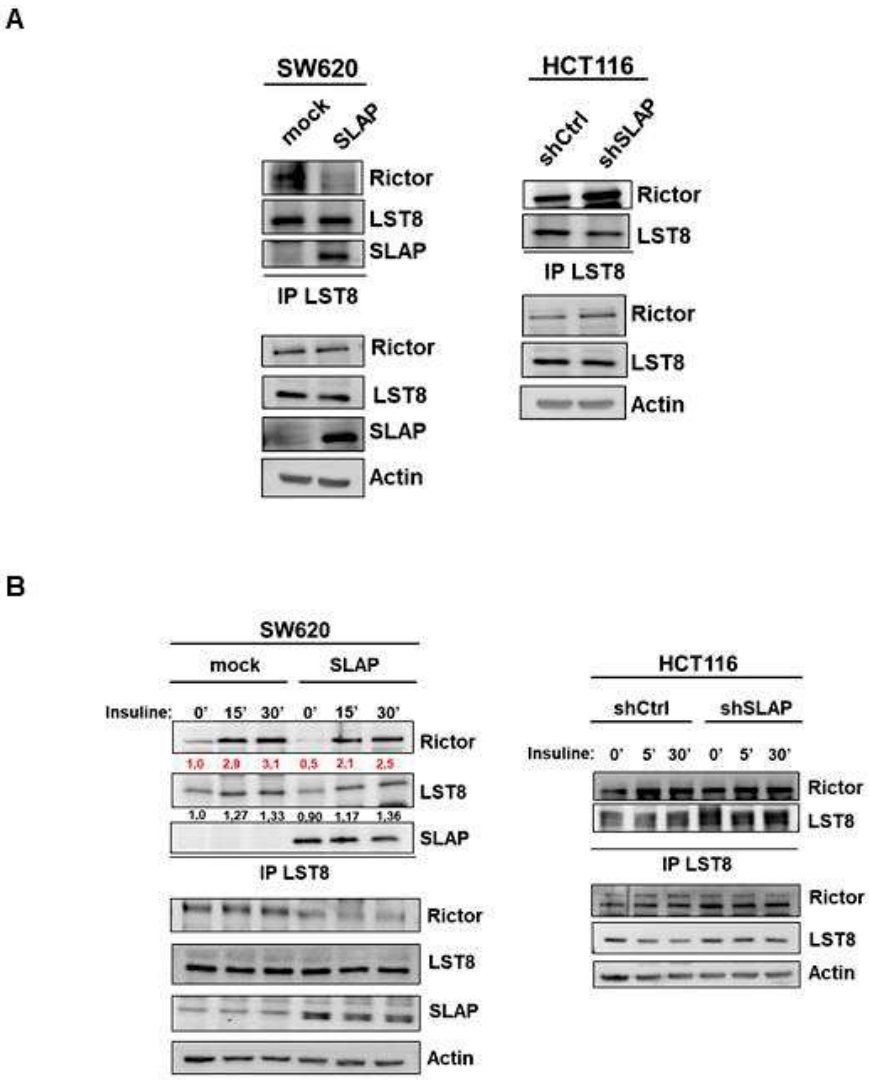


Figure 8 : SLAP ne modifie pas la stabilité des composants de mTORC2.
(A) SLAP ne modifie pas le niveau d'expression des différents composants de mTORC2. Les cellules SW620 surexprimant SLAP-Flag ou contrôles (mock) ont été lysées et le niveau des divers composants mTORC2 a été analysé par Western-blot en utilisant des anticorps spécifiques comme indiqué. EphA2, a servi de contrôle positif. Les lysats ont ensuite été soumis à une immunoprécipatation (IP) anti-Rictor. Le niveau de protéines indiquées associées à Rictor a été détecté par Western-blot. Les quantifications correspondantes sont représentées à gauche. **(B)** SLAP ne modifie pas la stabilité/demi-vie des différents composants de mTORC2. Les cellules de CCR SW620 contrôles (mock) ou surexprimant SLAP ont été traitées à la cycloheximide (CHX) à 10µg/ml pendant le temps indiqué (0h, 16h, 24h) puis le niveau des divers composants mTORC2 a été analysé par Western-blot en utilisant des anticorps spécifiques comme indiqué.

De manière intéressante, dans un article publié en 2017 dans la revue Nature, Wenyi Wei *et al.* ont rapporté que la poly-ubiquitination de LST8 médiée par l'E3 ligase TRAF2 régit la dynamique du complexe mTORC2 en perturbant l'interaction de LST8 avec Sin1/Rictor. Nous avons ainsi émis l'hypothèse que SLAP pourrait réguler le maintien/l'assemblage du complexe mTORC2 mature par un mécanisme impliquant l'ubiquitination de LST8. J'ai dans un premier temps, voulu déterminer si SLAP pouvait perturber l'interaction de LST8 avec Rictor. Par des expériences de co-immunoprécipitation, j'ai observé qu'en interagissant avec LST8, SLAP perturbe la formation du complexe mTORC2 mature dans les cellules SW620 déprivées en sérum, comme le révèle une interaction LST8-Rictor moins importante **(Figure 9A, panel gauche)**. De manière inverse, la déplétion de SLAP dans les HCT116 déprivées en sérum favorise l'association LST8-Rictor **(Figure 9A, panel droit)** et donc l'activité mTORC2. Pour aller plus loin, j'ai utilisé la même stratégie d'expérience dans des conditions propices à l'activation de mTORC2, i.e. sous stimulation à l'insuline. Comme attendu l'insuline augmente, de manière dépendante du temps, l'association de LST8 et de Rictor à la fois dans les cellules SW620 et les HCT116 **(Figure 9B**). En revanche, j'observe que cette association est plus faible dans les cellules avec une forte expression de SLAP (SW620 SLAP et HCT116 shCtrl). Ainsi, ces résultats montrent que l'interaction SLAP avec LST8 empêche la formation d'un complexe mTORC2 mature. J'ai ensuite voulu déterminer si SLAP était capable d'induire l'ubiquitination de LST8 dans les cellules de CCR. Par des expériences d'ubiquitination dans les cellules HEK293T, j'ai confirmé que LST8 est poly-ubiquitiné en condition normale et que la surexpression de SLAP augmente sensiblement le niveau d'ubiquitination de LST8 **(Figure 9C)**. J'ai ensuite recherché quelle était l'ubiquitine-ligase impliquée et je me suis d'abord demandé si, comme l'ubiquitination de LST8

dans les cellules MEF, cette ubiquitination de LST8 par SLAP pouvait être médiée par l'E3 ubiquitine ligase TRAF2, bien que cette dernière n'a pas été identifiée dans notre interactome. Mais cette hypothèse a rapidement été invalidée par des expériences de co-immunoprécipitation qui ont montré que SLAP n'interagissait pas avec TRAF2 **(Figure 9D)**.



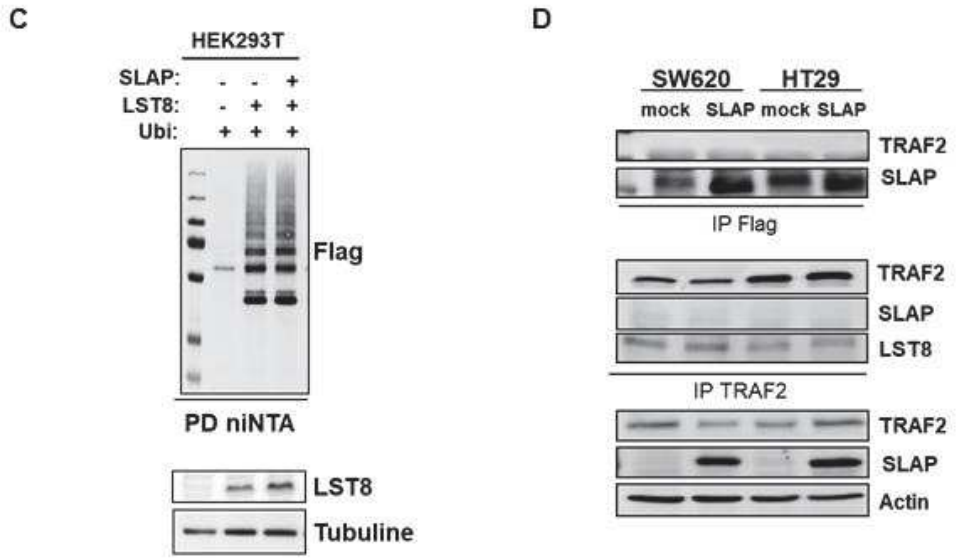


Figure 9 : SLAP désorganise le complexe mTORC2 mature/actif.
(A) SLAP inhibe l'interaction entre LST8 et Rictor en condition de déprivation. Les cellules SW620 contrôle (mock) ou surexprimant SLAP (panel gauche) et HCT116 déplétées en SLAP (shSLAP) ou contrôle (shCtrl) (panel droit) ont été cultivées en absence de sérum pendant 48h. Les lysats ont ensuite été soumis à une immunoprécipitation anti-LST8 et le niveau de Rictor associé à LST8 a été détecté par Western-blot. L'expression de Rictor, LST8, SLAP et de l'actine comme contrôle de charge dans les lysats totaux ont également été analysés. **(B)** SLAP inhibe l'interaction entre LST8 et Rictor après stimulation à l'insuline. Les cellules indiquées ont été déprivées pendant 48h puis restimulées avec 100nM d'insuline pendant le temps indiqué (0, 5, 15 ou 30 minutes). Les lysats ont ensuite été soumis à une immunoprécipitation anti-LST8 et le niveau de Rictor associé à LST8 a été détecté par Western-blot. L'expression de Rictor, LST8, SLAP et actine comme contrôle de charge dans les lysats totaux ont également été analysés. **(C)** LST8 est ubiquitinylé par SLAP. Les cellules HEK293T ont été transfectées avec une construction permettant de surexprimer de l'ubiquitine taguée histidine (Ub-His), en présence ou non de LST8-Flag et SLAP-HA. Après 48h, les cellules ont été traitées avec l'inhibiteur du protéasome MG132 (10µM, pendant 4h) puis lysées en conditions dénaturantes. Les protéines ubiquitinylées ont été purifiées sur colonne de nickel. L'ubiquitination de LST8 a été détectée par Western-blot avec un anticorps anti-Flag. L'analyse par Western blot à partir de lysat cellulaire total montre le niveau d'expression global de LST8. La tubuline sert de contrôle de charge. **(D**) SLAP n'interagit pas avec TRAF2. Les lysats des cellules HT29 et SW620 surexprimant SLAP-Flag ou contrôles (mock) ont été soumis à une immunoprécipitation (IP) anti-Flag ou anti-TRAF2 puis analysés par Western-blot en utilisant des anticorps spécifiques comme indiqué. Le niveau de SLAP, TRAF2 et de tubuline a été également analysé dans le lysat total.

Conclusion

En résumé, ce travail a permis d'identifier un nouveau mécanisme associé aux fonctions anti-oncogéniques de SLAP dans les cellules de CCR. Ainsi, j'ai montré que SLAP inhibe la signalisation mTORC2/AKT en induisant la désorganisation structurelle et fonctionnelle du complexe mTORC2 par sa liaison avec son composant cible LST8. Nous proposons le modèle suivant **(Figure 10)** : en interagissant avec LST8 d'une part, et avec différentes ubiquitine-ligases d'autre part, SLAP induirait la poly-

ubiquitination de LST8 au sein de mTORC2, résultant en la désorganisation du complexe mature et l'inhibition de la signalisation oncogénique mTORC2/AKT dans les cellules CCR SLAP positives ; ce faible niveau d'activité basale de la signalisation mTORC2/AKT rendent ces cellules SLAP positives « insensibles » à l'inhibition pharmacologique de mTORC2. En l'absence de SLAP, les ubiquitines ligases ne pourraient pas être recrutées au niveau de LST8, ce qui maintiendrait le complexe mTORC2 actif et mature et favoriserait alors la signalisation mTORC2/AKT et les propriétés oncogéniques ; ce haut niveau d'activité mTORC2/AKT rendant ces cellules plus « sensibles » à l'inhibition pharmacologique de mTORC2.

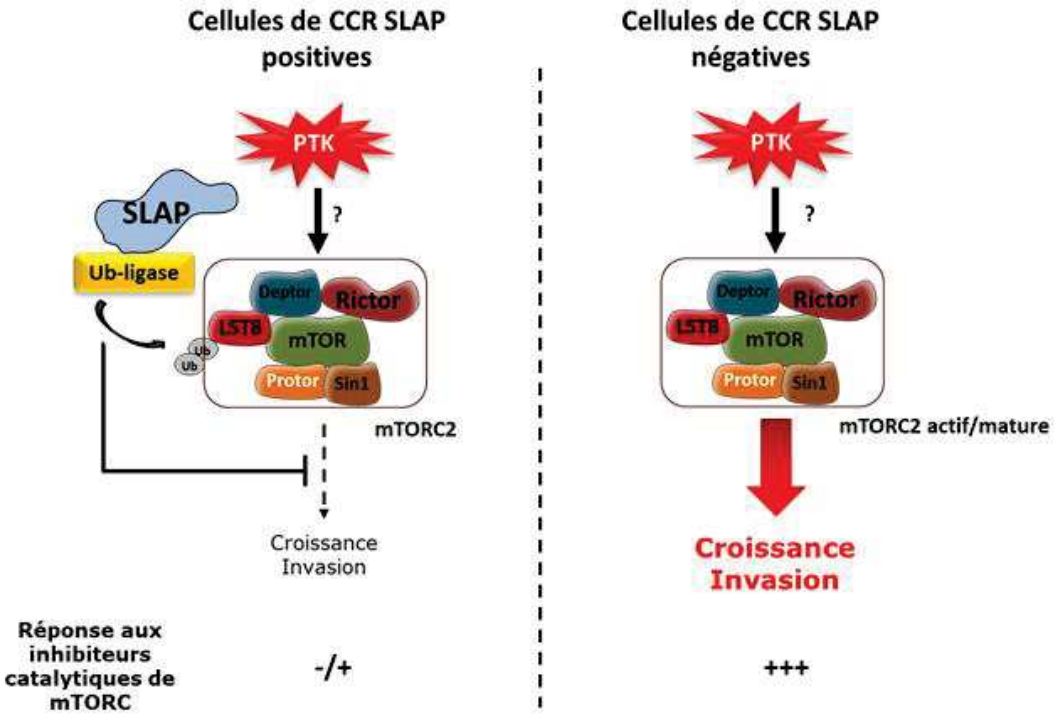


Figure 10 : Modèle présentant l'activation de la signalisation mTORC2 reliée à l'inactivation de SLAP dans les cellules de CCR.

Résultats complémentaires

1. SLAP régule les propriétés souches cancéreuses

SLAP étant un puissant suppresseur de la croissance tumorale et de la formation de métastases chez la souris, j'ai voulu explorer son implication dans l'initiation tumorale reliée aux capacités souches cancéreuses. Nos résultats indiquent que la surexpression de SLAP dans les cellules HT29 et SW620 réduit de manière drastique leurs capacités initiatrices de tumeurs, visible par la diminution du nombre et de la taille de colosphères **(Figure 11A, panels haut, gauche et milieu)** et du pourcentage de cellules $ALDH^+$ **(Figure 11A, panels bas, gauche et milieu)**. A l'inverse, la déplétion de SLAP dans la lignée HCT116 augmente la formation de colosphères **(Figure 11A, panel haut droit)** et le pourcentage de cellules $ALDH^+$ **(Figure 11A, panel bas droit)**. Par ailleurs, j'ai montré que cet effet est contrecarré par la déplétion de Rictor **(Figure 11B, panel gauche)** et par l'inhibition pharmacologique de mTORC2/mTORC1, mais pas de mTORC1 **(Figure 11B, panel droit)**. Ces résultats indiquent donc que SLAP régule les propriétés souches cancéreuses de manière dépendante de mTORC2.

En accord avec un rôle important de SRC dans l'initiation et la progression tumorales intestinales, l'inhibition pharmacologique de son activité par le saracatinib (AZD0530) réduit de manière drastique le nombre et la taille des colosphères dans les cellules SW620 **(Figure 11C)**. De plus, j'observe que le saracatinib a un effet inhibiteur plus important dans les cellules HCT116 déplétées en SLAP que dans les cellules contrôles **(Figure 11D)**. Ces résultats suggèrent : (i) que le niveau d'expression de SLAP peut également permettre de prédire la sensibilité des CSC aux inhibiteurs de SRC, et (ii) que SLAP régule les propriétés souches cancéreuses de manière SRC/mTORC2 dépendante.

