

## Les protéines de la famille CIS-SOCS : des modulateurs des effets biologiques des cytokines

Sylvie Gisselbrecht

L'intensité et la durée du signal d'activation déterminent la nature de la réponse cellulaire à des cytokines. Une nouvelle famille de régulateurs négatifs de ce signal a été récemment identifiée. Ces protéines, dont l'expression est induite par des cytokines, ont été appelées CIS (*cytokine inducible SH2-containing protein*) et/ou SOCS (*suppressor of cytokine signalling*). L'intérêt grandissant porté à cette famille de protéines vient des propriétés démontrées pour trois d'entre elles : CIS, SOCS-1 et SOCS-3 inhibent la réponse aux cytokines. Ces protéines sont en effet impliquées dans le rétrocontrôle négatif de la voie Jak/STAT et règlent la durée du signal d'activation. Elles peuvent aussi inhiber la réponse à des cytokines différentes de celles utilisées pour induire leur expression (phénomène de *cross-interference*). Les protéines CIS/SOCS apparaissent donc comme des modulateurs potentiels des réponses immunitaires et inflammatoires, de l'hématopoïèse et de la réponse hormonale.

**A**u cours de ces dernières années, de nombreux travaux ont permis de mieux comprendre par quels mécanismes les cytokines exercent leurs effets biologiques. Les récepteurs de cytokines dépourvus d'activité tyrosine kinase sont couplés, par leur domaine cytoplasmique, à des tyrosine kinases intracellulaires qui sont activées après la fixation d'une cytokine à son récepteur. Le rôle essentiel des tyrosine kinases de la famille JAK (janus kinases) (JAK1, JAK2, JAK3 et Tyk2) dans la réponse aux cytokines, déjà

démontré grâce à l'existence de lignées cellulaires mutantes pour certaines JAK, a été récemment confirmé par l'invalidation des gènes *Jak1*, *Jak2* et *Jak3* chez la souris (*m/s* 1998, n° 14, p. 1129). Après fixation du ligand, les JAK associées au récepteur sont activées et phosphorylent des protéines cellulaires, dont le récepteur, créant des points d'ancrage pour des molécules de signalisation possédant des domaines d'association pour des peptides phosphorylés sur un résidu tyrosine (domaines SH2, *Src homology region* 2 et PTB, *phosphotyrosine binding*). C'est

### ADRESSE

S. Gisselbrecht : Inserm U. 363, ICGM, Paris V, Hôpital Cochin, 27, rue du Faubourg-Saint-Jacques, 75014 Paris, France.

ainsi que les facteurs de transcription STATc (pour *signal transducer and activator of transcription*) sont recrutés sur les récepteurs activés. Phosphorylés par les JAK, les STAT se dimérisent et migrent dans le noyau où ils activent la transcription de gènes cibles. Par recrutement direct sur le récepteur phosphorylé ou par le biais de molécules adaptatrices, les cytokines activent aussi d'autres voies de signalisation conduisant à l'expression de c-myc, à l'activation de la PI3 kinase et des facteurs de transcription AP1 par la voie Ras/MAP-kinases. Ces phénomènes sont très brefs puisque l'activation des JAK, la phosphorylation sur tyrosine de protéines cellulaires, l'activation des STAT, de la PI3 kinase et des MAP-kinases sont habituellement maximales 5 à 15 minutes après ajout du ligand.

### La régulation négative du signal

Les mécanismes impliqués dans la mise au repos du système d'activation sont encore mal connus. Ils peuvent intervenir à différents niveaux : diminution globale de la signalisation par internalisation/déphosphorylation du récepteur activé, déphosphorylation/inactivation des JAK ou par l'inhibition sélective de certaines voies de signalisation.