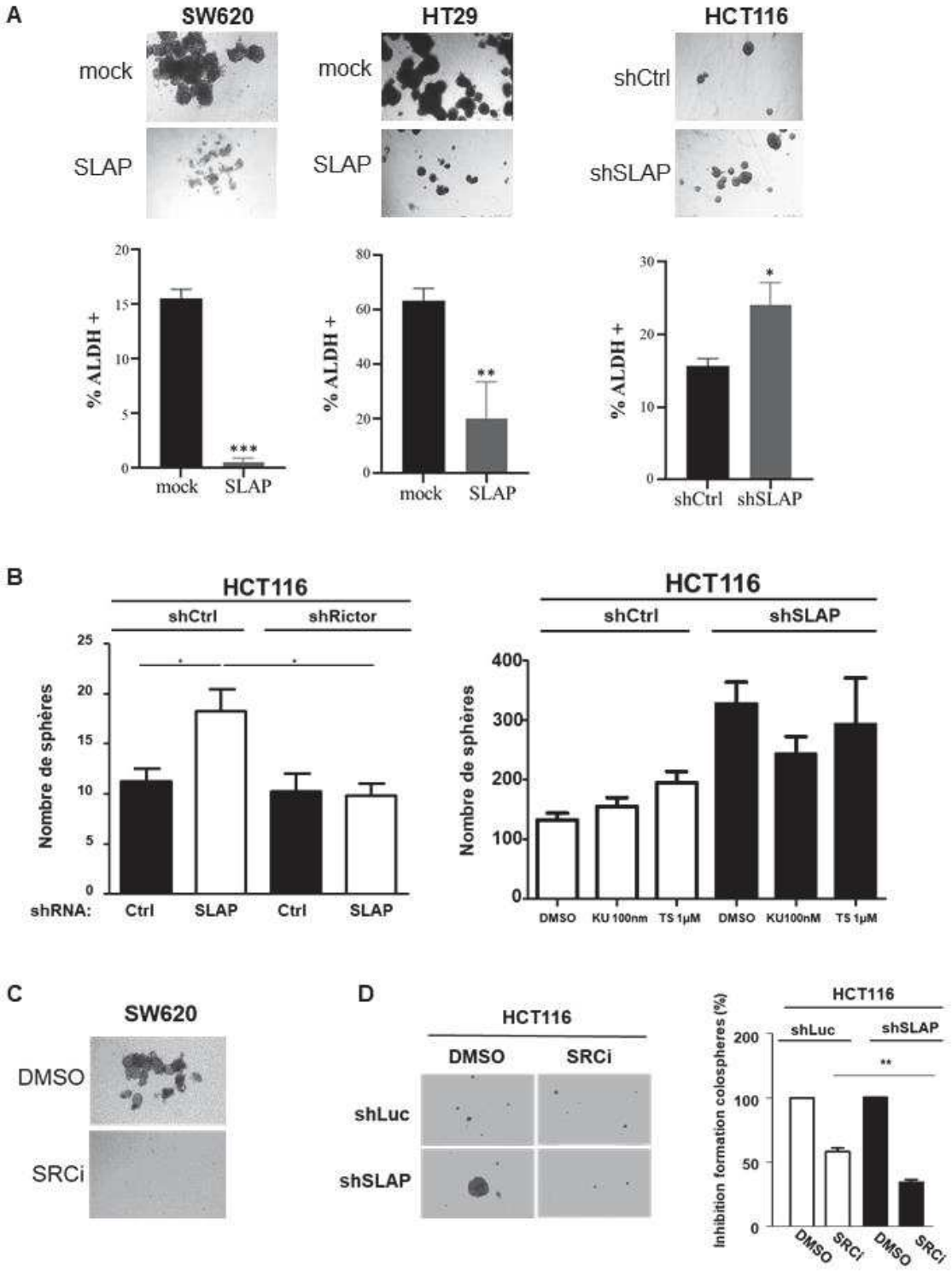


Figure 11 : SLAP régule les propriétés souches cancéreuses.
(A) SLAP inhibe les propriétés souches cancéreuses. Les cellules indiquées ont été cultivées dans des conditions favorisant la survie/croissance des cellules ayant des propriétés initiatrices de tumeur. Le pourcentage de cellules ADLH$^+$ dans les lignées indiquées a été déterminé par FACS à l'aide du kit ALDEFLUOR. **(B)** SLAP régule les propriétés souches cancéreuses de manière mTORC2 dépendante. La déplétion de Rictor (shRictor) contrecarre l'augmentation du nombre de colosphères induit par la déplétion de SLAP (shSLAP) dans la lignée HCT116 (panel gauche). Les cellules déplétées en SLAP sont plus sensibles au KU-0063794 (100nM) (panel droit). **(C, D)** SLAP régule les propriétés souches cancéreuses de manière SRC dépendante. L'inhibition de SRC par le saracatinib (AZD0530) à la dose 1µM inhibe la formation de colosphères dans la lignée SW620 (C). Les cellules déplétées en SLAP sont plus sensibles à l'inhibition de SRC (saracatinib à 1µM) (D). Les analyses statistiques ont été réalisées sur n=3 expériences indépendantes en utilisant le Student's t-test. ns (non significatif), *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

2. La régulation de la signalisation mTORC2 par SLAP pourrait être dépendante de SRC

SLAP étant un régulateur négatif clé des voies de signalisation dépendantes des SFK, nous pouvons soupçonner leur implication dans l'activation de mTORC2. L'activité/la stabilité des complexes mTORC est régulée par de nombreuses phosphorylations de ces divers composants (mTOR, Rictor, Raptor et Sin1) sur sérine et thréonine. Mais on ne sait rien sur sa potentielle phosphorylation par les tyrosines kinases et notamment les SFK. En accord avec cette hypothèse, on observe que mTOR et Rictor co-immunoprécipitent avec plusieurs protéines phosphorylées sur Tyr dans les cellules HT29 et SW620. De manière intéressante, l'expression de SLAP diminue fortement la phosphorylation en Tyr de ces protéines **(Figure 12A)**. J'ai ensuite regardé si SRC était capable de médier la phosphorylation d'un ou plusieurs composants du complexe mTORC2. De manière intéressante, nos expériences de co-immunoprécipitation suggèrent que SRC interagit avec Rictor et que SRC phosphoryle directement différentes protéines interagissant avec Rictor **(Figure 12B)**. De plus, la surexpression de SRC semble augmenter légèrement l'association de SLAP avec Rictor alors que la surexpression de SLAP ne modifie pas l'association entre Rictor et SRC **(Figure 12C)**. Ces résultats restent à confirmer (dans des conditions de déprivation/restimulation notamment) mais suggèrent que l'activité/la stabilité du complexe mTORC2 peuvent être régulées via phosphorylation sur tyrosine par SRC et que l'interaction entre SLAP et mTORC2 peut être dépendante de cette phosphorylation par SRC.

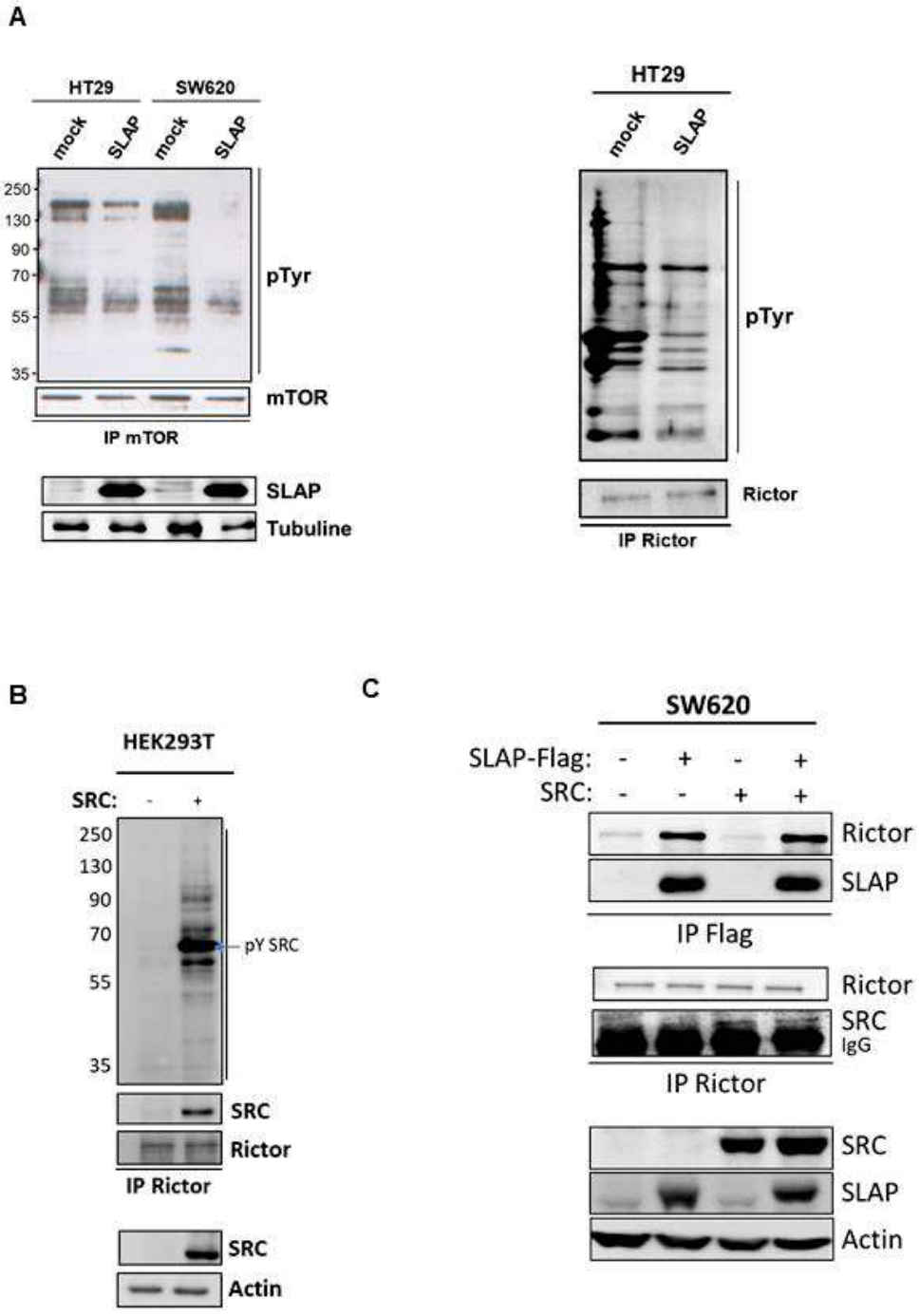


Figure 12 : SRC régule l'interaction SLAP-Rictor.
(A) SLAP diminue le profil global en phosphotyrosine des partenaires de mTOR/Rictor. mTOR et Rictor ont été immunoprécipités à partir de lysat de cellules HT29 et SW260 contrôles (mock) et surexprimant SLAP. Une analyse par Western-blot avec un anticorps anti-pTyr (4G10) a permis de révéler les partenaires de mTOR/Rictor phosphorylés sur tyrosine. **(B)** SRC interagit avec Rictor et induit la phosphorylation des protéines associées. Rictor a été immunoprécipité à partir des lysats de cellules HEK293T surexprimant ou non SRC puis une analyse par Western-blot avec un anticorps anti-pTyr (4G10) a permis de révéler les protéines associées à Rictor phosphorylées sur tyrosine. **(C)** SRC augmente l'interaction entre SLAP et mTORC2. Les lysats des cellules SW620 surexprimant SLAP-Flag ou SRC ou les deux ont été soumis à une immunoprécipitation (IP) anti-Flag ou anti-Rictor puis analysés par Western-blot en utilisant des anticorps spécifiques comme indiqué. Le niveau de SLAP, SRC et d'actine a également été analysé dans le lysat total.

3. Mécanisme d'inactivation de SLAP dans les CCR

L'étude précédente du laboratoire montre que l'expression de SLAP est perdue dans les CCR. Cependant, les mécanismes de cette inactivation de SLAP dans ces cellules ne sont pas connus. La perte d'expression de l'ARNm de SLAP suggère une inhibition transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle. J'ai donc regardé si cette répression de la transcription était due à un mécanisme épigénétique et notamment à l'hyperméthylation du promoteur de SLAP. Le traitement des cellules SW620 au 5-AZA (un inhibiteur de DNA méthyltransférase) pendant 48h et à deux concentrations différentes (5µM et 10µM) n'augmente pas l'expression du transcrit SLAP **(Figure 13A)**. Ce résultat suggère que la perte d'expression de SLAP n'est pas médiée par une hyperméthylation de son promoteur. En accord avec cette hypothèse, le traitement des cellules SW620 à la dexaméthasone (un glucocorticoïde connu pour induire l'expression de SLAP dans des mastocytes) induit de manière très significative la réexpression de SLAP **(Figure 13B)** (Hiragun, Peng, et Beaven 2006).



Figure 13 : La perte d'expression de SLAP dans les cellules de CCR n'est pas due à une hyperméthylation de son promoteur.
(A) Les cellules SW620 ont été traitées avec du DMSO (contrôle) ou avec un inhibiteur de DNA méthyltransferase, le 5-AZA, pendant 48h à 2 concentrations différentes (5µM et 10µM). L'expression relative de l'ARNm de SLAP a été mesurée par PCR quantitative. **(B)** Les cellules SW620 ont été traitées avec du DMSO (contrôle) ou avec de la dexaméthasone (100nM) pendant 18h. L'analyse par Western blot à partir de lysat cellulaire total montre le taux d'expression de SLAP dans les cellules SW620 traitées ou non à la dexaméthasone. Le taux de Tubuline est également montré.

Figures supplémentaires

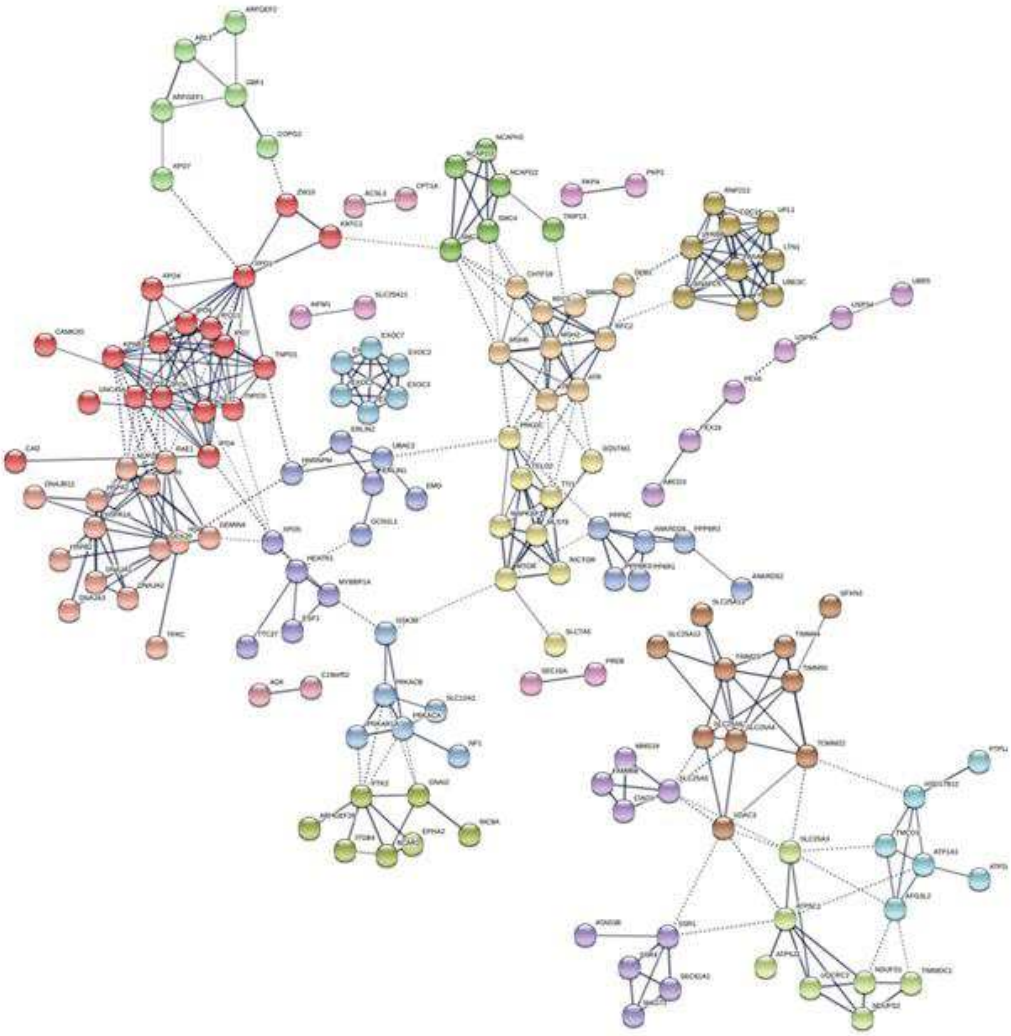


Figure supplémentaire 1 : Analyse bio-informatique de type STRING des interacteurs de SLAP identifiés avec un ratio H/L >3.

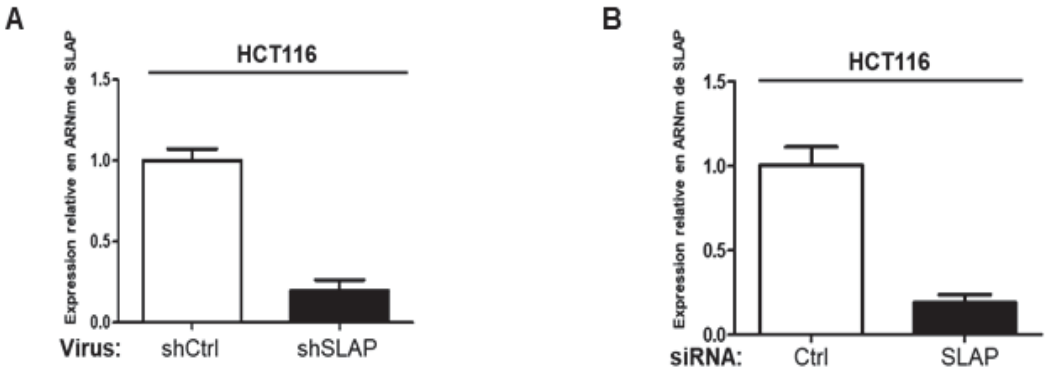


Figure supplémentaire 2 : Validation de la perte d'expression de SLAP dans la lignée HCT116. L'expression relative de l'ARNm SLAP a été mesurée par PCR quantitative dans les cellules HCT116 infectées avec des rétrovirus exprimant un shRNA spécifiquement dirigé contre SLAP (shSLAP) ou un shRNA contrôle (shCtrl) **(A)** ou transfectées avec un siRNA spécifiquement dirigé contre SLAP (siSLAP) ou un siRNA contrôle (siCtrl) (**B).**

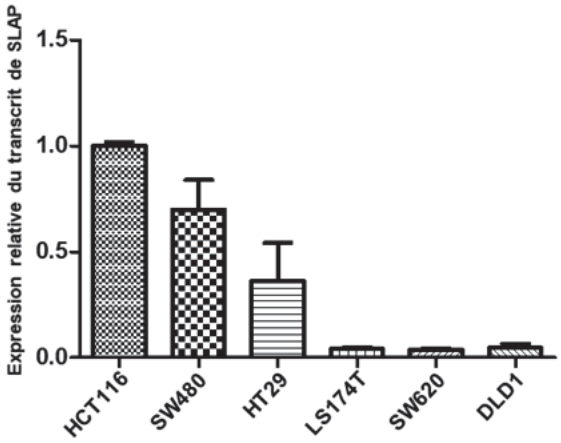


Figure Supplémentaire 3 : Expression de SLAP dans un panel de lignées de CCR.
L'expression relative de l'ARNm SLAP a été mesurée par PCR quantitative dans un panel de lignées cellulaires de CCR de différents stades.

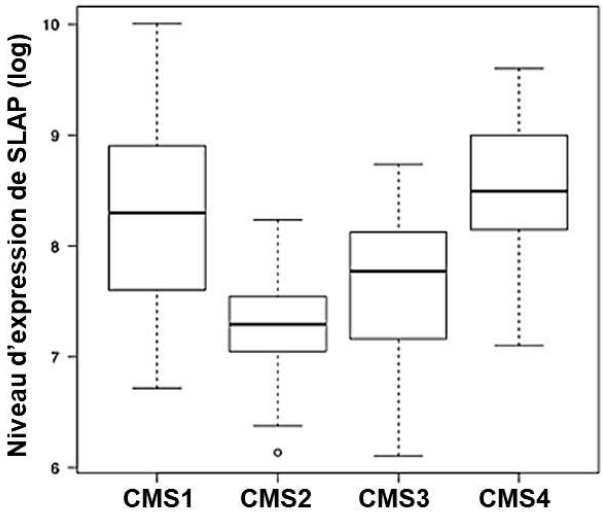


Figure supplémentaire 4 : Niveaux de transcrit SLAP en fonction du statut CMS dans une cohorte de CCR humains.
Analyse transcriptomique sur une cohorte de 143 échantillons de CCR humains de stade IV (Del Rio et al. 2017) présentant le niveau d'expression de l'ARNm SLAP en fonction du statut CMS.

Ratio H/L	Unique peptides	PEP	Description	Gene names
66,9	8	5.8625E-44	E3 UFM1-protein ligase 1	UFL1
9,2	14	2.7445E-91	E3 ubiquitin-protein ligase listerin	LTN1
8,2	17	4.7652E-57	E3 ubiquitin-protein ligase RNF213	RNF213
8,1	16	2.2723E-71	Ubiquitin-protein ligase E3C	UBE3C
5,5	32	6.1227E-217	E3 ubiquitin-protein ligase UBR5	UBR5
4,4	2	3.3376E-19	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM32	TRIM32
2,8	7	2.3722E-62	E3 ubiquitin/ISG15 ligase TRIM25	TRIM25
2,3	6	1.0264E-37	E3 ubiquitin-protein ligase MYCBP2	MYCBP2
2,0	2	1.0176E-05	E3 ubiquitin-protein ligase UBR4	UBR4

Tableau 1 : E3-ligases identifiées dans l'interactome SLAP.

Discussion et perspectives

Mon travail de thèse a permis d'une part, de confirmer la fonction anti-oncogénique de la protéine de signalisation SLAP et d'autre part, de mettre en évidence un nouveau mécanisme de dérégulation de l'activité oncogénique de mTORC2 dans les CCR. Il a permis de consolider l'importance des protéines adaptatrices dans la transformation cellulaire, qui peut définir un mécanisme général de contrôle de l'activité oncogénique des PK, et d'exposer une stratégie originale de stratification des patients susceptibles de bénéficier d'une thérapie ciblée.

1. La fonction anti-oncogénique de SLAP dans les CCR

Initialement, la protéine SLAP était connue pour être principalement exprimée dans le tissu hématopoïétique, où elle joue un rôle majeur dans la régulation de l'immunité. Mais dans une étude précédente, le laboratoire a montré que SLAP était également fortement exprimée dans le tissu épithélial intestinal (Naudin et al. 2014). J'ai ainsi montré un gradient d'expression de SLAP au niveau des cryptes intestinales avec un fort niveau du transcrit dans le compartiment différencié et un niveau plus faible à la base des cryptes au niveau du compartiment prolifératif. De manière surprenante, l'expression de SLAP est perdue dans plus de la moitié des CCR et cette inactivation est associée à l'activité cancéreuse des lignées cellulaires tumorales colorectales issues de patients.

Ces données nous conduisent à nous poser trois questions essentielles :

a) Quel est le rôle de SLAP dans l'épithélium colique ?

Le gradient d'expression de SLAP le long de l'axe crypte-villosité colique suggère que SLAP peut jouer un rôle important dans le contrôle de l'homéostasie intestinale

(Naudin et al. 2014). Cependant les premières analyses du KO total de SLAP chez la souris n'ont pas permis de rapporter de défauts notables dans le tractus digestif. Mais, étant donné la forte expression de SLAP dans le système hématopoïétique, sa fonction *in vivo* a principalement été étudiée dans les cellules immunitaires. Il est donc fort probable que les auteurs n'aient pas analysé l'impact de l'absence d'expression de SLAP dans ce tissu. En accord avec cette hypothèse, j'ai observé que le KO total de SLAP chez la souris induisait un épaississement de la paroi colique, associé à une augmentation du nombre de cellules à gobelets et du nombre de cellules prolifératives au niveau des cryptes coliques (résultats non montrés). Bien que moins exprimée à la base des cryptes, ces résultats suggèrent que SLAP peut être impliquée dans le potentiel prolifératif de l'épithélium intestinal. Je cherche maintenant à analyser la fonction de SLAP plus spécifiquement dans l'épithélium intestinal *in vivo*, *via* l'invalidation spécifique du gène *Slap* dans l'épithélium intestinal grâce à l'utilisation du modèle de souris *villin-Cre* inductibles par le tamoxifène développé par Sylvie Robine à l'Institut Curie, afin de s'affranchir de la composante immunitaire dans les effets biologiques observés dans les souris KO total *Slap*.

b) Quelle est la contribution de SLAP dans la carcinogenèse colorectale ?

J'ai obtenu plusieurs résultats soutenant fortement l'hypothèse d'une fonction anti-oncogénique de SLAP dans le CCR. Initialement, le gène *SLA* codant pour SLAP est issu de la duplication du gène SRC chez les vertébrés. De manière intéressante, l'expression de SLAP préférentiellement diminuée dans les tumeurs proliférantes SRC, Wnt/β-caténine de type CMS2, suggérant que la perte de SLAP dans ces tumeurs pourrait augmenter l'activité oncogénique de SRC et de la β-caténine **(Figure**

supplémentaire S4). L'augmentation du nombre et de la taille des adénomes dans les souris APCΔ14 suite à la déplétion de SLAP par injection d'un siRNA spécifique, corrobore ces observations et suggère donc l'implication de la perte d'expression de SLAP dans l'initiation tumorale (Naudin et al. 2014). Les tumeurs du type CMS2 étant généralement caractérisées par une faible infiltration immunitaire, nous pouvons également suggérer que la perte d'expression de SLAP dans ces tumeurs soit associée au compartiment épithélial transformé, bien que nous ne puissions pas exclure l'hypothèse que ce faible niveau de SLAP dans ces tumeurs soit la conséquence du faible nombre de cellules immunitaires.

La modulation de l'expression de SLAP dans les lignées cellulaires de CCR, nous a permis de mettre en lumière les fonctions anti-oncogéniques de cet adaptateur dans la progression tumorale. De manière remarquable, l'inhibition de son expression dans les cellules issues de CCR de stade précoce (ayant une expression endogène de SLAP importante) potentialise les capacités prolifératives et invasives de ces cellules *in vitro*. A l'inverse, la surexpression de SLAP dans les cellules de CCR de stade tumoral avancé (ayant une faible expression endogène de SLAP) inhibe fortement leurs propriétés cancéreuses, confirmant le rôle anti-oncogénique de SLAP dans les CCR. De manière intéressante, je montre que SLAP contrôle également l'activité souche cancéreuse à travers des expériences de formation de colosphères et de mesure d'activité ALDH, considéré comme un marqueur spécifique des CSC. Ainsi, la perte de SLAP dans le CCR pourrait également être un mécanisme important dans la promotion du phénotype CSC, qui joue un rôle clé dans le processus métastatique, la récidive et la résistance. Les mécanismes moléculaires par lesquels SLAP contrôle cette activité souche cancéreuse méritent d'être explorés plus en détails.

Au vu de toutes ces données, nous pouvons prédire que les tumeurs SLAP négatives soient de mauvais pronostic pour les patients. Il serait donc intéressant de rechercher une corrélation entre l'expression de SLAP au niveau de la tumeur et le devenir tumoral sur un large panel de biopsies de CCR. Cette question pourrait également être adressée à partir de modèles de souris génétiquement modifiés. En particulier, il serait intéressant d'analyser l'impact de l'inactivation de SLAP spécifiquement dans l'épithélium intestinal sur la formation de tumeurs expérimentales chez les souris, soit en utilisant (i) un protocole AOM/DSS pour induire une cancérogénèse colorectale qui est couramment utilisé pour récapituler la pathologie humaine, soit (ii) en croisant cette lignée avec des modèles génétiques de souris développant spontanément des cancers intestinaux (i.e. souris APCΔ14, modèle de KO inductible pour SMAD4, ou KI de KRAS V12 dans l'intestin). Enfin, il serait intéressant de savoir si cette fonction anti-oncogénique de SLAP peut se généraliser à d'autres cancers d'origine épithéliale ou circulante. En accord avec cette hypothèse, l'analyse de banques de données (Oncomine, www.oncomine.org) révèle également une diminution d'expression de SLAP dans les cancers du poumon, les leucémies myéloïdes aigües et les leucémies lymphoblastiques aigües de type B et de type T. Ces données suggèrent que SLAP pourrait également jouer un rôle anti-oncogénique dans ces cancers.

c) Quel est le mécanisme d'inactivation de SLAP dans les CCR ?

Les mécanismes d'inactivation de SLAP dans les cellules de CCR ne sont pas connus. Cinq analyses génomiques, réalisées récemment sur plus de 74 échantillons de CCR respectivement, ont révélé la présence de 8 mutations dans le gène *SLA* (soit environ 2% de mutation de *SLA* dans les tumeurs analysées) dont deux situées dans le domaine SH3 et deux autres dans le domaine SH2. Etant donné l'importance des

domaines SH3 et SH2 dans la fonction anti-oncogénique de SLAP, nous pouvons supposer qu'il s'agit de mutations inactivatrices. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant d'exprimer ces différents mutants dans les cellules HT29 et SW620 et d'analyser leurs effets sur la croissance et l'invasion cellulaire *in vitro*. Néanmoins, la faible occurrence de ces mutations suppose que l'inactivation de SLAP dans les CCR implique d'autres mécanismes. Notre étude précédente montre une perte d'expression de SLAP au niveau de l'ARNm dans plus de 50% des biopsies analysées, suggérant une inhibition au niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel. Notre première hypothèse était que cette perte d'expression du transcrit de SLAP puisse être due à un mécanisme épigénétique de type hyperméthylation de son promoteur. Cependant, l'utilisation d'un inhibiteur des DNA méthyltransférases dans des cellules SW620 ne permet pas de restaurer l'expression de SLAP, infirmant cette hypothèse. De manière intéressante j'ai observé que le traitement des cellules SW620 à la dexaméthasone induit de manière très significative la réexpression de SLAP. On peut donc proposer que toute drogue induisant la réexpression de SLAP puisse avoir un intérêt thérapeutique dans la pathologie du CCR. Une autre hypothèse pouvant expliquer cette perte d'expression est la dégradation du transcrit SLAP par un miRNA. Mais l'intervention d'un tel mécanisme pour la régulation de l'expression de SLAP n'est pas connu.

2. Régulation de la signalisation mTORC2 par SLAP dans les cellules de CCR

a) Les fonctions anti-oncogéniques de SLAP impliquent le ciblage de mTORC2

Les fonctions anti-oncogéniques de SLAP dans le CCR ont tout d'abord été identifiées comme impliquant le contrôle de la signalisation oncogénique de SRC via la dégradation du RTK d'adhésion EphA2 (Naudin et al. 2014). Néanmoins, ce mécanisme ne doit pas être le seul impliqué, notamment car la stabilisation d'EphA2 ne permet pas de restaurer la signalisation oncogénique AKT. Il est donc fort probable que SLAP affecte d'autres composants de la voie AKT, essentiels à l'agressivité de ces tumeurs. Ainsi mon travail de thèse a eu pour but d'identifier la nature de ces potentielles autres protéines de signalisation activatrices d'AKT régulées par SLAP. De manière intéressante, la caractérisation de l'interactome de SLAP dans les cellules de CCR nous a permis d'identifier un activateur d'AKT bien connu, le complexe mTORC2. Nos résultats montrent que SLAP régule négativement l'activité de mTORC2, et de ce fait la phosphorylation de son substrat AKT sur la Ser473 dans les différentes conditions testées (déprivation en facteurs de croissance, stimulation au sérum ou à l'insuline). Alors que le niveau de SLAP n'affecte pas la phosphorylation des substrats clés de mTORC1, à savoir S6K1 sur T389 et ULK1 sur S757. J'ai également démontré une interaction fonctionnelle entre SLAP et mTORC2, puisque la surexpression de son composant Rictor restaure les propriétés tumorales des cellules de CCR surexprimant SLAP. Inversement, les activités pro-oncogéniques dues à la perte d'expression de SLAP sont dépendantes de l'activité de mTORC2. Cette interaction fonctionnelle est spécifique de mTORC2 puisque la modulation de

l'expression de Raptor (et donc de l'activité mTORC1) n'a pas d'effet sur l'activité anti-oncogénique de SLAP. Ces observations démontrent donc que SLAP régule spécifiquement l'activité mTORC2 pour exercer, au moins en partie, sa fonction anti-oncogénique. Cette hypothèse est en accord avec la fonction importante de mTORC2 dans la croissance et l'invasion des cellules de CCR. De plus, l'étude de la fonction de SLAP dans la modulation des propriétés initiatrices de tumeurs *via* mTORC2 est très intéressante ; on sait entre autres que la voie PI3K (dans laquelle AKT est central) régule la survie des CSC (S. Chen et al. 2017; Malkomes et al. 2016; S.-R. Park et al. 2020).

b) Par quel mécanisme moléculaire SLAP régule mTORC2 ?

Une partie importante de mon travail de thèse s'est concentrée sur la recherche des mécanismes moléculaires associés à la régulation de mTORC2/AKT par SLAP. Mes résultats montrent que SLAP peut interagir avec divers composants de mTORC2 avec notamment une interaction entre SLAP et Rictor mais aucune interaction entre SLAP et Raptor. Telo2 et LST8 sont apparus comme des interacteurs importants de SLAP dans cette voie de signalisation SLAP/mTORC2/AKT. Une analyse de mutagenèse a permis d'identifier l'importance des domaines SH2 et SH3 de SLAP dans ce mécanisme. La nécessité de ces deux domaines, bien que surprenante de premier abord, peut être expliquée par la forte interdépendance de ces deux domaines. En effet, une analyse structurale par cristallographie réalisée par l'équipe du Dr Jane McGlade montre que toute mutation visant à déstabiliser un de ces deux domaines a pour conséquence la déstabilisation du second (Wybenga-Groot et McGlade 2013). Il serait intéressant d'analyser plus en détails les mécanismes moléculaires reliés à l'interaction SLAP/mTORC2, en particulier de rechercher l'implication d'une

phosphorylation sur résidu tyrosine et/ou d'une séquence riche en proline de liaison au domaine SH3.

Bien que mes expériences de biochimie suggèrent une interaction directe entre SLAP et ces composants de mTORC2, elles ne nous permettent pas de poser une conclusion définitive. Alors que Telo2 et LST8 sont essentiels pour la formation, la dynamique et l'activité des deux complexes mTORC1 et C2, mes résultats suggèrent que les fonctions anti-oncogéniques de SLAP impliquent une régulation spécifique de mTORC2 et non de mTORC1. Actuellement, les mécanismes associés à la spécificité de cette régulation de SLAP envers mTORC2/AKT sont inconnus. Mais une première hypothèse serait que SLAP cible spécifiquement LST8 et Telo2 au sein du complexe mTORC2. En accord avec cette hypothèse, une étude récente montre une régulation sélective de l'activité de mTORC1 par phosphorylation de Telo2/Tti1 liée à mTORC1 (Fernández-Sáiz et al. 2013). Une autre hypothèse expliquant la spécificité d'inhibition de mTORC2 par SLAP pourrait être reliée à la localisation de mTORC2 à la membrane plasmique. Comme je l'ai mentionné dans la partie bibliographique, l'activité mTORC2 serait globalement concentrée à la membrane plasmique, aux mitochondries ou encore aux vésicules endosomales alors que l'activité mTORC1 semble se concentrer à la surface des lysosomes. La localisation membranaire de SLAP *via* sa partie N-ter myristoylée pourrait ainsi expliquer, en partie, la régulation spécifique de mTORC2 par SLAP. Des approches orthogonales, telles qu'une approche de type LocaTOR2 assay -qui utilise le substrat mTORC2 AKT pour mesurer l'activité de phosphorylation de mTORC2 à des emplacements spécifiques subcellulaires (Ebner et al. 2017) - ou des approches d'imagerie pourraient permettre de répondre à cette question.

Par la suite, j'ai cherché à comprendre la relevance des interactions Telo2/LST8-SLAP sur l'activité anti-oncogénique de SLAP. J'ai démontré une interaction fonctionnelle entre SLAP et LST8 dans ces cellules tumorales mais pas avec Telo2.

- Mécanisme de poly-ubiquitination de type dégradation ?

Précédemment, le laboratoire a montré que la fonction anti-oncogénique de SLAP implique la dégradation par le protéasome d'un substrat oncogénique de SRC, le RTK EphA2 *via* son interaction avec l'E4-ubiquitine ligase UBE4A (Naudin et al. 2014). Ce mécanisme ressemble à celui découvert par l'équipe de Weiss dans la régulation du développement lymphocytaire qui implique la dégradation des substrats de Lck, dont ZAP70 et la chaîne ζ du TCR, et son interaction avec l'E3-ubiquitine ligase Cbl (Myers et al. 2006). Ces résultats suggèrent un mécanisme semblable de la régulation de mTORC2 par SLAP. En accord avec cette hypothèse, de récentes études montrent la régulation de la signalisation mTOR par ubiquitination. Notamment, mTORC2 peut être régulé *via* la dégradation ubiquitine-dépendante de mTOR et Rictor impliquant l'E3-ligase et le suppresseur de tumeur FBXW7 (Koo et al. 2015; Mao et al. 2008). Ainsi, une première hypothèse envisagée serait que SLAP inhibe mTORC2 *via* la dégradation des composants de mTORC2 et plus précisément de LST8 au sein du complexe mTORC2. Cependant dans notre étude, contrairement à EphA2, SLAP n'induit pas la dégradation des composants de mTORC2 (mTOR, Telo2, Tti1, Rictor, LST8 et Sin1). Ces résultats suggèrent donc un autre mécanisme de régulation de mTORC2 dans le CCR par SLAP.

- Mécanisme de poly-ubiquitination de type non dégradatif ?

Outre la poly-ubiquitination en Lysine K48 sur les composants de signalisation mTOR qui favorise la dégradation protéique par le protéasome, la poly-ubiquitination en Lysine K63 permet de réguler la dynamique du complexe mTOR mature/actif. En particulier, une étude récente montre que la poly-ubiquitination de LST8 sur lysine K63 sert de mécanisme majeur de contrôle de l'homéostasie du complexe mTOR (Bin Wang et al. 2017). Notamment dans des conditions de carence en facteur de croissance, l'E3-ubiquitine ligase TRAF2 permet la poly-ubiquitination K63 de LST8 sur les Lys305 et Lys313 et favorise la liaison LST8-Raptor pour générer la formation de mTORC1, tout en déstabilisant la liaison de Sin1 et *in fine* la formation de mTORC2. Au vu de ces données, nous avons émis l'hypothèse que SLAP pourrait réguler la dynamique du complexe mTORC2 mature par un mécanisme similaire. Nos premiers résultats suggèrent que SLAP est capable d'induire la poly-ubiquitination de LST8 dans les cellules HEK293T, bien que de manière modeste. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer cela. La première serait que SLAP ne soit pas un acteur majeur de l'ubiquitination de LST8. Cependant au vu du nombre conséquent d'E3 ligases retrouvées dans l'interactome de SLAP **(Tableau 1, p146)** et de ses fonctions biologiques déjà documentées, il est vraisemblable d'imaginer que l'ubiquitination des protéines est un processus global par lequel SLAP contrôle la signalisation cellulaire. Ainsi, une seconde hypothèse serait que l'E3 ligase impliquée dans ce processus soit exprimée faiblement dans les cellules HEK293T. Cette hypothèse est confortée par notre étude précédente où l'ubiquitination d'EPHA2 par SLAP n'était visible que lorsque l'E4-ligase UBE4A était surexprimée de manière concomitante. J'ai ensuite recherché l'impact de de SLAP sur la dynamique du complexe mTORC2.