Le rôle de l'internalisation du récepteur activé dans l'arrêt du signal d'activation a été récemment illustré par la mise en évidence de mutations acquises du récepteur du G-CSF (*granulocyte-colony stimulating factor*) chez des patients atteints de neutropénie sévère congénitale développant des leucémies aiguës myéloblastiques. Ces mutations diminuent l'internalisation du récepteur tout en augmentant la réponse proliférative au G-CSF [1, 2]. Plusieurs systèmes protéolytiques (lysosome et protéasome) participent à la régulation de la durée du signal d'activation des cytokines.

La tyrosine phosphatase SHP-1 (*SH2 domain containing phosphatase*, appelée antérieurement HCP, PTP1C ou SH-PTP1) joue un rôle majeur dans la régulation négative du signal. Cette phosphatase, essentiellement hématopoïétique, est recrutée sur les récepteurs par ses domaines SH2 et

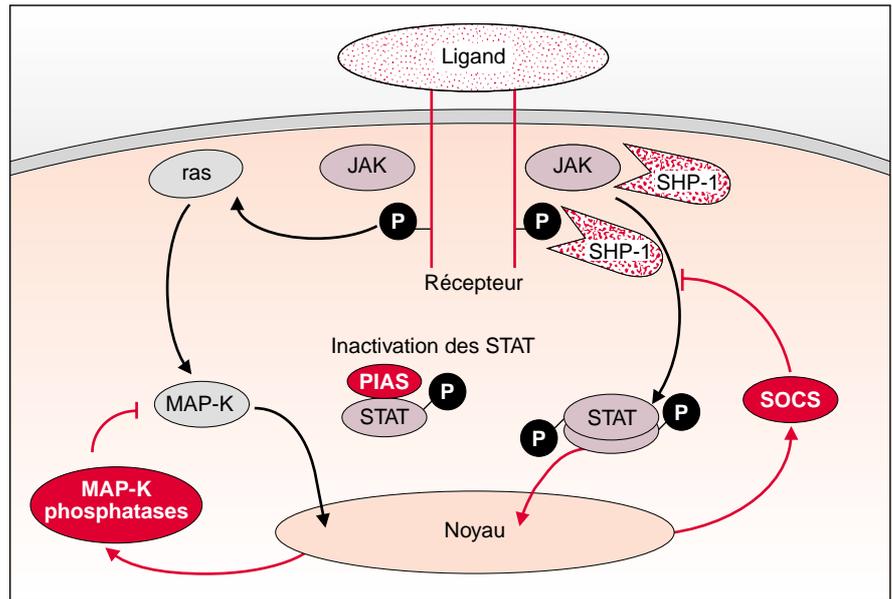


Figure 1. **Représentation schématique des principales molécules inhibitrices de la signalisation des cytokines.** Contrairement aux autres molécules inhibitrices qui préexistent dans les cellules non stimulées, l'expression des protéines de la famille CIS-SOCS et des MAP-kinase phosphatases est induite par la fixation d'une cytokine à son récepteur.

s'associe directement aux JAK par un mécanisme indépendant de SH2. Son importance dans l'arrêt du signal est illustrée : (1) par la prolifération accrue et l'hyperréactivité des cellules hématopoïétiques des souris *motheaten* ayant des mutations inactivatrices de SHP-1 [3, 4] ; (2) par l'existence, chez l'homme, d'érythrocytoses familiales associées à des mutations du gène du récepteur de l'érythropoïétine (Epo), conduisant à l'expression d'un récepteur tronqué ne fixant plus SHP-1 [5].

Des protéines intracellulaires inhibent sélectivement certaines voies de signalisation. Les MAP-kinases phosphatases, dont l'expression est induite par les

MAP-kinases, déphosphorylent et inactivent ces kinases, participant ainsi à la formation d'une boucle de rétrocontrôle négatif spécifique de cette voie [6]. Des lipides phosphatases, le produit du gène suppresseur de tumeur PTEN (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten*) et la protéine SHIP (*SH2 containing inositol phosphatase*) déphosphorylent des métabolites actifs produits par la PI3 kinase [7, 8]. De nouvelles molécules, PIAS1 et PIAS3 (*protein inhibitor of activated STATs*) interagissent respectivement avec STAT1 et STAT3 phosphorylés et inhibent leur fixation à l'ADN [9, 10]. Les protéines de la famille CIS (*cytokine-inducible inhibitor of signalling*)