J'ai montré que la stimulation des cellules tumorales par l'insuline permet le recrutement de LST8 au sein du complexe mTORC2 (i.e. l'association LST8-Rictor) de manière dépendante du temps de stimulation et que SLAP régule cette réponse moléculaire. De plus, j'ai remarqué que SLAP induit une forte baisse d'interaction entre LST8 et Rictor dans les cellules de CCR déprivées en sérum. Ces résultats suggèrent que SLAP déstabilise le complexe mTORC2 mature, *via* la dissociation de LST8, sans doute par un mécanisme dépendant de l'ubiquitine. J'ai donc ensuite cherché à identifier l'E3 ligase impliquée. J'ai d'abord testé l'implication d'UBE4A dans la poly-ubiquitination de LST8 par SLAP. Cependant, mes résultats excluent un rôle de ce facteur dans l'interaction entre SLAP et mTORC2 (résultats non montrés). Au vu des résultats de Bin Wang et *al.,* j'ai également recherché l'implication de TRAF2 bien qu'il ne soit pas retrouvé dans l'interactome de SLAP. Cependant, dans le contexte des cellules de CCR, TRAF2 ne semble pas jouer un rôle dans cette nouvelle fonction de SLAP. En effet, je n'ai pas détecté d'interaction entre SLAP et TRAF2 dans ces cellules. L'ensemble de ces résultats suggère donc l'implication d'une autre E3-ligase dans le mécanisme de régulation de mTORC2 par SLAP. Afin d'identifier ce régulateur, nous envisageons d'effectuer des tests d'ubiquitination en surexprimant, une à une, les principales E3-ligases retrouvées dans l'interactome **(Tableau 1)** de SLAP et d'analyser si la déplétion spécifique de ces différentes E3-ligases contrecarre la diminution de l'association LST8-Rictor induite par SLAP et les effets anti-oncogéniques de SLAP.

- Mécanisme pTyr-dépendant ?

Une troisième hypothèse envisagée est l'implication d'un mécanisme de régulation de mTORC2 dépendant de sa phosphorylation sur résidu Tyr. En effet, SLAP étant un

régulateur négatif des voies de signalisation dépendantes des SFK, nous soupçonnons leurs implications dans l'activation de mTORC2. L'analyse des banques de données (PhosphoSitePlus, www.phosphosite.org) révèle que certaines Tyr des composants de mTORC2 (mTOR, RIictor, Sin1 et LST8) sont des substrats potentiels de PTKs. En accord avec cette hypothèse, j'observe que mTOR/Rictor co-immunoprécipitent avec plusieurs protéines phosphorylées en Tyr et que cette phosphorylation est fortement diminuée par l'expression de SLAP. Nous proposons un modèle dans lequel SRC activerait mTORC2 par phosphorylation sur Tyr, inhibé ensuite par SLAP. Un des mécanismes impliqués pourrait être une compétition entre SRC et SLAP pour son interaction à mTORC2. Cependant, mes résultats suggèrent que SRC se lie à Rictor mais que cette liaison ne soit pas modifiée par l'expression de SLAP. Malgré ces résultats négatifs, nous envisageons d'identifier les sites de phosphorylation de mTORC2 SLAP-dépendants dans les cellules de CCR. Pour cela nous proposerons une approche de phosphoproteomique quantitative de mTORC2 dans des cellules de CCR surexprimant ou non du SLAP avec ou sans SRC. Cette analyse nous permettra de clarifier le mécanisme par lequel SLAP régule la voie de signalisation SRC-mTORC2 dans les cellules de CCR. Enfin mes premiers résultats montrant que la surpexpression de SRC entraine une légère augmentation de l'association SLAP-Rictor suggère que SRC puissent initier une boucle de rétrocontrôle négatif via la régulation de mTORC2 SLAP-dépendante.

c) Implication du RTK EphA2 dans la fonction oncogénique de mTORC2

Plusieurs rapports ont identifié EphA2 comme un substrat important d'AKT par phosphorylation sur son résidu S897 (Miao et al. 2009). En accord avec cette hypothèse, EphA2 a été montré comme une molécule effectrice importante d'AKT dans la progression tumorale. En particulier dans l'astrocytome humain, la phosphorylation de la S897 d'EphA2 est corrélée à l'activation d'AKT et avec le grade tumoral, ce qui suggère que le dialogue entre EphA2 et AKT puisse contribuer à la progression de ces tumeurs cérébrales (Miao et al. 2009). Compte tenu de l'interaction de SLAP avec la voie SRC/EphA2 d'une part, et la voie mTORC2/AKT/EpHA2 d'autre part, nous proposons que ces deux fonctions puissent en fait se situer sur une seule et même voie de signalisation cellulaire. Une autre hypothèse serait que la Tyr594 d'EphA2 phosphorylée par SRC permettrait le recrutement de mTORC2 à EphA2. Néanmoins, une première série d'expérience de co-immunoprécipitations ne montre pas d'interaction entre EphA2 et Rictor ce qui semble invalider cette hypothèse (résultats non montrés). Les mécanismes impliqués dans cette voie de signalisation SRC/mTORC2/AKT/EpHA2 méritent donc de plus amples investigations.

3. Implication thérapeutique

Enfin, mes résultats pourraient à terme aider au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques plus efficaces dans le CCR. En effet, ils suggèrent que le niveau d'expression de SLAP dicte la dépendance des cellules de CCR à l'activité mTORC2. En accord avec cette hypothèse, j'ai montré que les effets biologiques des inhibiteurs catalytiques de mTOR sont inversement corrélés avec le niveau

d'expression de SLAP dans les différentes lignées de CCR testées. De manière surprenante, je montre que les cellules exprimant SLAP sont non seulement résistantes à l'inhibiteur catalytique de mTOR, mais qu'en plus ce traitement favorise l'activité transformante de ces cellules. Ces observations suggèrent que les patients pourraient avoir une réponse antitumorale hétérogène à ce type d'inhibiteur en fonction du niveau d'expression de SLAP au niveau de la tumeur. Ainsi une stratification des patients atteints de CCR sur la base de leur statut SLAP pourrait permettre d'identifier les patients « répondeurs ». Les mutations oncogéniques de PI3K sont proposées comme des marqueurs de réponse aux inhibiteurs de la voie mTOR (Meric-Bernstam et al. 2012; Weigelt, Warne, et Downward 2011). Etant donné la forte proportion des mutations PI3KCA dans le CCR (25%), il serait intéressant d'analyser si la combinaison « statut mutationnel en PI3KCA », « statut mutationnel PTEN » et « taux d'expression de SLAP » pourrait prédire une réponse antitumorale à la combinaison inhibiteurs mTOR/PI3K. Nous pouvons néanmoins déjà remarquer que les cellules HCT116, ayant un niveau de SLAP endogène élevé et la mutation H1047R PI3KCA, sont fortement insensibles à l'inhibition catalytique de mTOR. En revanche, les cellules SW480, à fort niveau endogène de SLAP et au statut PI3KCA WT y répondent plus efficacement. Nous devons néanmoins confirmer la relevance de ces données en utilisant un plus large panel de lignées et de biopsies de CCR. Nous proposons également qu'une stratégie thérapeutique basée sur la réexpression de SLAP dans ce cancer aurait un bénéfice thérapeutique pour les patients. D'ailleurs, l'acide tout-trans rétinoïque, qui est utilisé pour le traitement des leucémies myéloïdes aigües, est connu pour augmenter l'expression de SLAP. Cependant, au vu des effets pléiotropes de cette molécule, il serait intéressant de développer une stratégie pharmacologique plus spécifique de réexpression de SLAP afin de réduire la progression des CCR.

Matériel et méthodes

Plasmides :

Les constructions pcDNA3 SLAP-Flag, SLAP SH3*(P73L)-Flag, SLAP SH2*(R111E)-Flag et SLAP SH3*SH2*-Flag proviennent du laboratoire d'A. Weiss (Université de Californie, San Francisco, USA). Les constructions pcDNA3 SLAP N32-Flag et SLAP G2A-Flag ont été décrites précédemment (G. Manes, Bello, et Roche 2000). SLAP-Flag et ses différents mutants ont été sous-clonés dans le vecteur rétroviral pMX-pS-CESAR. SRC a été sous-cloné dans le vecteur rétroviral pBABE. LST8 et Rictor-Flag ont été clonés dans le vecteur rétroviral pBABE. Le UBE4A humain provient de la banque ORFeome et a été cloné dans le vecteur pcDNA3. SLAP-HA et mTOR-Flag ont été clonés dans le vecteur pcDNA3. LST8-Flag, Sin1-Flag, Tti1-Flag, Telo2-Flag, Telo2-HA, PROTOR-Flag ont été clonés dans le vecteur pcDNA5. Raptor-Flag a été cloné dans le vecteur pLJM1. LST8-HA et Telo2 ont été clonés dans le vecteur pMX-IRES-dsred. SLAP N32 et SLAP N3*2 ont été sous-clonés dans le vecteur pGEX. Le vecteur pRBG4 Ubiquitin-myc-6His a été fourni par le laboratoire de J. Bertoglio (IGR, Université ParisXI, France). Les vecteurs pC57GP GAG-POL et pCSIG VSV-G ont été fournis par le laboratoire de M. Sitbon (IGMM, Montpellier, France).

Les différents shRNA ciblant les séquences spécifiques listées dans le tableau, ont été clonés dans les vecteurs rétroviraux pSiren-retroQ ou pRETRO-SUPER.neo.GFP selon les recommandations du fournisseur (Clontech).

shRNA	***Séquence***	***Vecteur***
shLuciférase	Clontech	pSiren-retroQ
shSLAP h	GACCTGGTGAACCACTATT	pSiren-retroQ
shCtrl	GACACTCGGTAGTCTATAC	pSUPER.retro.neo.GFP
shRictor h	ACTTGTGAAGAATCGTATC	pSUPER.retro.neo.GFP
shRaptor h	GGCTAGTCTGTTTCGAAATTT	pSUPER.retro.neo.GFP

Anticorps et réactifs :

Les anticorps suivants ont été utilisés : anti-SLAP C-19, anti-EphA2 C-20, anti-Tti1, anti-mTOR (Santa Cruz); anti-EphA2 (D4A2), anti-mTOR, anti-LST8, anti-Rictor, anti-Raptor, anti-S6K1, anti-pT389S6K1, anti-AKT, anti-pS473AKT (XP D9AE), anti-Rictor (53A2 et D16H9), anti-pS897EphA2 (D9A1), anti-NDRG1 (D8G9), anti-pT346 NDRG1, anti-ULK1, anti-pS555ULK1 (Cell Signaling Technology); anti-Sin1, anti-Rictor (A300-459A), anti-Rictor (A300-458A), anti-LST8 (A300-680A) (Bethyl Labs); anti-Flag, anti-Flag M2 agarose affinity gel, anti-Actine (Sigma Aldrich); anti-Telo2 (Protein Tech); anti-SRC cst1, anti-SRC 2.17 (S. Roche et al. 1995); anti-Ubiquitine (Zymed); anti-tubuline (don de N. Morin, CRBM, Montpellier, France); anti-pTyr 4G10 (don de P.Mangeat, CRBM, Montpellier, France); anti-rabbit IgG-HRP, anti-mouse IgG-HRP (GE Healthcare); anti-goat IgG-HRP (Dako).

Les inhibiteurs suivants ont été utilisés : MG132, 5-Azacytidine, Dexamethasone, cycloheximide (Sigma Aldrich); AKTi-1/2 (Calbiochem); Ku-0063794, Saracatinib (AZD0530), Temsirolimus (Selleckchem).

Culture cellulaire, transfections et infections rétrovirales :

Les lignées cellulaires (ATCC, Rockville, MD) ont été cultivées à 37°C dans une atmosphère humide à 5% de CO2 en milieu RPMI 1640 Glutamax pour les cellules LS174T et en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) Glutamax pour les cellules HT29, HCT116, SW480, SW620, Lovo, DLD1, HEK293T, DLD1 Telo2 Degron (Don de Dylane Detilleux, CRBM, Montpellier), HCT116 Telo2 Degron (Don de Dylane Detilleux, CRBM, Montpellier) supplémenté avec 10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF, Eurobio), 100U/mL de pénicilline et 100µg/ml de streptomycine.

Les transfections transitoires des cellules HEK293T, ensemencées dans des boîtes 100mm Ø à 40% de confluence, avec les constructions indiquées sur les figures, ont été réalisées en utilisant l'agent de transfection JetPEI (Polyplus-transfection) en suivant les recommandations du fournisseur et selon les proportions suivantes : 14µl de JetPEI pour 7µg d'ADN total. Après 5h d'incubation, le milieu a été changé et les cellules ont été lysées ou soumises à des tests fonctionnels 48h après la transfection.

Afin de produire les surnageants rétroviraux, les cellules HEK293T, ont été ensemencées dans des boîtes 100mm Ø à 50% de confluence et transfectées avec les quantités de plasmides suivantes : 3,5µg du vecteur d'intérêt, 1,22µg GAG-POL (pC57GP) et 1µg VSV-G (pCSIG) en utilisant l'agent de transfection JetPEI (Polyplus-transfection) selon le ratio 2:1 (JetPEI : ADN). 48h après la transfection, les cellules à infecter, préalablement ensemencées en boite de 60mm Ø, ont été traitées pendant 1h au polybrène (8µg/ml final en milieu de culture 10% SVF). Les surnageants rétroviraux produits en HEK293T ont été récupérés, filtrés sur filtres 0,45µm et déposés sur les cellules à infecter en présence de polybrène (8µg/ml final). Après 5h d'infection, le milieu des cellules a été changé. 48h après l'infection, les lignées cellulaires stables ont été obtenues par tri GFP au FACS (plateau MRI-IGMM, Montpellier) ou par sélection à la puromycine (1µg/ml). Toutes les cellules restantes après sélection ont été récupérées et amplifiées afin de constituer un pool de cellules.

Pour les expériences de privation en sérum, les cellules ont été lavées avec du PBS deux fois et cultivées dans du DMEM sans SVF pendant 48h. Pour les expériences de restimulation, de l'insuline à 100nM final (Invitrogen) ou du SVF à 10% final ont été ajoutés dans le milieu de culture pendant la période de temps indiquée.

Les siRNA (Dharmacon) dont les séquences sont listées dans le tableau ci-dessous ont été transfectés avec de la Lipofectamine RNAimax (Invitrogen). 200 000 cellules/puit ont été ensemencées dans des plaques 6 puits et transfectées avec les proportions suivantes : 9µl de Lipofectamine RNAimax pour 30pmol de siRNA dans 500µL de milieu OPTI-MEM 10% SVF. Après 5h de transfection, le milieu des cellules a été changé. Les cellules ont été lysées ou soumises à des tests fonctionnels 48h après la transfection.

siRNA	***Séquence***
simock	On target-Plus non-targeting siRNA#1 (Dharmacon)
siSLAPm1	GGGAAUAGCAUGAAAUCCA
siSLAPm2	AGAUUGGUAGCUUCAUGAU
siSLAPm3	AGAACUGUGUGUGUAUGUA
siSLAPm4	GAGCCAAACUACCUUUAUA
siLST8	UGACGGAGCUGAGCAUCAA
siRictor-1 h	On target-plus RICTOR siRNA 050002 (Dharmacon)
siRictor-2 h	On target-plus RICTOR siRNA 060002 (Dharmacon)
siRaptor-1 h	On target-plus RAPTOR siRNA 050002 (Dharmacon)
siRaptor-2 h	On target-plus RAPTOR siRNA 060002 (Dharmacon)

Extractions des ARN, RT-PCR et PCR quantitative :

Les ARN ont été extraits à l'aide du kit RNeasy Plus Mini Kit conformément aux recommandations du fabriquant (Invitrogen). La rétrotranscription a été réalisée à partir d'1µg d'ARN en utilisant la SuperScript VILO reverse transcriptase (Invitrogen) et le mix de réaction associé comprenant les « random primers », du MgCl2 et des dNTPs (Invitrogen). La PCR quantitative a été réalisée avec le mix SYBR green sur le LightCycler480 (Roche Diagnostics), selon les conditions d'amplification suivantes : 2 min à 95°C suivies de 10 sec à 95°C, 15 sec à 60°C et 25 sec à 72°C pendant 40 cycles. L'expression des transcrits a été normalisée par rapport au gène de ménage

GAPDH. Les oligonucléotides utilisés pour la PCR quantitative sont listés dans le tableau suivant :

Gène	***Amorce Sens***	***Amorce anti Sens***
GAPDH h	5'-TCTCCTCTGACTTCAACAGCGAC-3'	5'-CCCTGTTGCTGTAGCCAAATTC-3'
SLAP h	5'-CCGGAGGGACTGGATAGC-3'	5'-ACAGCCAGCCATGGTAAAC-3'
Rictor h	5'-GCTAGGTGCATTGACATACAACA-3'	5'-AGTGCTAGTTCACAGATAATGGC-3'
Raptor h	5'-ACTGGAACCTACCTTTGGCTT-3'	5'-ACTGTCTTCATCCGATCCTTC-3'
GAPDH m	5'-TGTGTCCGTCGTGCATCTGA-3'	5'-CCTGCTTCTCCACCTTCTTGA-3'
SLAP m	5’-ATGGGGAATAGCATGAAATCCAC-3’	5’-GGAGATGGGTAGTCAGTCAGC -3’
SLAP m2	5'-GCACTGGCCGGGAAAGTTAT-3'	5'-CAGCAGTTCCTCAGCCTTGTC-3'

<u>Immunoprécipitations et Western-blots</u> :

Les tampons de lyse CHAPS (Tris 40mM pH 7,5, NaCl 120mM, EDTA 1mM, CHAPS 0,3%), et le LB (Lysis buffer) Triton (Hepes 20mM pH 7,5, NaCl 150mM, Triton X-100 0,5%, β-octylglucoside 6mM) ont été supplémentés avec des inhibiteurs de protéases et des inhibiteurs de phosphatases (10µg/ml d'aprotinine, 20µM de leupeptine, 1mM de NaF, 1mM de DTT, 100µM d'orthovanadate de sodium). Pour les co-immunoprécipitations des complexes mTORC, les cellules ont été lysées sur glace en utilisant le tampon CHAPS pour préserver l'intégrité des complexes. Les lysats cellulaires ont été clarifiés par centrifugation pendant 10 min à 14 000 rpm à 4°C. La concentration des protéines a été déterminée en utilisant la méthode de Bradford (Coomassie Protein Assay Reagent, Thermo Scientific).

Pour les expériences d’immunoprécipitation, 1mg d'extrait protéique a été incubé en présence de 2µg d'anticorps d'intérêt pendant 4h à 4°C puis les complexes protéiques ont été récupérés par incubation avec des billes de sépharose couplées à des protéines A ou G (GE Healthcare) pendant 1h à 4°C ou de 25µl (50% slurry) de billes magnétiques anti-Flag (Sigma Aldrich) ou anti-HA (Pierce ThermoScientfic) pendant 4h à 4°C. L'immunoprécipitat a été lavé 4 fois dans du tampon de lavage composé de

20mM Tris pH 7,5, 150mM, 1% NP40, 1mM DTT, 100µM de sodium orthovanadate. Les billes ont été resuspendues dans du tampon Laemmli et les échantillons ont été dénaturés à 95°C pendant 5 min.

Les protéines issues de l'immunoprécipitation ainsi que les protéines totales ont été séparées sur gel SDS-PAGE et transférées sur membrane de PVDF (Transblot Turbo RTA transfert Kit, Biorad). Les membranes ont été incubées dans le tampon de blocage composé de TBS 1X, 1% BSA (Euromedex) et 0,1% Tween pendant 30 min à température ambiante puis incubées dans le même tampon contenant l'anticorps primaire (dilution 1 : 1000) indiqué toute la nuit à 4°C. Les membranes ont été lavées 3 fois dans du TBS 1X-Tween 0,1% et incubées dans le tampon de blocage contenant l'anticorps secondaire approprié conjugué à la péroxidase (dilution 1 : 4000) pendant 1h à température ambiante.

Après 3 lavages au TBS 1X-Tween 0,1%, le signal a été détecté avec le réactif ECL (ECL Prime, Sigma Aldrich). L'intensité relative des bandes a été quantifiée en utilisant ImageJ avec le niveau de protéine normalisé par rapport à la condition contrôle.

<u>Phosphokinase arrays</u> :

Le niveau de phosphorylation de 43 kinases a été déterminé en utilisant le kit Human Phospho-Kinase Array (ARY003B, R&D System) selon les instructions du fabricant. Brièvement, les membranes de nitrocellulose coatées avec les anticorps de capture pour les protéines d'intérêt et contrôles ont été incubées avec 400µg de lysat cellulaire pendant 16h à 4°C, lavées puis incubées pendant 1h à température ambiante avec un cocktail d'anticorps spécifiques des sites de phosphorylation d'intérêt biotinylés. Les membranes ont été ensuite incubées pendant 30 min avec de la streptavidine-HRP et

révélées par chimioluminescence à l'aide de films photographiques. L'intensité de phosphorylation des différentes kinases a été déterminée en utilisant le logiciel Image J avec le niveau de phosphorylation de protéines normalisé par rapport à la condition contrôle. Le signal du spot de référence a été utilisé comme contrôle de chargement.

Production des protéines recombinantes et GST-pulldowns :

L'expression des protéines de fusion GST-SLAP N32, GST-SLAP N3*2 dans les bactéries E. coli (souche BL21) a été induite par l'isopropyl β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) à 0,2mM à 25°C pendant 3h. Après centrifugation, le culot bactérien a été resuspendu dans une solution composée de 20mM Hepes, 120mM NaCl, 2 mM EDTA, 10 % glycérol, 10µg/ml aprotinine et 20µM leupeptine puis soniqué. Les extraits ont été clarifiés par centrifugation à 14 000 rpm. Les GST-SLAP N32 et GST-SLAP N3*2 ont été purifiées sur des billes de Glutathion Sepharose 4B pendant 30 min à température ambiante. Les pulldowns GST ont été ensuite réalisés avec 1µg de GST seul, GST-SLAP N32 ou GST-SLAP N3*2 qui ont été incubés avec 700µg de lysats surexprimant Telo2 ou LST8 à 4°C pendant 2h. Les complexes ont été lavés 3 fois avec du tampon de lyse, repris dans du tampon Laemmli et analysés par immunoblot.

Tests d'ubiquitination :

10^6 cellules HEK293T ensemencées en boîte 100mm Ø ont été transfectées avec les vecteurs indiqués sur les figures et avec le vecteur codant pour l'Ubiquitine tagguée histidine pendant 48h puis traitées avec l'inhibiteur du protéasome MG132 à 10µM pendant 4h. Les cellules ont été lysées dans 500µl de tampon guanidine-Hcl pH8 (6M

guanidine-Hcl, 100mM NA2HPO4/NaH2PO4, 10mM imidazole). Les extraits ont été soniqués puis centrifugés à 14 000 rpm pour éliminer les débris. Les protéines ubiquitinylées ont été purifiées avec 30µl de billes NinTA magnétiques (Promega) pendant 4h à température ambiante. Après un lavage en tampon de lyse, et deux lavages en tampon de lavage (25mM Tris-Hcl ph 6,8, 20mM Imidazole), les billes ont été éluées dans du tampon Laemmli et chauffées à 95°C pendant 5 min puis les extraits protéiques ont été analysés par Western-blot.

Interactomique en SILAC :

Dans cette étude, un double marquage métabolique de type SILAC a été réalisé sur les lysines (Lys) et les arginines (Arg). Les cellules ont été cultivées pendant deux semaines en milieu SILAC DMEM (sans Arg et sans Lys, Pierce) supplémenté de 10% de SVF dialysé (Invitrogen), L-glutamax (Invitrogen), d'Arg (0,084g/l) et de Lys (0,146g/l). Les cellules SW620 SLAP-Flag ont été cultivées dans un milieu « lourd » contenant de la L-Lys, 2HCL U-13C6 U-15N2 (EurisoTop) et la L-Arg, HCL U-13C6, U-15N4 (EurisoTop) alors que les cellules SW620 contrôles ont été cultivées dans un milieu « léger » contenant des AA naturels (Sigma Aldrich). Après extraction, 30mg de protéines totales par condition ont été mixés, incubés pendant 1h à 4°C avec des billes de protéine A agarose (Millipore) afin d'éliminer les interactions non spécifiques puis soumises à une immunoprécipitation sur billes anti-Flag M2 agarose (Sigma Aldrich) toute la nuit à 4°C. Après trois lavages, les complexes ont été élués dans du tampon Laemmli et chauffés à 95°C pendant 5 min. Les protéines ainsi immunoprécipitées ont été séparées sur gel SDS-PAGE 1D, digérées à la trypsine puis analysées par LC-MS/MS. Les analyses par spectrométrie de masse ont été réalisées par la plateforme

de protéomique de l'IGF de Montpellier sur un LTQ-Orbitrap (ThermoFisher).

Tests de croissance en agar-mou, de colosphères et d'invasion :

Pour la croissance cellulaire indépendante de l'adhésion, une couche d'agar dilué à 0,67% dans du milieu 10% SVF a été coulée au fond des puits de plaque 12 puits et une couche d'agar dilué à 0,33% dans du milieu 10% SVF contenant 2 000 cellules a été coulée au-dessus. 200µl de milieu DMEM 10% ont été ajoutés 1h après au-dessus de la couche supérieure d'agar. Les traitements indiqués dans les légendes des figures ont été effectués tous les 3 jours. Après 18-21 jours, les colonies d'une taille supérieure à ~50 cellules ont été quantifiées à l'aide du logiciel ImageJ.

Les tests d'invasion en chambre de Boyden (BD Biosciences) ont été réalisées avec 70 000 cellules ensemencées dans des inserts Fluoroblock (8µm, Corning) préalablement coatés avec 100µl de matrigel (Corning) dilué à 1mg/ml dans du milieu 0,5% SVF. Du milieu 10% SVF pour la chémoattraction a été ajouté dans le compartiment inférieur. Les traitements indiqués dans les légendes des figures ont été ajoutés à la fois dans le compartiment supérieur et dans le compartiment inférieur. Après 48h, les cellules ont été marquées à la calcéine AM (Sigma Aldrich) pendant 1h puis les cellules ayant passées à travers les pores membranaires ont été quantifiées à l'aide d'un microscope EVOS FL Cell Imaging System (ThermoFisher Scientific).

Les tests de formation de colosphères ont été réalisés en absence d'adhésion dans des plaques 96 puits ULA (Ultra low attachement, Corning) avec 100 cellules/puit dans 100µl de milieu DMEM Advanced F12 (Gibco, Life Technologies) supplémenté en N2, 3mM de glutamine, 100U/ml de pénicilline, 100µg/ml de streptomycine, 10ng/ml hBasic-FGF (R&D Systems) et 20ng/ml hEGF. Après 7 à 10 jours des photos des puits

ont été réalisées. Les sphères ont été comptées et quantifiées à l'aide du logiciel ImageJ.

Mesure de l'activité ALDH :

L'activité Aldéhyde Déshydrogénase (ALDH) des cellules a été déterminée à l'aide du kit ALDEFLUOR selon les indications du fournisseur (Stemcell). Brièvement, 10^6 cellules ont été resuspendues dans 500µl de tampon aldefluor contenant 2,5µl de substrat ALDH et incubé pendant 45 min à 37°C. Le DEAB, un inhibiteur spécifique des ALDH1A, a été utilisé comme contrôle afin de définir la population positive par cytométrie en flux (FACS Canto II, BD Bioscience).

Quantification et analyses statistiques :

Les images originales de Western blot ont été quantifiées à l'aide du logiciel ImageJ pour déterminer l'intensité des signaux. La majorité des expériences ont été répétées au moins trois fois de manière indépendante et les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le test de Student's t test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $P < 0,001$. Les barres d'erreur représentent S.E.M.

Bibliographie

Agrawal, Pooja et al. 2012. « Ubiquitin-Specific Peptidase 9, X-Linked (USP9X) Modulates Activity of Mammalian Target of Rapamycin (MTOR) ». *The Journal of Biological Chemistry* 287(25): 21164-75.

Ahmed, Z., B. J. Smith, et T. S. Pillay. 2000. « The APS Adapter Protein Couples the Insulin Receptor to the Phosphorylation of C-Cbl and Facilitates Ligand-Stimulated Ubiquitination of the Insulin Receptor ». *FEBS Letters* 475(1): 31-34.

Alqurashi, Naif, Vinod Gopalan, Robert A. Smith, et Alfred King Y. Lam. 2013. « Clinical Impacts of Mammalian Target of Rapamycin Expression in Human Colorectal Cancers ». *Human Pathology* 44(10): 2089-96.

Amin, Mahul B. et al. 2017. « The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to Build a Bridge from a Population-Based to a More "Personalized" Approach to Cancer Staging ». *CA: a cancer journal for clinicians* 67(2): 93-99.

Arcaroli, John J. et al. 2010. « Gene Array and Fluorescence in Situ Hybridization Biomarkers of Activity of Saracatinib (AZD0530), a Src Inhibitor, in a Preclinical Model of Colorectal Cancer ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 16(16): 4165-77.

Avizienyte, Egle et al. 2002. « Src-Induced de-Regulation of E-Cadherin in Colon Cancer Cells Requires Integrin Signalling ». *Nature Cell Biology* 4(8): 632-38.

Aylett, Christopher H. S. et al. 2016. « Architecture of Human MTOR Complex 1 ». *Science (New York, N.Y.)* 351(6268): 48-52.

Babon, Jeffrey J. et al. 2012. « Suppression of Cytokine Signaling by SOCS3: Characterization of the Mode of Inhibition and the Basis of Its Specificity ». *Immunity* 36(2): 239-50.

Baker, S. J. et al. 1990. « P53 Gene Mutations Occur in Combination with 17p Allelic Deletions as Late Events in Colorectal Tumorigenesis ». *Cancer Research* 50(23): 7717-22.

Baran, Burcin et al. 2018. « Difference Between Left-Sided and Right-Sided Colorectal Cancer: A Focused Review of Literature ». *Gastroenterology Research* 11(4): 264-73.

Barron, Lauren et al. 2017. « Intestinal Epithelial-Specific MTORC1 Activation Enhances Intestinal Adaptation After Small Bowel Resection ». *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 3(2): 231-44.

Bénistant, C. et al. 2000. « Deregulation of the Cytoplasmic Tyrosine Kinase CSrc in the Absence of a Truncating Mutation at Codon 531 in Human Bladder Carcinoma ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 273(2): 425-30.

———. 2001. « The COOH-Terminal Src Kinase Csk Is a Tumor Antigen in Human Carcinoma ». *Cancer Research* 61(4): 1415-20.

Ben-Sahra, Issam et al. 2016. « mTORC1 Induces Purine Synthesis Through Control of the Mitochondrial Tetrahydrofolate Cycle ». *Science (New York, N.Y.)* 351(6274): 728-33.

Ben-Sahra, Issam, Jessica J. Howell, John M. Asara, et Brendan D. Manning. 2013. « Stimulation of de Novo Pyrimidine Synthesis by Growth Signaling through MTOR and S6K1 ». *Science (New York, N.Y.)* 339(6125): 1323-28.

Bierer, B E et al. 1990. « Two distinct signal transmission pathways in T lymphocytes are inhibited by complexes formed between an immunophilin and either FK506 or rapamycin. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87(23): 9231-35.

Bjorge, J. D., A. Jakymiw, et D. J. Fujita. 2000. « Selected Glimpses into the Activation and Function of Src Kinase ». *Oncogene* 19(49): 5620-35.

Blaser, Benjamin et al. 2012. « Antitumor activities of ATP-competitive inhibitors of mTOR in colon cancer cells ». *BMC Cancer* 12: 86.

Blume-Jensen, P., et T. Hunter. 2001. « Oncogenic Kinase Signalling ». *Nature* 411(6835): 355-65.

Bolen, J. B. et al. 1987. « Analysis of Pp60c-Src in Human Colon Carcinoma and Normal Human Colon Mucosal Cells ». *Oncogene Research* 1(2): 149-68.

Bosman, Carneiro F, Hruban RH, et Theise ND. *WHO Classification of Tumours of the Digestive System*. https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Who-Classification-Of-Tumours/WHO-Classification-Of-Tumours-Of-The-Digestive-System-2010 (18 mars 2021).

Boyer, B., S. Roche, M. Denoyelle, et J. P. Thiery. 1997. « Src and Ras Are Involved in Separate Pathways in Epithelial Cell Scattering ». *The EMBO journal* 16(19): 5904-13.

Bromann, Paul A., Hasan Korkaya, et Sara A. Courtneidge. 2004. « The Interplay between Src Family Kinases and Receptor Tyrosine Kinases ». *Oncogene* 23(48): 7957-68.

Brown, E. J. et al. 1994. « A Mammalian Protein Targeted by G1-Arresting Rapamycin-Receptor Complex ». *Nature* 369(6483): 756-58.

Buday, László, et Péter Tompa. 2010. « Functional Classification of Scaffold Proteins and Related Molecules ». *The FEBS journal* 277(21): 4348-55.

Canel, Marta, Alan Serrels, Margaret C. Frame, et Valerie G. Brunton. 2013. « E-Cadherin-Integrin Crosstalk in Cancer Invasion and Metastasis ». *Journal of Cell Science* 126(Pt 2): 393-401.

Carethers, John M., et Barbara H. Jung. 2015. « Genetics and Genetic Biomarkers in Sporadic Colorectal Cancer ». *Gastroenterology* 149(5): 1177-1190.e3.

Carothers, Adelaide M. et al. 2006. « Deficient E-Cadherin Adhesion in C57BL/6J-Min/+ Mice Is Associated with Increased Tyrosine Kinase Activity and RhoA-Dependent Actomyosin Contractility ». *Experimental Cell Research* 312(4): 387-400.

Cartwright, C. A., A. I. Meisler, et W. Eckhart. 1990. « Activation of the Pp60c-Src Protein Kinase Is an Early Event in Colonic Carcinogenesis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87(2): 558-62.

Ceccarelli, Derek F. J., et Frank Sicheri. 2009. « Grb-Ing Hold of Insulin Signaling ». *Nature Structural & Molecular Biology* 16(8): 803-4.

Chakrabandhu, Krittalak et al. 2016. « An Evolution-Guided Analysis Reveals a Multi-Signaling Regulation of Fas by Tyrosine Phosphorylation and Its Implication in Human Cancers ». *PLoS biology* 14(3): e1002401.

Chen, Sugong et al. 2017. « Inhibition of PI3K/Akt/MTOR Signaling in PI3KR2-Overexpressing Colon Cancer Stem Cells Reduces Tumor Growth Due to Apoptosis ». *Oncotarget* 8(31): 50476-88.

Chen, Xianwen, Pauline H. Tan, Yanyan Zhang, et Dehua Pei. 2009. « On-Bead Screening of Combinatorial Libraries: Reduction of Nonspecific Binding by Decreasing Surface Ligand Density ». *Journal of Combinatorial Chemistry* 11(4): 604-11.

Chen, Yifan, et Xiaoping Zhou. 2020. « Research Progress of MTOR Inhibitors ». *European Journal of Medicinal Chemistry* 208: 112820.

Cheng, A. M. et al. 1998. « Mammalian Grb2 Regulates Multiple Steps in Embryonic Development and Malignant Transformation ». *Cell* 95(6): 793-803.

Clevers, Hans. 2013. « The Intestinal Crypt, a Prototype Stem Cell Compartment ». *Cell* 154(2): 274-84.

Clevers, Hans, et Roel Nusse. 2012. « Wnt/β-Catenin Signaling and Disease ». *Cell* 149(6): 1192-1205.

Cohen, P. 2001. « The Role of Protein Phosphorylation in Human Health and Disease. The Sir Hans Krebs Medal Lecture ». *European Journal of Biochemistry* 268(19): 5001-10.

Comella, Pasquale, Rossana Casaretti, Antonio Avallone, et Luca Franco. 2010. « Optimizing the Management of Metastatic Colorectal Cancer ». *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 75(1): 15-26.

Cordero, Julia B. et al. 2014. « C-Src Drives Intestinal Regeneration and Transformation ». *The EMBO journal* 33(13): 1474-91.

Cunningham, David et al. 2010. « Colorectal Cancer ». *The Lancet* 375(9719): 1030-47.

Cursi, Silvia et al. 2006. « Src Kinase Phosphorylates Caspase-8 on Tyr380: A Novel Mechanism of Apoptosis Suppression ». *The EMBO journal* 25(9): 1895-1905.

Daigo, Y. et al. 1999. « Absence of Genetic Alteration at Codon 531 of the Human C-Src Gene in 479 Advanced Colorectal Cancers from Japanese and Caucasian Patients ». *Cancer Research* 59(17): 4222-24.

Del Rio, M. et al. 2017. « Molecular Subtypes of Metastatic Colorectal Cancer Are Associated with Patient Response to Irinotecan-Based Therapies ». *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 76: 68-75.

Delgado, Maria Eugenia, Thomas Grabinger, et Thomas Brunner. 2016. « Cell Death at the Intestinal Epithelial Front Line ». *The FEBS journal* 283(14): 2701-19.