	CIS	SOCS-1	SOCS-2	SOCS-3
IL-2	+			
IL-3, GM-CSF	+	+		+
EPO	+	+	+	
GH	+	+	+	++
LIF, IL-6	(+)	+	+	+
G-CSF	-	+		
IFN $\gamma$	(+)	++	-	+
IFN $\alpha/\beta$	-	-	-	-

SOCS (*suppressor of cytokine signalling*) sont des inhibiteurs de la voie de signalisation JAK-STAT [11]. Contrairement à SHP-1, PTEN, SHIP, et aux PIAS qui préexistent dans les cellules non activées, les protéines CIS-SOCS ne sont détectées qu'après stimulation par des cytokines. Les gènes codant pour ces protéines présentent les caractéristiques structurales des gènes «immédiats précoces»: gènes de petite taille, avec peu ou pas d'introns (*SOCS-1* et *SOCS-3*: 1 exon; *SOCS-2*: 1 intron; *CIS*: 2 introns). Des éléments de réponse aux STAT ont été identifiés dans les régions promotrices des gènes *CIS* et *SOCS-1*. Par leur caractère inductible, on peut ainsi considérer que les SOCS jouent vis-à-vis de la voie JAK/STAT un rôle équivalent à celui des MAP-kinase phosphatases pour la voie MAP-kinase (figure 1).

### Qu'entend-on par famille CIS-SOCS?

Les ADNc des deux membres fondateurs de la famille, CIS et SOCS-1, codent pour des protéines de petite taille (respectivement 257 et 212 acides aminés). La comparaison de leurs séquences montre une identité de 35% en acides aminés, les régions les plus conservées étant regroupées en deux blocs: un domaine SH2 central et un domaine de 40 acides aminés situé à l'extrémité carboxy-terminale de la molécule, appelé boîte SOCS (*voir plus loin la fonction de cette boîte*). L'analyse de banques de séquences EST a permis d'identifier 6 nouveaux gènes apparentés contenant ces deux

domaines, qui furent dénommés *SOCS-2* à *SOCS-7*. La surexpression de trois de ces protéines, CIS, SOCS-1 et SOCS-3, inhibe la réponse à des cytokines (les protéines SOCS-5 à SOCS-7 ont été jusqu'à présent très peu étudiées). L'intégrité du domaine SH2 est indispensable aux fonctions inhibitrices de CIS, SOCS-1 et SOCS-3, alors que la boîte SOCS n'est pas requise pour la fonction de SOCS-1. Les effets inhibiteurs de CIS et SOCS-1 sont liés à leur capacité d'interagir avec certaines protéines cellulaires phosphorylées sur tyrosine mais leurs cibles protéiques sont différentes. CIS se comporte comme un inhibiteur compétitif de STAT5 en interagissant avec certains récepteurs de cytokines activés alors que SOCS-1 interagit avec les JAK et inhibe leur fonction catalytique. En raison des particularités de chaque système, les principales caractéristiques de chacune de ces protéines seront exposées séparément.

### CIS: un inhibiteur spécifique de certaines cytokines

Le gène *CIS* a été cloné en 1995 par banque différentielle comme un gène dont l'expression est induite par l'Epo mais non par l'EGF (*epidermal growth factor*) dans une lignée de cellules hématopoïétiques murines, les cellules Ba/F3, dépendantes de cytokines pour leur survie et leur prolifération [12]. L'expression de *CIS* est induite principalement par les cytokines activant STAT5 (IL-2, IL-3, GM-CSF [*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*], Epo, hor-

monie de croissance – GH – et prolactine) (Tableau I). Par le biais de récepteurs mutés, une corrélation entre activation de STAT5 et expression de *CIS* a été observée. De fait, des éléments de réponse à STAT5 ont été identifiés dans le promoteur des gènes *CIS* murin et humain [13, 14]. La surexpression de *CIS* ralentit la croissance des cellules cultivées en Epo ou en IL-3 [12]. Dans des systèmes cellulaires reconstitués (cellules non hématopoïétiques transfectées par un récepteur de cytokine et par des gènes rapporteurs placés sous contrôle d'éléments de réponse à STAT5), l'expression de *CIS* inhibe, mais seulement partiellement, l'activation de STAT5 après stimulation par l'Epo [13].