Demetriades, Constantinos, Nikolaos Doumpas, et Aurelio A. Teleman. 2014. « Regulation of TORC1 in Response to Amino Acid Starvation via Lysosomal Recruitment of TSC2 ». *Cell* 156(4): 786-99.

Dibble, Christian C. et al. 2012. « TBC1D7 Is a Third Subunit of the TSC1-TSC2 Complex Upstream of MTORC1 ». *Molecular Cell* 47(4): 535-46.

Dorrello, N. Valerio et al. 2006. « S6K1- and BetaTRCP-Mediated Degradation of PDCD4 Promotes Protein Translation and Cell Growth ». *Science (New York, N.Y.)* 314(5798): 467-71.

Dragone, Leonard L., Margaret D. Myers, Carmen White, Tomasz Sosinowski, et al. 2006. « SRC-like Adaptor Protein Regulates B Cell Development and Function ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 176(1): 335-45.

Dragone, Leonard L., Margaret D. Myers, Carmen White, Shyam Gadwal, et al. 2006. « Src-like Adaptor Protein (SLAP) Regulates B Cell Receptor Levels in a c-Cbl-Dependent Manner ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(48): 18202-7.

Düvel, Katrin et al. 2010. « Activation of a Metabolic Gene Regulatory Network Downstream of MTOR Complex 1 ». *Molecular Cell* 39(2): 171-83.

Ebner, Michael et al. 2017. « Localization of MTORC2 Activity inside Cells ». *The Journal of Cell Biology* 216(2): 343-53.

Eck, M. J., S. E. Shoelson, et S. C. Harrison. 1993. « Recognition of a High-Affinity Phosphotyrosyl Peptide by the Src Homology-2 Domain of P56lck ». *Nature* 362(6415): 87-91.

Ellis, L. M. et al. 1998. « Down-Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor in a Human Colon Carcinoma Cell Line Transfected with an Antisense Expression Vector Specific for c-Src ». *The Journal of Biological Chemistry* 273(2): 1052-57.

Endo, T. A. et al. 1997. « A New Protein Containing an SH2 Domain That Inhibits JAK Kinases ». *Nature* 387(6636): 921-24.

Fearon, E. R., et B. Vogelstein. 1990. « A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis ». *Cell* 61(5): 759-67.

Fearon, Eric R. 2011. « Molecular Genetics of Colorectal Cancer ». *Annual Review of Pathology* 6: 479-507.

Feng, Zhaohui et al. 2007. « The Regulation of AMPK Beta1, TSC2, and PTEN Expression by P53: Stress, Cell and Tissue Specificity, and the Role of These Gene Products in Modulating the IGF-1-AKT-MTOR Pathways ». *Cancer Research* 67(7): 3043-53.

Fernández-Sáiz, Vanesa et al. 2013. « SCFFbxo9 and CK2 Direct the Cellular Response to Growth Factor Withdrawal via Tel2/Tti1 Degradation and Promote Survival in Multiple Myeloma ». *Nature Cell Biology* 15(1): 72-81.

Fessler, Evelyn, et Jan Paul Medema. 2016. « Colorectal Cancer Subtypes: Developmental Origin and Microenvironmental Regulation ». *Trends in Cancer* 2(9): 505-18.

Francipane, Maria Giovanna, et Eric Lagasse. 2014. « MTOR Pathway in Colorectal Cancer: An Update ». *Oncotarget* 5(1): 49-66.

Frattini, M. et al. 2007. « PTEN Loss of Expression Predicts Cetuximab Efficacy in Metastatic Colorectal Cancer Patients ». *British Journal of Cancer* 97(8): 1139-45.

Frias, Maria A. et al. 2006. « MSin1 Is Necessary for Akt/PKB Phosphorylation, and Its Isoforms Define Three Distinct MTORC2s ». *Current biology: CB* 16(18): 1865-70.

FT, Bosman, Carneiro F, Hruban RH, et Theise ND. *WHO Classification of Tumours of the Digestive System*. https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Who-Classification-Of-Tumours/WHO-Classification-Of-Tumours-Of-The-Digestive-System-2010 (18 mars 2021).

Fu, Wenxiang, et Michael N. Hall. 2020. « Regulation of MTORC2 Signaling ». *Genes* 11(9): 1045.

Fujishita, Teruaki et al. 2008. « Inhibition of the MTORC1 Pathway Suppresses Intestinal Polyp Formation and Reduces Mortality in ApcΔ716 Mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(36): 13544-49.

Gan, Xiaoqing et al. 2012. « PRR5L Degradation Promotes MTORC2-Mediated PKC-δ Phosphorylation and Cell Migration Downstream of Gα12 ». *Nature Cell Biology* 14(7): 686-96.

Gan, Xiaoqing, Jiyong Wang, Bing Su, et Dianqing Wu. 2011. « Evidence for Direct Activation of MTORC2 Kinase Activity by Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate ». *The Journal of Biological Chemistry* 286(13): 10998-2.

García-Martínez, Juan M., et Dario R. Alessi. 2008. « MTOR Complex 2 (MTORC2) Controls Hydrophobic Motif Phosphorylation and Activation of Serum- and Glucocorticoid-Induced Protein Kinase 1 (SGK1) ». *The Biochemical Journal* 416(3): 375-85.

van der Geer, P., T. Hunter, et R. A. Lindberg. 1994. « Receptor Protein-Tyrosine Kinases and Their Signal Transduction Pathways ». *Annual Review of Cell Biology* 10: 251-337.

van de Geijn, Gert-Jan M., Judith Gits, et Ivo P. Touw. 2004. « Distinct Activities of Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS) Proteins and Involvement of the SOCS Box in Controlling G-CSF Signaling ». *Journal of Leukocyte Biology* 76(1): 237-44.

Gingras, A. C. et al. 1999. « Regulation of 4E-BP1 Phosphorylation: A Novel Two-Step Mechanism ». *Genes & Development* 13(11): 1422-37.

Giordanetto, Fabrizio, et Romano T. Kroemer. 2003. « A three-dimensional model of Suppressor Of Cytokine Signalling 1 (SOCS-1) ». *Protein Engineering, Design and Selection* 16(2): 115-24.

Gotoh, Noriko. 2009. « Feedback Inhibitors of the Epidermal Growth Factor Receptor Signaling Pathways ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41(3): 511-15.

Grabiner, Brian C. et al. 2014. « A Diverse Array of Cancer-Associated MTOR Mutations Are Hyperactivating and Can Predict Rapamycin Sensitivity ». *Cancer Discovery* 4(5): 554-63.

Greenman, Christopher et al. 2007. « Patterns of Somatic Mutation in Human Cancer Genomes ». *Nature* 446(7132): 153-58.

Guertin, David A. et al. 2006. « Ablation in Mice of the MTORC Components Raptor, Rictor, or MLST8 Reveals That MTORC2 Is Required for Signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but Not S6K1 ». *Developmental Cell* 11(6): 859-71.

Guinney, Justin et al. 2015. « The Consensus Molecular Subtypes of Colorectal Cancer ». *Nature Medicine* 21(11): 1350-56.

Gulhati, Pat et al. 2011. « MTORC1 and MTORC2 Regulate EMT, Motility, and Metastasis of Colorectal Cancer via RhoA and Rac1 Signaling Pathways ». *Cancer Research* 71(9): 3246-56.

Gwinn, Dana M. et al. 2008. « AMPK Phosphorylation of Raptor Mediates a Metabolic Checkpoint ». *Molecular Cell* 30(2): 214-26.

Haggar, Fatima A., et Robin P. Boushey. 2009. « Colorectal Cancer Epidemiology: Incidence, Mortality, Survival, and Risk Factors ». *Clinics in Colon and Rectal Surgery* 22(4): 191-97.

Haigis, Kevin M. et al. 2008. « Differential Effects of Oncogenic K-Ras and N-Ras on Proliferation, Differentiation and Tumor Progression in the Colon ». *Nature Genetics* 40(5): 600-608.

Hanks, S. K., A. M. Quinn, et T. Hunter. 1988. « The Protein Kinase Family: Conserved Features and Deduced Phylogeny of the Catalytic Domains ». *Science (New York, N.Y.)* 241(4861): 42-52.

Hannan, Katherine M. et al. 2003. « MTOR-Dependent Regulation of Ribosomal Gene Transcription Requires S6K1 and Is Mediated by Phosphorylation of the Carboxy-Terminal Activation Domain of the Nucleolar Transcription Factor UBF ». *Molecular and Cellular Biology* 23(23): 8862-77.

Harrington, Laura S. et al. 2004. « The TSC1-2 Tumor Suppressor Controls Insulin-PI3K Signaling via Regulation of IRS Proteins ». *The Journal of Cell Biology* 166(2): 213-23.

Harvey, Nathan T., et Andrew Ruszkiewicz. 2007. « Serrated Neoplasia of the Colorectum ». *World Journal of Gastroenterology* 13(28): 3792-98.

Harwood, Franklin C. et al. 2018. « ETV7 Is an Essential Component of a Rapamycin-Insensitive MTOR Complex in Cancer ». *Science Advances* 4(9): eaar3938.

Hikita, Tomoya et al. 2019. « Src in Endosomal Membranes Promotes Exosome Secretion and Tumor Progression ». *Scientific Reports* 9(1): 3265.

Hiragun, Takaaki, Ze Peng, et Michael A. Beaven. 2006. « Cutting Edge: Dexamethasone Negatively Regulates Syk in Mast Cells by up-Regulating SRC-like Adaptor Protein ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 177(4): 2047-50.

Holland, Sacha J. et al. 2001. « Functional Cloning of Src-like Adapter Protein-2 (SLAP-2), a Novel Inhibitor of Antigen Receptor Signaling ». *Journal of Experimental Medicine* 194(9): 1263-76.

Holt, Lowenna J., et Kenneth Siddle. 2005. « Grb10 and Grb14: Enigmatic Regulators of Insulin Action--and More? » *The Biochemical Journal* 388(Pt 2): 393-406.

Holz, Marina K., Bryan A. Ballif, Steven P. Gygi, et John Blenis. 2005. « MTOR and S6K1 Mediate Assembly of the Translation Preinitiation Complex through Dynamic Protein Interchange and Ordered Phosphorylation Events ». *Cell* 123(4): 569-80.

Hosokawa, Nao et al. 2009. « Nutrient-Dependent MTORC1 Association with the ULK1-Atg13-FIP200 Complex Required for Autophagy ». *Molecular Biology of the Cell* 20(7): 1981-91.

Hoxhaj, Gerta et al. 2019. « Direct Stimulation of NADP+ Synthesis through Akt-Mediated Phosphorylation of NAD Kinase ». *Science* 363(6431): 1088-92.

Humphrey, Sean J. et al. 2013. « Dynamic Adipocyte Phosphoproteome Reveals That Akt Directly Regulates MTORC2 ». *Cell Metabolism* 17(6): 1009-20.

Hunter, Tony, et Bartholomew M. Sefton. 1980. « Transforming Gene Product of Rous Sarcoma Virus Phosphorylates Tyrosine ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 77(3): 1311-15.

Hwang, Yoonha et al. 2019. « Disruption of the Scaffolding Function of MLST8 Selectively Inhibits MTORC2 Assembly and Function and Suppresses MTORC2-Dependent Tumor Growth In Vivo ». *Cancer Research* 79(13): 3178-84.

IJspeert, Joep E. G., Louis Vermeulen, Gerrit A. Meijer, et Evelien Dekker. 2015. « Serrated Neoplasia-Role in Colorectal Carcinogenesis and Clinical Implications ». *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* 12(7): 401-9.

Imada, Shinya et al. 2016. « Role of Src Family Kinases in Regulation of Intestinal Epithelial Homeostasis ». *Molecular and Cellular Biology* 36(22): 2811-23.

Imjeti, Naga Sailaja et al. 2017. « Syntenin Mediates SRC Function in Exosomal Cell-to-Cell Communication ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114(47): 12495-500.

INCA, 2019 « Le cancer colorectal - Les cancers les plus fréquents ». https://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Les-chiffres-du-cancer-en-France/Epidemiologie-des-cancers/Les-cancers-les-plus-frequents/Cancer-colorectal.

Inoki, Ken et al. 2002. « TSC2 Is Phosphorylated and Inhibited by Akt and Suppresses MTOR Signalling ». *Nature Cell Biology* 4(9): 648-57.

Inoki, Ken, Tianqing Zhu, et Kun-Liang Guan. 2003. « TSC2 Mediates Cellular Energy Response to Control Cell Growth and Survival ». *Cell* 115(5): 577-90.

Irby, R. B. et al. 1999. « Activating SRC Mutation in a Subset of Advanced Human Colon Cancers ». *Nature Genetics* 21(2): 187-90.

Isakoff, S. J. et al. 2014. « Bosutinib plus Capecitabine for Selected Advanced Solid Tumours: Results of a Phase 1 Dose-Escalation Study ». *British Journal of Cancer* 111(11): 2058-66.

Jacinto, Estela et al. 2004. « Mammalian TOR Complex 2 Controls the Actin Cytoskeleton and Is Rapamycin Insensitive ». *Nature Cell Biology* 6(11): 1122-28.

Jasperson, Kory W., Thérèse M. Tuohy, Deborah W. Neklason, et Randall W. Burt. 2010. « Hereditary and Familial Colon Cancer ». *Gastroenterology* 138(6): 2044-58.

Jass, J. R. 2007. « Classification of Colorectal Cancer Based on Correlation of Clinical, Morphological and Molecular Features ». *Histopathology* 50(1): 113-30.

Jiang, Yao et al. 2019. « Control of MTOR Signaling by Ubiquitin ». *Oncogene* 38(21): 3989-4001.

Jiang, Zhitao et al. 2019. « Celastrol Inhibits Colorectal Cancer through TGF-B1/Smad Signaling ». *OncoTargets and Therapy* 12: 509-18.

Jung, Barbara, Jonas J. Staudacher, et Daniel Beauchamp. 2017. « Transforming Growth Factor β Superfamily Signaling in Development of Colorectal Cancer ». *Gastroenterology* 152(1): 36-52.

Kakumoto, Kyoko et al. 2015. « mLST8 Promotes mTOR-Mediated Tumor Progression ». *PLoS ONE* 10(4). https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4408021/ (19 mars 2021).

Kanthan, Rani, Jenna-Lynn Senger, et Selliah Chandra Kanthan. 2012. « Molecular Events in Primary and Metastatic Colorectal Carcinoma: A Review ». *Pathology Research International* 2012: 597497.

Kazi, Julhash U. et al. 2014. « Src-like-Adaptor Protein (SLAP) Differentially Regulates Normal and Oncogenic c-Kit Signaling ». *Journal of Cell Science* 127(Pt 3): 653-62.

Kazi, Julhash U., Nuzhat N. Kabir, et Lars Rönnstrand. 2015. « Role of SRC-like Adaptor Protein (SLAP) in Immune and Malignant Cell Signaling ». *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 72(13): 2535-44.

Kazi, Julhash U., et Lars Rönnstrand. 2012. « Src-Like Adaptor Protein (SLAP) Binds to the Receptor Tyrosine Kinase Flt3 and Modulates Receptor Stability and Downstream Signaling ». *PloS One* 7(12): e53509.

Kazyken, Dubek et al. 2019. « AMPK Directly Activates MTORC2 to Promote Cell Survival during Acute Energetic Stress ». *Science Signaling* 12(585).

Keith, C. T., et S. L. Schreiber. 1995. « PIK-Related Kinases: DNA Repair, Recombination, and Cell Cycle Checkpoints ». *Science (New York, N.Y.)* 270(5233): 50-51.

Khanna, Ankita et al. 2016. « The Small GTPases Ras and Rap1 Bind to and Control TORC2 Activity ». *Scientific Reports* 6: 25823.

Kim, Hyun-Ju et al. 2010. « Src-like Adaptor Protein Regulates Osteoclast Generation and Survival ». *Journal of Cellular Biochemistry* 110(1): 201-9.

Kim, Lori C., Lanxi Song, et Eric B. Haura. 2009. « Src Kinases as Therapeutic Targets for Cancer ». *Nature Reviews. Clinical Oncology* 6(10): 587-95.

King, Nicole, et Sean B. Carroll. 2001. « A Receptor Tyrosine Kinase from Choanoflagellates: Molecular Insights into Early Animal Evolution ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(26): 15032-37.

Kmiecik, T. E., et D. Shalloway. 1987. « Activation and Suppression of Pp60c-Src Transforming Ability by Mutation of Its Primary Sites of Tyrosine Phosphorylation ». *Cell* 49(1): 65-73.

Kohlmaier, A. et al. 2015. « Src Kinase Function Controls Progenitor Cell Pools during Regeneration and Tumor Onset in the Drosophila Intestine ». *Oncogene* 34(18): 2371-84.

Koo, Junghui et al. 2015. « Rictor Undergoes Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3)-Dependent, FBXW7-Mediated Ubiquitination and Proteasomal Degradation ». *The Journal of Biological Chemistry* 290(22): 14120-29.

Kopetz, Scott et al. 2014. « Src Activity Is Modulated by Oxaliplatin and Correlates with Outcomes after Hepatectomy for Metastatic Colorectal Cancer ». *BMC cancer* 14: 660.

Kotani, Takenori et al. 2020. « Regulation of Colonic Epithelial Cell Homeostasis by MTORC1 ». *Scientific Reports* 10(1): 13810.

Kovalski, Joanna R. et al. 2019. « The Functional Proximal Proteome of Oncogenic Ras Includes MTORC2 ». *Molecular Cell* 73(4): 830-844.e12.

Kretzschmar, Kai, et Hans Clevers. 2017. « Wnt/β-Catenin Signaling in Adult Mammalian Epithelial Stem Cells ». *Developmental Biology* 428(2): 273-82.

Laghi, L. et al. 2001. « Lack of Mutation at Codon 531 of SRC in Advanced Colorectal Cancers from Italian Patients ». *British Journal of Cancer* 84(2): 196-98.

Lane, D. P. 1992. « Cancer. P53, Guardian of the Genome ». *Nature* 358(6381): 15-16.

Lebigot, Ingrid et al. 2003. « Up-Regulation of SLAP in FLI-1-Transformed Erythroblasts Interferes with EpoR Signaling ». *Blood* 102(13): 4555-62.

Lecomte T, André T, Bibeau F, Blanc B, Cohen R, Lagasse JP, Laurent-Puig P, Martin-Babau J, Panis Y, Portales F, Taïeb J, Vaillant E. « Cancer du côlon non métastatique » Thésaurus National de Cancérologie Digestive, Janvier 2019, [En ligne] [https://www.snfge.org/tncd et http://www.tncd.org

Leggett, Barbara, et Vicki Whitehall. 2010. « Role of the Serrated Pathway in Colorectal Cancer Pathogenesis ». *Gastroenterology* 138(6): 2088-2100.

Lengauer, C., K. W. Kinzler, et B. Vogelstein. 1997. « Genetic Instability in Colorectal Cancers ». *Nature* 386(6625): 623-27.