CIS interagit avec les récepteurs de l'IL-3 et de l'Epo, à condition que ceux-ci soient phosphorylés, mais ne s'associe ni aux JAK ni à STAT5 activés. CIS se fixe à une des deux tyrosines phosphorylées du récepteur de l'Epo qui sont capables d'activer indépendamment STAT5 [15]. CIS se comporte donc comme un inhibiteur compétitif partiel de l'activation de STAT5 par l'Epo. Le fait que le domaine SH2 de CIS ait une spécificité de liaison plus étroite que celui de STAT5 explique pourquoi certains récepteurs de cytokines comme ceux de la GH ou de la prolactine qui activent STAT5 ne sont pas inhibés par CIS [16] (Tableau II). La tyrosine du récepteur de l'Epo fixant CIS est aussi un site de fixation pour la phosphatase SHP-2 qui peut jouer le rôle d'adaptateur dans l'activation de la voie Ras. CIS pourrait donc interférer aussi avec cette voie de signalisation.

### SOCS-1: un inhibiteur de toutes les cytokines

SOCS-1 a été cloné deux ans plus tard par 5 équipes.

Le terme de SOCS (*suppressor of cytokine signalling*) dérive des propriétés de cette protéine qui ont permis son isolement par R. Starr *et al.* [17]. Ce groupe a cloné *SOCS-1* comme un gène inhibant la différenciation terminale, et donc permettant la prolifération, de cellules M1 cultivées en présence d'IL-6 (les cellules M1 sont des cellules myéloïdes murines, qui prolifèrent en l'absence de cytokines

Tableau II  
INHIBITION DES CYTOKINES PAR LES SOCS

	CIS	SOCS-1	SOCS-2	SOCS-3
IL-2	NT	+	NT	NT
IL-3, GM-CSF	+	+	NT	NT
EPO	+	+	—*	+
GH	—	+	—*	+
LIF, IL-6	—	+	±	+
G-CSF	—	+	NT	NT
IFN $\gamma$	—	+	—*	±
IFN $\alpha/\beta$	—	+	—*	—

NT: non testé.

\*: augmentation de la réponse transcriptionnelle et/ou hypersensibilité aux cytokines.