Leroy, Cédric et al. 2009. « Quantitative Phosphoproteomics Reveals a Cluster of Tyrosine Kinases That Mediates SRC Invasive Activity in Advanced Colon Carcinoma Cells ». *Cancer Research* 69(6): 2279-86.

Li, Hui et al. 2019. « Targeting the Oncogenic p53 Mutants in Colorectal Cancer and Other Solid Tumors ». *International Journal of Molecular Sciences* 20(23). https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6929124/ (19 mars 2021).

Li, Xin, et Tianyan Gao. 2014. « MTORC2 Phosphorylates Protein Kinase Cζ to Regulate Its Stability and Activity ». *EMBO reports* 15(2): 191-98.

Lièvre, Astrid et al. 2008. « KRAS Mutations as an Independent Prognostic Factor in Patients with Advanced Colorectal Cancer Treated with Cetuximab ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 26(3): 374-79.

Liontos, Larissa M. et al. 2011. « The Src-like Adaptor Protein Regulates GM-CSFR Signaling and Monocytic Dendritic Cell Maturation ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 186(4): 1923-33.

Liu, Bernard A., et Piers D. Nash. 2012. « Evolution of SH2 domains and phosphotyrosine signalling networks ». *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 367(1602): 2556-73.

Liu, Grace Y., et David M. Sabatini. 2020. « MTOR at the Nexus of Nutrition, Growth, Ageing and Disease ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 21(4): 183-203.

Liu, Pengda et al. 2013. « Sin1 Phosphorylation Impairs MTORC2 Complex Integrity and Inhibits Downstream Akt Signalling to Suppress Tumorigenesis ». *Nature Cell Biology* 15(11): 1340-50.

Loreto, Michael P., Donna M. Berry, et C. Jane McGlade. 2002. « Functional Cooperation between C-Cbl and Src-like Adaptor Protein 2 in the Negative Regulation of T-Cell Receptor Signaling ». *Molecular and Cellular Biology* 22(12): 4241-55.

Lynch, H. T., T. Smyrk, et J. F. Lynch. 1996. « Overview of Natural History, Pathology, Molecular Genetics and Management of HNPCC (Lynch Syndrome) ». *International Journal of Cancer* 69(1): 38-43.

Ma, Huanhuan et al. 2020. « C-Src Promotes Tumorigenesis and Tumor Progression by Activating PFKFB3 ». *Cell Reports* 30(12): 4235-4249.e6.

Malkomes, Patrizia et al. 2016. « Selective AKT Inhibition by MK-2206 Represses Colorectal Cancer-Initiating Stem Cells ». *Annals of Surgical Oncology* 23(9): 2849-57.

Manes, G., P. Bello, et S. Roche. 2000. « Slap Negatively Regulates Src Mitogenic Function but Does Not Revert Src-Induced Cell Morphology Changes ». *Molecular and Cellular Biology* 20(10): 3396-3406.

Manes, Gael A. et al. 2006. « A Potential Role for the Src-like Adapter Protein SLAP-2 in Signaling by the Colony Stimulating Factor-1 Receptor ». *The FEBS Journal* 273(8): 1791-1804.

Manning, G. et al. 2002. « The Protein Kinase Complement of the Human Genome ». *Science (New York, N.Y.)* 298(5600): 1912-34.

Mao, Jian-Hua et al. 2008. « FBXW7 Targets MTOR for Degradation and Cooperates with PTEN in Tumor Suppression ». *Science (New York, N.Y.)* 321(5895): 1499-1502.

Markowitz, Sanford D., et Monica M. Bertagnolli. 2009. « Molecular Origins of Cancer: Molecular Basis of Colorectal Cancer ». *The New England Journal of Medicine* 361(25): 2449-60.

Martellucci, Stefano et al. 2020. « Src Family Kinases as Therapeutic Targets in Advanced Solid Tumors: What We Have Learned so Far ». *Cancers* 12(6).

Martínez-Pérez, Julia et al. 2017. « Prognostic Relevance of Src Activation in Stage II-III Colon Cancer ». *Human Pathology* 67: 119-25.

Massagué, Joan. 2008. « TGFbeta in Cancer ». *Cell* 134(2): 215-30.

Matsumoto, Akira et al. 1997. « CIS, a Cytokine Inducible SH2 Protein, Is a Target of the JAK-STAT5 Pathway and Modulates STAT5 Activation ». *Blood* 89(9): 3148-54.

Mayer, B. J., M. Hamaguchi, et H. Hanafusa. 1988. « A Novel Viral Oncogene with Structural Similarity to Phospholipase C ». *Nature* 332(6161): 272-75.

Mayer, Christine, Jian Zhao, Xuejun Yuan, et Ingrid Grummt. 2004. « MTOR-Dependent Activation of the Transcription Factor TIF-IA Links RRNA Synthesis to Nutrient Availability ». *Genes & Development* 18(4): 423-34.

Meric-Bernstam, Funda et al. 2012. « PIK3CA/PTEN Mutations and Akt Activation As Markers of Sensitivity to Allosteric MTOR Inhibitors ». *Clinical Cancer Research* 18(6): 1777-89.

Miao, Hui et al. 2009. « EphA2 Mediates Ligand-Dependent Inhibition and Ligand-Independent Promotion of Cell Migration and Invasion via a Reciprocal Regulatory Loop with Akt ». *Cancer Cell* 16(1): 9-20.

Michels, Annemieke A. et al. 2010. « MTORC1 Directly Phosphorylates and Regulates Human MAF1 ». *Molecular and Cellular Biology* 30(15): 3749-57.

Morin, P. J. et al. 1997. « Activation of Beta-Catenin-Tcf Signaling in Colon Cancer by Mutations in Beta-Catenin or APC ». *Science (New York, N.Y.)* 275(5307): 1787-90.

Moroishi, Toshiro, Carsten Gram Hansen, et Kun-Liang Guan. 2015. « The Emerging Roles of YAP and TAZ in Cancer ». *Nature Reviews. Cancer* 15(2): 73-79.

Murphy, Maria A. et al. 1998. « Tissue Hyperplasia and Enhanced T-Cell Signalling via ZAP-70 in c-Cbl-Deficient Mice ». *Molecular and Cellular Biology* 18(8): 4872-82.

Murugan, Avaniyapuram Kannan. 2019. « MTOR: Role in Cancer, Metastasis and Drug Resistance ». *Seminars in Cancer Biology* 59: 92-111.

Myers, Margaret D. et al. 2006. « Src-like Adaptor Protein Regulates TCR Expression on Thymocytes by Linking the Ubiquitin Ligase c-Cbl to the TCR Complex ». *Nature Immunology* 7(1): 57-66.

Myers, Margaret D., Leonard L. Dragone, et Arthur Weiss. 2005. « Src-like Adaptor Protein down-Regulates T Cell Receptor (TCR)-CD3 Expression by Targeting TCRzeta for Degradation ». *The Journal of Cell Biology* 170(2): 285-94.

Naka, T. et al. 1997. « Structure and Function of a New STAT-Induced STAT Inhibitor ». *Nature* 387(6636): 924-29.

Nakayama, Yuji et al. 2017. « Cytokinesis Failure Leading to Chromosome Instability in V-Src-Induced Oncogenesis ». *International Journal of Molecular Sciences* 18(4).

Naramura, Mayumi, Hemanta K. Kole, Ren-Ju Hu, et Hua Gu. 1998. « Altered Thymic Positive Selection and Intracellular Signals in Cbl-Deficient Mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95(26): 15547-52.

Näthke, Inke S. 2004. « The Adenomatous Polyposis Coli Protein: The Achilles Heel of the Gut Epithelium ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 20: 337-66.

Naudin, Cécile et al. 2014. « SLAP Displays Tumour Suppressor Functions in Colorectal Cancer via Destabilization of the SRC Substrate EPHA2 ». *Nature Communications* 5: 3159.

Naudin, Cécile, Clément Chevalier, et Serge Roche. 2016. « The Role of Small Adaptor Proteins in the Control of Oncogenic Signalingr Driven by Tyrosine Kinases in Human Cancer ». *Oncotarget* 7(10): 11033-55.

Nilbert, M., et E. Fernebro. 2000. « Lack of Activating C-SRC Mutations at Codon 531 in Rectal Cancer ». *Cancer Genetics and Cytogenetics* 121(1): 94-95.

Noah, Taeko K., Bridgitte Donahue, et Noah F. Shroyer. 2011. « Intestinal Development and Differentiation ». *Experimental Cell Research* 317(19): 2702-10.

Nojima, Hiroki et al. 2003. « The Mammalian Target of Rapamycin (MTOR) Partner, Raptor, Binds the MTOR Substrates P70 S6 Kinase and 4E-BP1 through Their TOR Signaling (TOS) Motif ». *The Journal of Biological Chemistry* 278(18): 15461-64.

Novellasdemunt, Laura, Pedro Antas, et Vivian S. W. Li. 2015. « Targeting Wnt Signaling in Colorectal Cancer. A Review in the Theme: Cell Signaling: Proteins, Pathways and Mechanisms ». *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 309(8): C511-521.

Nusse, Roel. 2012. « Wnt Signaling ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4(5).

Oh, Won Jun et al. 2010. « MTORC2 Can Associate with Ribosomes to Promote Cotranslational Phosphorylation and Stability of Nascent Akt Polypeptide ». *The EMBO journal* 29(23): 3939-51.

Okada, Masato. 2012. « Regulation of the SRC Family Kinases by Csk ». *International Journal of Biological Sciences* 8(10): 1385-97.

Okuzaki, Daisuke et al. 2020. « C-Src Promotes Tumor Progression through Downregulation of MicroRNA-129-1-3p ». *Cancer Science* 111(2): 418-28.

Oneyama, Chitose et al. 2008. « The Lipid Raft-Anchored Adaptor Protein Cbp Controls the Oncogenic Potential of c-Src ». *Molecular Cell* 30(4): 426-36.

———. 2013. « MiR-424/503-Mediated Rictor Upregulation Promotes Tumor Progression ». *PloS One* 8(11): e80300.

Oskarsson, Thordur, Eduard Batlle, et Joan Massagué. 2014. « Metastatic Stem Cells: Sources, Niches, and Vital Pathways ». *Cell Stem Cell* 14(3): 306-21.

Pakuts, Benjamin et al. 2007. « The Src-like Adaptor Protein 2 Regulates Colony-Stimulating Factor-1 Receptor Signaling and down-Regulation ». *The Journal of Biological Chemistry* 282(25): 17953-63.

Palmer, Amparo et al. 2002. « EphrinB Phosphorylation and Reverse Signaling: Regulation by Src Kinases and PTP-BL Phosphatase ». *Molecular Cell* 9(4): 725-37.

Pandey, A., H. Duan, et V. M. Dixit. 1995. « Characterization of a Novel Src-like Adapter Protein That Associates with the Eck Receptor Tyrosine Kinase ». *The Journal of Biological Chemistry* 270(33): 19201-4.

Pandey, Akhilesh et al. 2002. « A Novel Src Homology 2 Domain-Containing Molecule, Src-like Adapter Protein-2 (SLAP-2), Which Negatively Regulates T Cell Receptor Signaling * ». *Journal of Biological Chemistry* 277(21): 19131-38.

Papailiou, Joanna, Konstaninos J. Bramis, Maria Gazouli, et George Theodoropoulos. 2011. « Stem Cells in Colon Cancer. A New Era in Cancer Theory Begins ». *International Journal of Colorectal Disease* 26(1): 1-11.

Park, Se-Ra, Soo-Rim Kim, In-Sun Hong, et Hwa-Yong Lee. 2020. « A Novel Therapeutic Approach for Colorectal Cancer Stem Cells: Blocking the PI3K/Akt Signaling Axis With Caffeic Acid ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8: 585987.

Park, Seung-Kiel, et Michael A. Beaven. 2009. « Mechanism of Upregulation of the Inhibitory Regulator, Src-like Adaptor Protein (SLAP), by Glucocorticoids in Mast Cells ». *Molecular Immunology* 46(3): 492-97.

Park, Seung-Kiel, Huihong Qiao, et Michael A. Beaven. 2009. « Src-like Adaptor Protein (SLAP) Is Upregulated in Antigen-Stimulated Mast Cells and Acts as a Negative Regulator ». *Molecular Immunology* 46(10): 2133-39.

Pearce, Laura R. et al. 2007. « Identification of Protor as a Novel Rictor-Binding Component of MTOR Complex-2 ». *The Biochemical Journal* 405(3): 513-22.

Peifer, M. et al. 1992. « The Vertebrate Adhesive Junction Proteins Beta-Catenin and Plakoglobin and the Drosophila Segment Polarity Gene Armadillo Form a Multigene Family with Similar Properties ». *The Journal of Cell Biology* 118(3): 681-91.

Peters, Ulrike, Stephanie Bien, et Niha Zubair. 2015. « Genetic Architecture of Colorectal Cancer ». *Gut* 64(10): 1623-36.

Peterson, Timothy R. et al. 2011. « MTOR Complex 1 Regulates Lipin 1 Localization to Control the SREBP Pathway ». *Cell* 146(3): 408-20.

Phelip JM, Bouché O, Conroy T, Michel P, Penna C, Tournigand C, Louvet C, Bedenne L. "Cancer colorectal métastatique". « tncd_chap-4-ccrm_2014-02-18.pdf ». https://www.snfge.org/sites/default/files/recommandations/tncd_chap-4-ccrm_2014-02-18.pdf (18 mars 2021).

Pino, Maria S., et Daniel C. Chung. 2010. « The Chromosomal Instability Pathway in Colon Cancer ». *Gastroenterology* 138(6): 2059-72.

Pretlow, T. P., M. A. O'Riordan, T. G. Pretlow, et T. A. Stellato. 1992. « Aberrant Crypts in Human Colonic Mucosa: Putative Preneoplastic Lesions ». *Journal of Cellular Biochemistry. Supplement* 16G: 55-62.

Quan, Zhenghui, Pei Sun, Guonan Lin, et Rongwen Xi. 2013. « TSC1/2 Regulates Intestinal Stem Cell Maintenance and Lineage Differentiation through Rheb-TORC1-S6K but Independently of Nutritional Status or Notch Regulation ». *Journal of Cell Science* 126(Pt 17): 3884-92.

Reddy, S. M. et al. 2015. « Phase II Study of Saracatinib (AZD0530) in Patients with Previously Treated Metastatic Colorectal Cancer ». *Investigational New Drugs* 33(4): 977-84.

Resh, Marilyn D. 1999. « Fatty Acylation of Proteins: New Insights into Membrane Targeting of Myristoylated and Palmitoylated Proteins ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1451(1): 1-16.

Richardson, A., R. K. Malik, J. D. Hildebrand, et J. T. Parsons. 1997. « Inhibition of Cell Spreading by Expression of the C-Terminal Domain of Focal Adhesion Kinase (FAK) Is Rescued by Coexpression of Src or Catalytically Inactive FAK: A Role for Paxillin Tyrosine Phosphorylation ». *Molecular and Cellular Biology* 17(12): 6906-14.

Roche, S. et al. 1995. « DNA Synthesis Induced by Some but Not All Growth Factors Requires Src Family Protein Tyrosine Kinases ». *Molecular and Cellular Biology* 15(2): 1102-9.

Roche, Serge et al. 1998. « Src-like Adaptor Protein (Slap) Is a Negative Regulator of Mitogenesis ». *Current Biology* 8(17): 975-78.

Rogala, Kacper B. et al. 2019. « Structural Basis for the Docking of MTORC1 on the Lysosomal Surface ». *Science (New York, N.Y.)* 366(6464): 468-75.

Roper, Jatin et al. 2011. « The Dual PI3K/mTOR Inhibitor NVP-BEZ235 Induces Tumor Regression in a Genetically Engineered Mouse Model of PIK3CA Wild-Type Colorectal Cancer ». *PLoS ONE* 6(9). https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3180374/ (19 mars 2021).

Rosenbluh, Joseph et al. 2012. « β-Catenin-Driven Cancers Require a YAP1 Transcriptional Complex for Survival and Tumorigenesis ». *Cell* 151(7): 1457-73.

Rosty, Christophe et al. 2013. « Serrated Polyps of the Large Intestine: Current Understanding of Diagnosis, Pathogenesis, and Clinical Management ». *Journal of Gastroenterology* 48(3): 287-302.

Rubinfeld, B. et al. 1995. « The APC Protein and E-Cadherin Form Similar but Independent Complexes with Alpha-Catenin, Beta-Catenin, and Plakoglobin ». *The Journal of Biological Chemistry* 270(10): 5549-55.

Sabatini, D. M. et al. 1994. « RAFT1: A Mammalian Protein That Binds to FKBP12 in a Rapamycin-Dependent Fashion and Is Homologous to Yeast TORs ». *Cell* 78(1): 35-43.

Sabers, C. J. et al. 1995. « Isolation of a Protein Target of the FKBP12-Rapamycin Complex in Mammalian Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 270(2): 815-22.

Salahshor, S., et J. R. Woodgett. 2005. « The Links between Axin and Carcinogenesis ». *Journal of Clinical Pathology* 58(3): 225-36.

Sampson, Leesa L., Ashley K. Davis, Matthew W. Grogg, et Yi Zheng. 2016. « MTOR Disruption Causes Intestinal Epithelial Cell Defects and Intestinal Atrophy Postinjury in Mice ». *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 30(3): 1263-75.

Samuels, Yardena et al. 2004. « High Frequency of Mutations of the PIK3CA Gene in Human Cancers ». *Science (New York, N.Y.)* 304(5670): 554.

Sancier, Florence et al. 2011. « Specific Oncogenic Activity of the Src-Family Tyrosine Kinase c-Yes in Colon Carcinoma Cells ». *PloS One* 6(2): e17237.

Sarbassov, D. D. et al. 2004. « Rictor, a Novel Binding Partner of MTOR, Defines a Rapamycin-Insensitive and Raptor-Independent Pathway That Regulates the Cytoskeleton ». *Current biology: CB* 14(14): 1296-1302.

Sarbassov, D. D., David A. Guertin, Siraj M. Ali, et David M. Sabatini. 2005. « Phosphorylation and Regulation of Akt/PKB by the Rictor-MTOR Complex ». *Science (New York, N.Y.)* 307(5712): 1098-1101.

Sarbassov, Dos D. et al. 2006. « Prolonged Rapamycin Treatment Inhibits MTORC2 Assembly and Akt/PKB ». *Molecular Cell* 22(2): 159-68.

Sarma, Deba P. 1986. « The Dukes Classification of Colorectal Cancer ». *JAMA* 256(11): 1447-1447.

Sasaki, A. et al. 1999. « Cytokine-Inducible SH2 Protein-3 (CIS3/SOCS3) Inhibits Janus Tyrosine Kinase by Binding through the N-Terminal Kinase Inhibitory Region as Well as SH2 Domain ». *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* 4(6): 339-51.

Sasikumar, Roschen, John Raji Rejitha, Ponthananiyil Kumaran Binumon, et Muraleedharan Manoj. 2011. « Role of Heterozygous APC Mutation in Niche Succession and Initiation of Colorectal Cancer – A Computational Study ». *PLOS ONE* 6(8): e22720.

Schneikert, Jean, et Jürgen Behrens. 2007. « The Canonical Wnt Signalling Pathway and Its APC Partner in Colon Cancer Development ». *Gut* 56(3): 417-25.

Schuster, Norbert, et Kerstin Krieglstein. 2002. « Mechanisms of TGF-Beta-Mediated Apoptosis ». *Cell and Tissue Research* 307(1): 1-14.

Setiawan, Jajar et al. 2019. « Regulation of Small Intestinal Epithelial Homeostasis by Tsc2-MTORC1 Signaling ». *The Kobe Journal of Medical Sciences* 64(6): E200-209.

Sicheri, F., I. Moarefi, et J. Kuriyan. 1997. « Crystal Structure of the Src Family Tyrosine Kinase Hck ». *Nature* 385(6617): 602-9.

Simons, Michael, Emma Gordon, et Lena Claesson-Welsh. 2016. « Mechanisms and Regulation of Endothelial VEGF Receptor Signalling ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 17(10): 611-25.

Sirvent, A. et al. 2008. « The Src-like Adaptor Protein Regulates PDGF-Induced Actin Dorsal Ruffles in a c-Cbl-Dependent Manner ». *Oncogene* 27(24): 3494-3500.

———. 2010. « Src Family Tyrosine Kinases-Driven Colon Cancer Cell Invasion Is Induced by Csk Membrane Delocalization ». *Oncogene* 29(9): 1303-15.

Sirvent, Audrey et al. 2020. « Src Family Tyrosine Kinases in Intestinal Homeostasis, Regeneration and Tumorigenesis ». *Cancers* 12(8).

Sirvent, Audrey, Christine Benistant, et Serge Roche. 2012. « Oncogenic Signaling by Tyrosine Kinases of the SRC Family in Advanced Colorectal Cancer ». *American Journal of Cancer Research* 2(4): 357-71.

Sirvent, Audrey, Serge Urbach, et Serge Roche. 2015. « Contribution of Phosphoproteomics in Understanding SRC Signaling in Normal and Tumor Cells ». *Proteomics* 15(2-3): 232-44.

Smithson, Laura J., et David H. Gutmann. 2016. « Proteomic Analysis Reveals GIT1 as a Novel MTOR Complex Component Critical for Mediating Astrocyte Survival ». *Genes & Development* 30(12): 1383-88.

Songyang, Z. et al. 1993. « SH2 Domains Recognize Specific Phosphopeptide Sequences ». *Cell* 72(5): 767-78.

Songyang, Zhou, et Lewis C. Cantley. 1995. « Recognition and Specificity in Protein Tyrosine Kinase-Mediated Signalling ». *Trends in Biochemical Sciences* 20(11): 470-75.

Sosinowski, T., N. Killeen, et A. Weiss. 2001. « The Src-like Adaptor Protein Downregulates the T Cell Receptor on CD4+CD8+ Thymocytes and Regulates Positive Selection ». *Immunity* 15(3): 457-66.

Sosinowski, Tomasz, Akhilesh Pandey, Vishva M. Dixit, et Arthur Weiss. 2000. « Src-like Adaptor Protein (Slap) Is a Negative Regulator of T Cell Receptor Signaling ». *Journal of Experimental Medicine* 191(3): 463-74.

Spano, J. P. et al. 2005. « Epidermal Growth Factor Receptor Signaling in Colorectal Cancer: Preclinical Data and Therapeutic Perspectives ». *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 16(2): 189-94.

Stamos, Jennifer L., et William I. Weis. 2013. « The β-Catenin Destruction Complex ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5(1): a007898.

Stryker, S. J., J. A. Carney, et R. R. Dozois. 1987. « Multiple Adenomatous Polyps Arising in a Continent Reservoir Ileostomy ». *International Journal of Colorectal Disease* 2(1): 43-45.

Stuttfeld, Edward et al. 2018. « Architecture of the Human MTORC2 Core Complex ». *eLife* 7.

Suetsugu, Shiro, Daisuke Yamazaki, Shusaku Kurisu, et Tadaomi Takenawa. 2003. « Differential Roles of WAVE1 and WAVE2 in Dorsal and Peripheral Ruffle Formation for Fibroblast Cell Migration ». *Developmental Cell* 5(4): 595-609.

Sugihara, Sayaka et al. 2010. « Roles of Src-like Adaptor Protein 2 (SLAP-2) in GPVI-Mediated Platelet Activation SLAP-2 and GPVI Signaling ». *Thrombosis Research* 126(4): e276-285.

Summy, Justin M., et Gary E. Gallick. 2003. « Src Family Kinases in Tumor Progression and Metastasis ». *Cancer Metastasis Reviews* 22(4): 337-58.

Swaminathan, G., E. A. Feshchenko, et A. Y. Tsygankov. 2007. « C-Cbl-Facilitated Cytoskeletal Effects in v-Abl-Transformed Fibroblasts Are Regulated by Membrane Association of c-Cbl ». *Oncogene* 26(28): 4095-4105.

Takane, Kiyoko et al. 2017. « DNA Methylation Epigenotype and Clinical Features of NRAS-Mutation(+) Colorectal Cancer ». *Cancer Medicine* 6(5): 1023-35.

Tang, J., S. Sawasdikosol, J. H. Chang, et S. J. Burakoff. 1999. « SLAP, a Dimeric Adapter Protein, Plays a Functional Role in T Cell Receptor Signaling ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(17): 9775-80.

Tee, Andrew R et al. 2003. « Tuberous Sclerosis Complex Gene Products, Tuberin and Hamartin, Control MTOR Signaling by Acting as a GTPase-Activating Protein Complex toward Rheb ». *Current Biology* 13(15): 1259-68.

Thiel, Alexandra, et Ari Ristimäki. 2013. « Toward a Molecular Classification of Colorectal Cancer: The Role of BRAF ». *Frontiers in Oncology* 3: 281.

Thomanetz, Venus et al. 2013. « Ablation of the MTORC2 Component Rictor in Brain or Purkinje Cells Affects Size and Neuron Morphology ». *The Journal of Cell Biology* 201(2): 293-308.

Thomas, S. M., et J. S. Brugge. 1997. « Cellular Functions Regulated by Src Family Kinases ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 13: 513-609.

Vanharanta, Sakari, et Joan Massagué. 2013. « Origins of Metastatic Traits ». *Cancer Cell* 24(4): 410-21.

Veracini, Laurence et al. 2006. « Two Distinct Pools of Src Family Tyrosine Kinases Regulate PDGF-Induced DNA Synthesis and Actin Dorsal Ruffles ». *Journal of Cell Science* 119(Pt 14): 2921-34.

Vézina, C., A. Kudelski, et S. N. Sehgal. 1975. « Rapamycin (AY-22,989), a New Antifungal Antibiotic. I. Taxonomy of the Producing Streptomycete and Isolation of the Active Principle ». *The Journal of Antibiotics* 28(10): 721-26.

Walsh, Cathy. 2017. « Colorectal polyps: cancer risk and classification ». *Gastrointestinal Nursing* 15(5): 26-32.

Walther, A., R. Houlston, et I. Tomlinson. 2008. « Association between Chromosomal Instability and Prognosis in Colorectal Cancer: A Meta-Analysis ». *Gut* 57(7): 941-50.

Wang, Bin et al. 2017. « TRAF2 and OTUD7B Govern a Ubiquitin-Dependent Switch That Regulates MTORC2 Signalling ». *Nature* 545(7654): 365-69.

Wang, Bo et al. 2020. « SIRT2-Dependent IDH1 Deacetylation Inhibits Colorectal Cancer and Liver Metastases ». *EMBO reports* 21(4): e48183.

Wang, Qing et al. 2017. « Tumor suppressor Pdcd4attenuates Sin1 translation to inhibit invasion in colon carcinoma ». *Oncogene* 36(45): 6225-34.

Wange, R. L., et L. E. Samelson. 1996. « Complex Complexes: Signaling at the TCR ». *Immunity* 5(3): 197-205.

Weigelt, B., P. H. Warne, et J. Downward. 2011. « PIK3CA Mutation, but Not PTEN Loss of Function, Determines the Sensitivity of Breast Cancer Cells to MTOR Inhibitory Drugs ». *Oncogene* 30(29): 3222-33.

Whitehall, Vicki L. J. et al. 2012. « Oncogenic PIK3CA Mutations in Colorectal Cancers and Polyps ». *International Journal of Cancer* 131(4): 813-20.

Willett, Walter. 1989. « The Search for the Causes of Breast and Colon Cancer ». *Nature* 338(6214): 389-94.

Windham, T. Christopher et al. 2002. « Src Activation Regulates Anoikis in Human Colon Tumor Cell Lines ». *Oncogene* 21(51): 7797-7807.

Worthley, Daniel L., et Barbara A. Leggett. 2010. « Colorectal Cancer: Molecular Features and Clinical Opportunities ». *The Clinical Biochemist. Reviews* 31(2): 31-38.

Wybenga-Groot, Leanne E., et C. Jane McGlade. 2013. « Crystal Structure of Src-like Adaptor Protein 2 Reveals Close Association of SH3 and SH2 Domains through β-Sheet Formation ». *Cellular Signalling* 25(12): 2702-8.

Xu, W. et al. 1999. « Crystal Structures of C-Src Reveal Features of Its Autoinhibitory Mechanism ». *Molecular Cell* 3(5): 629-38.

Xu, W., S. C. Harrison, et M. J. Eck. 1997. « Three-Dimensional Structure of the Tyrosine Kinase c-Src ». *Nature* 385(6617): 595-602.

Yang, Guang, Danielle S. Murashige, Sean J. Humphrey, et David E. James. 2015. « A Positive Feedback Loop between Akt and MTORC2 via SIN1 Phosphorylation ». *Cell Reports* 12(6): 937-43.

Yang, Haijuan et al. 2013. « MTOR Kinase Structure, Mechanism and Regulation ». *Nature* 497(7448): 217-23.

Yasukawa, H. et al. 1999. « The JAK-Binding Protein JAB Inhibits Janus Tyrosine Kinase Activity through Binding in the Activation Loop ». *The EMBO journal* 18(5): 1309-20.

Yeatman, Timothy J. 2004. « A Renaissance for SRC ». *Nature Reviews. Cancer* 4(6): 470-80.

Yokouchi, M. et al. 1999. « APS, an Adaptor Protein Containing PH and SH2 Domains, Is Associated with the PDGF Receptor and c-Cbl and Inhibits PDGF-Induced Mitogenesis ». *Oncogene* 18(3): 759-67.

Yoshimura, A. et al. 1995. « A Novel Cytokine-Inducible Gene CIS Encodes an SH2-Containing Protein That Binds to Tyrosine-Phosphorylated Interleukin 3 and Erythropoietin Receptors ». *The EMBO journal* 14(12): 2816-26.

Young, Joanne et al. 2007. « Serrated Pathway Colorectal Cancer in the Population: Genetic Consideration ». *Gut* 56(10): 1453-59.

Yu, Yonghao et al. 2011. « Phosphoproteomic Analysis Identifies Grb10 as an MTORC1 Substrate That Negatively Regulates Insulin Signaling ». *Science (New York, N.Y.)* 332(6035): 1322-26.

Yuan, Hai-Xin, et Kun-Liang Guan. 2015. « The SIN1-PH Domain Connects MTORC2 to PI3K ». *Cancer Discovery* 5(11): 1127-29.

Zhang, Yongjun et al. 2009. « Reversion-induced LIM interaction with Src reveals a novel Src inactivation cycle ». *Journal of Cell Biology* 184(6): 785-92.

Zinzalla, Vittoria, Daniele Stracka, Wolfgang Oppliger, et Michael N. Hall. 2011. « Activation of MTORC2 by Association with the Ribosome ». *Cell* 144(5): 757-68.

Table des illustrations

Table des illustrations

Figures :

INTRODUCTION 15

I. PATHOLOGIE DU CANCER COLORECTAL 16
A. Epidémiologie 16
B. Physiologie du côlon 17
Figure 1 : Anatomie du côlon chez l'homme. 17
Figure 2 : Structure de la paroi de l'intestin. 18
Figure 3 : Organisation de l'épithélium intestina. 20
C. Carcinogénèse colorectale 20
Figure 4 : Modèle de progression des CCR selon Fearon & Volgelestein 24
Figure 5 : Aperçu des trois principales voies de la carcinogénèse du côlon. 26
Figure 6 : Voie de signalisation Wnt/β-caténine canonique. 28
Figure 7 : Dérégulations connues des voies de signalisation de l'EGFR dans le CCR. 30
Figure 8 : Représentation des différences entre cancer du côlon droit vs côlon gauche. 32
D. Classification du CCR 33
Figure 9 : Caractéristiques clés de la classification CMS 36
E. Traitement des CCR 37
Figure 10 : Agents ciblés approuvés par la FDA dans le CCR. 39
II. LES PROTEINES KINASES DANS LE CCR 40
A. Généralités 40
Figure 11 : Représentation schématique du mode d'action des protéines kinases. 41
Tableau 3 : Résumé de la classification des protéines kinases eucaryotes. 42
Figure 12 : Dendrogramme du tyrosine kinome humain. 43
B. Les CTK de la famille de SRC dans le CCR 44
Figure 13 : La famille des CTK 44
Figure 14 : Structure modulaire des SFK 47
Figure 15 : Structure des SFK en conformation fermée inactive (à gauche) et en conformation ouverte active (à droite) 48
Figure 16 : Augmentation de l'expression et de l'activité de SRC au cours de la progression tumorale colique 51
Figure 17 : Courbes de survie de patients atteints de CCR en fonction de l'augmentation de l'activité de Src (à gauche) et de Yes (à droite) 51
Figure 18 : Modèle résumant la signalisation SFK dans le CCR 54
Figure 19 : Mécanismes sous-jacents à l'activité tumorale SFK dans les cellules CCR 58
C. La Protéine Sérine-Thréonine Kinase mTOR 59
Figure 20 : Structure de mTORC1 61
Figure 21 : Structure de mTORC2 63
Figure 22 : Cibles en aval de la signalisation mTORC1 65
Figure 23 : Cibles en aval de la signalisation mTORC2 67
Figure 24 : Régulateurs en amont de la voie de signalisation mTOR 69
Figure 25 : Les facteurs de croissance induisent la phosphorylation d'AKT sur la Ser473 via mTORC2 71
Figure 26 : Crosstalks connus entre mTORC1 et mTORC2 72
Figure 27 : Inhibiteurs de mTOR dans les cancers humains 80
III. LE CONTROLE DE LA SIGNALISATION ONCOGENIQUE DES SFK PAR LA PROTEINE ADAPTATRICE SLAP 81
A. Les protéines adaptatrices 81
Figure 28 : Les protéines adaptatrices 81
Figure 29 : Liste non exhaustive d'adaptateurs régulant positivement ou négativement des voies de signalisation dépendantes des PTK. 82
Figure 30 : Mécanisme d'activation de la voie Ras/MAPK par l'adaptateur positif Grb2. 83
Figure 31: Structure des adaptateurs de la famille SOCS 86
Figure 32 : Mécanismes d'inhibition de la voie Jak/STAT par les adaptateurs négatifs SOCS 87

B. Inhibition des voies dépendantes des SFK par SLAP 88
Figure 33 : Structure de l'adaptateur SLAP. 88
Figure 34 : Comparaison structure de l'adaptateur SLAP et SLAP2. 91
Figure 35 : Mécanismes d'inhibition de l'activation des lymphocytes T Lck-dépendante par les adaptateurs de la famille SLAP 96
Figure 36 : Mécanismes d'inhibition de l'activation des lymphocytes B Lck-dépendante par les adaptateurs de la famille SLAP 97
Figure 37 : Mécanisme d'inhibition de la mitogenèse SRC-dépendante en réponse au PDGF par l'adaptateur négatif SLAP 98
Figure 38 : Mécanismes d'inhibition de l'activation des monocytes/macrophages par les adaptateurs de la famille SLAP. 100
Figure 39 : SLAP induit la dégradation du RTK EphA2 de manière SRC-dépendante pour réguler la croissance et l'invasion des cellules de CCR 103

Tableaux :

INTRODUCTION 15
I. PATHOLOGIE DU CANCER COLORECTAL 16
Tableau 1 : Huitième édition de la classification TNM des lésions cancéreuses colorectales 34
Tableau 2 : Correspondance entre la classification TNM, le stade colorectal et la survie à 5 ans 35
II. LES PROTEINES KINASES DANS LE CCR 40
Tableau 3 : Résumé de la classification des protéines kinases eucaryotes. 42
III. LE CONTROLE DE LA SIGNALISATION ONCOGENIQUE DES SFK PAR LA PROTEINE ADAPTATRICE SLAP 81
Tableau 4 : Exemple d'adaptateurs négatifs et leurs modes de fonctionnement. 85
Tableau 5: Interacteurs connus de SLAP. 90
Tableau 6 : Interacteurs connus de SLAP2. 92

Publications et communications

Publications et communications

Articles :

Brice Nativel, Stéphane Ramin-Mangata, Rudy Mevizou, Audrey Figuester, Jessica Andries, Thomas Iwema, Nobunao Ikewaki, Philippe Gasque, Wildriss Viranaïcken. CD93 is a cell surface lectin receptor involved in the control of the inflammatory response stimulated by exogenous DNA. Immunology. 2019 Oct;158(2):85-93. doi: 10.1111/imm.13100.

Revues :

Rudy Mevizou, Audrey Sirvent, Serge Roche. Control of Tyrosine Kinase Signalling by Small Adaptors in Colorectal Cancer. Cancers (Basel). 2019 May 14;11(5):669. doi: 10.3390/cancers11050669.

Audrey Sirvent, Rudy Mevizou, Dana Naim, Marie Lafitte, Serge Roche. Control of Tyrosine Kinase Signalling by Small Adaptors in Colorectal Cancer. Cancers (Basel). 2020 Jul 23;12(8):2014. doi: 10.3390/cancers12082014.

Posters :

R. Mevizou, C. Naudin, G. Greaves, V. Simon, S. Roche & A. Sirvent

SLAP displays tumor suppressor function in colorectal cancer by inhibiting mTORC2 signaling.

14èmes Journées du Cancéropôle Grand Sud-Ouest, 22 Novembre 2018, Montpellier.

R. Mevizou, C. Naudin, G. Greaves, L. Dutrieux, V. Simon, S. Roche & A. Sirvent

SLAP displays tumor suppressor function in colorectal cancer by inhibiting mTORC2 signaling.

23èmes Journées Jeunes Chercheurs, 25 & 26 Novembre 2019, Montpellier.