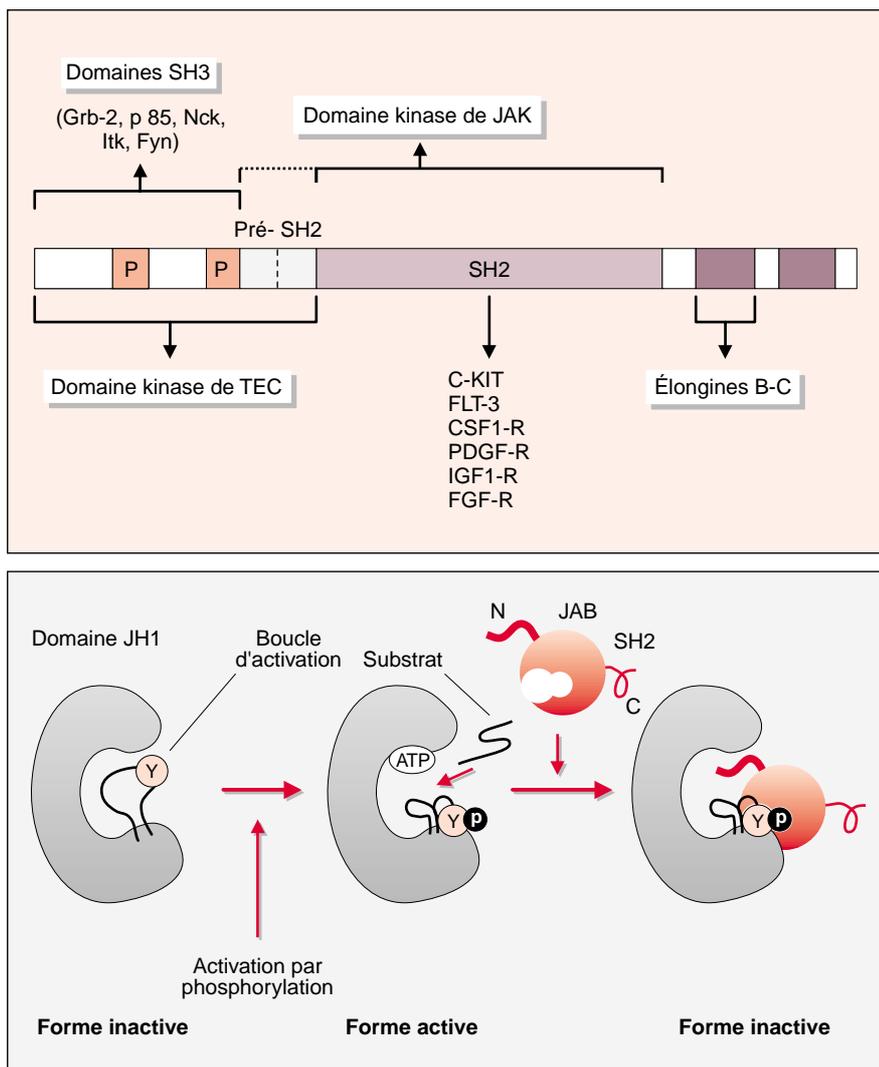


Figure 2. **A. Structure et partenaires de la protéine SOCS-1 (SSI-1, JAB).** La région amino-terminale de SOCS-1 contient deux régions riches en prolines (P) permettant la liaison à des protéines à domaine SH3. Cette région amino-terminale interagit aussi avec le domaine kinase de la tyrosine kinase Tec. Par son domaine SH2, SOCS-1 interagit avec les JAK et de nombreux récepteurs à activité tyrosine kinase. Le pré-SH2 renforce la liaison aux JAK et est nécessaire à l'inhibition de leur activité. Par son extrémité carboxy-terminale, SOCS-1 se lie au complexe des élongines. **B. Modèle d'activation du JH1 des JAK et de son inhibition par SOCS-1/JAB.** La fixation de JAB à la boucle d'activation des JAK entraînerait une modification conformationnelle du JH1 bloquant l'accès aux substrats où à l'ATP. (D'après Yasukawa et al. [24].)

et qui se différencient vers la lignée macrophagique en présence d'IL-6 et de LIF, *leukemia inhibiting factor*). Le même gène a été appelé *SSI-1* (*STAT-induced STAT inhibitor-1*) par T. Naka *et al.* [18] qui l'ont cloné parce que son produit était reconnu par un anticorps dirigé contre le domaine SH2 de STAT3.

*JAB* (pour *JAK binding protein*) est le nom qui lui fut attribué par l'équipe

d'A. Yoshimura qui l'a isolé par la méthode du double-hybride en levure comme un partenaire du domaine kinase (domaine JH1) de JAK2 [19]. Ce gène sera aussi isolé comme interagissant avec le domaine kinase de Tec puis de c-kit par la même méthode [20, 21]. La nomenclature la plus commune est celle de SOCS-1 utilisée dans cette revue (le terme de JAB peut prêter à confusion

car une autre protéine, *Jab1*, est un co-activateur de membres de la famille *jun*) (*m/s* 1999, n° 8/9, p. 1043).

L'expression de SOCS-1 est induite par un très large spectre de cytokines, qu'elles activent STAT5, STAT3 (LIF, IL-6, leptine) ou STAT1 (interféron  $\gamma$ ) (Tableau I), mais la rapidité et la durée de l'induction des ARNm SOCS-1, pour une même cytokine, sont très variables et fonction du type cellulaire. La fonctionnalité des éléments de réponse aux STAT présents dans le promoteur du gène n'a pas été étudiée mais l'implication de facteurs STAT dans l'expression de SOCS-1 est confortée par le fait que l'induction de SOCS-1 par l'IL-6 (qui active essentiellement STAT3), est inhibée par un dominant négatif de STAT3 [18]. Cependant d'autres éléments pourraient contrôler le niveau d'induction de SOCS-1 en réponse à une même cytokine dans des tissus différents.

A la différence de CIS, SOCS-1 s'associe à toutes les kinases JAK et inhibe leur activité catalytique. Il en résulte que SOCS-1 interfère avec la toute première étape d'activation de l'ensemble des récepteurs de cytokines (Tableau II). Un prétraitement par une cytokine peut théoriquement induire une résistance à une autre cytokine si le niveau d'expression de SOCS-1 atteint un seuil critique.

Les domaines de SOCS-1 impliqués dans l'interaction et l'inhibition des JAK sont bien caractérisés (figure 2A). SOCS-1 ne se lie qu'aux JAK activées et phosphorylées, sans induire leur dégradation. Le domaine SH2 de SOCS-1 est nécessaire à la liaison au JH1 des JAK mais ne suffit pas à inhiber l'activité kinase. L'inhibition de l'activité catalytique nécessite la présence de 24 acides aminés relativement conservés parmi les membres de la famille SOCS, situés juste en amont du domaine SH2 (pré-SH2) et qui renforcent l'affinité de l'interaction SOCS-JAK [22-24]. Cette région a été subdivisée en deux sous-domaines: les 12 acides aminés carboxy-terminaux du pré-SH2 feraient partie intégrante du domaine SH2 et seraient impliqués dans la liaison de SOCS-1 à la tyrosine Y<sup>1007</sup> de JAK2 située dans la boucle d'activation du domaine kinase. Sur la base d'homolo-

logies entre la séquence des aa de la boucle d'activation des JAK et la séquence des 12 acides aminés amino-terminaux du pré-SH2, il a été proposé que ces 12 acides aminés confèreraient à SOCS-1 une fonction de pseudo-substrat non phosphorylable d'où leur appellation de *kinase inhibitory region* [25]. Par analogie avec le mode de régulation d'autres kinases, un modèle d'inhibition de l'activité catalytique des JAK par SOCS-1 a été proposé. La liaison de SOCS-1 au JH1 modifierait la conformation de ce dernier et rendrait inaccessible le site de fixation d'ATP ([24] *figure 2B*). Des études structurales sont nécessaires pour contrôler ce modèle. Les JAK ne sont pas toutefois les seuls partenaires de SOCS-1.

SOCS-1 interagit aussi avec le domaine kinase de la tyrosine kinase Tec et inactive son activité catalytique. Tec est impliquée dans l'induction de c-fos par les cytokines et l'association SOCS-1/Tec pourrait inhiber l'expression de ce gène. Contrairement à l'interaction SOCS-1/JAK, la liaison SOCS-1/domaine kinase de Tec est indépendante de l'état de phosphorylation de Tec et de la présence du domaine SH2 de SOCS-1. La liaison et l'inactivation de Tec requièrent l'extrémité amino-terminale de SOCS-1 [20] (*figure 2A*). Ainsi, les deux domaines caractéristiques des SOCS, SH2 et boîte SOCS, n'interviennent ni dans la liaison ni dans l'inactivation de Tec. Il serait intéressant de préciser les acides aminés de SOCS-1 impliqués dans la liaison et l'inhibition de Tec par une étude plus détaillée (implication du pré-SH2?). Il est possible, mais non démontré, que SOCS-1 interagisse avec deux domaines différents de Tec (domaine kinase et domaine SH3): en effet, l'extrémité amino-terminale de SOCS-1 contient des régions riches en résidus proline qui s'associent, en double-hybride, à différents domaines SH3 (ceux de Grb2, Nck, de la sous-unité régulatrice de la PI3K, de Fyn mais aussi d'Itk, une kinase de la famille Tec) [21].

SOCS-1 ne se lie pas au domaine catalytique des kinases de la famille Src mais interagit, par son domaine SH2, avec le domaine kinase d'un grand nombre de récepteurs à activité tyrosine kinase (*figure 2A*). Cette association n'interfère pas avec la fonction

catalytique de ces récepteurs et ne modifie pas l'état de phosphorylation de leurs principales cibles cellulaires. Cependant, la surexpression de SOCS-1 diminue la réponse proliférative au *stem cell factor* (SCF) [21]. Plusieurs mécanismes pourraient rendre compte de cette fonction inhibitrice: inactivation de JAK (le SCF active des JAK et les cellules hématopoïétiques de souris mutantes pour JAK2 répondent mal au SCF), de Tec, compétition pour la fixation d'une molécule effectrice. Elle pourrait résulter de l'inhibition de la fonction d'autres protéines avec lesquelles SOCS-1 interagit (Pyk2, Vav, Grb2, Nck...).

Des souris mutantes pour SOCS-1 ont été engendrées par deux équipes [25, 26]. Ces souris meurent 3 semaines après la naissance et présentent de nombreuses anomalies: dégénérescence adipeuse des cellules hépatiques, infiltration de nombreux tissus (poumon pancréas, cœur et peau) par des macrophages et des polynucléaires neutrophiles, hypertrophie cardiaque et déplétion en lymphocytes T et B. Une hypersensibilité à différentes cytokines a été observée (IL-4, GM-CSF et interféron  $\gamma$ ) et il a été suggéré que la réponse accrue aux cytokines due à l'absence de SOCS-1 pourrait rendre compte de la diversité des manifestations pathologiques de ces souris.

En conclusion, SOCS-1 inhibe, sans aucune sélectivité, la réponse à toutes les cytokines par inactivation des JAK et de Tec. SOCS-1 pourrait interférer avec d'autres voies de signalisation par sa liaison à d'autres protéines. Le niveau et la durée d'induction de SOCS-1 en réponse à une cytokine semblent être un paramètre important qui pourrait déterminer la capacité de réponse ultérieure à d'autres cytokines. Il dépend certainement du niveau d'expression des récepteurs de la première cytokine, des éléments de réponse présents dans le promoteur de SOCS-1 et d'autres facteurs qui pourraient contrôler la spécificité tissulaire d'expression de ce gène, la stabilité de l'ARNm et de la protéine SOCS-1.

### **SOCS-3: un inhibiteur certes, mais comment?**

SOCS-3 est le dernier membre de la famille pour lequel une fonction

inhibitrice a été clairement démontrée. Comme celle de SOCS-1, l'expression de SOCS-3 est induite par un grand nombre de cytokines, mais les éléments qui contrôlent l'expression de ce gène n'ont pas été étudiés. SOCS-3 est le principal gène SOCS induit dans le foie par la GH (*growth hormone*), dans les monocytes par l'IL-10, dans l'hypothalamus par la leptine et dans une lignée pituitaire, la lignée AtT-20 par le LIF. SOCS-3 semble inhiber la réponse à de nombreuses cytokines, mais les résultats divergent quant à l'effet de SOCS-3 sur la réponse à l'interféron  $\gamma$  [27, 28]. SOCS-3 s'associe par son domaine SH2 au JH1 des JAK, mais avec une moins bonne affinité que SOCS-1 [27]. Contrairement à ce qui a été décrit pour SOCS-1, la surexpression de SOCS-3 n'interfère pas avec l'autophosphorylation et donc l'activité catalytique des JAK, dans des systèmes de surexpression de JAK. Cependant, SOCS-3 diminue le niveau de phosphorylation des protéines cellulaires phosphorylées sur tyrosine en réponse à l'IL-6 et, en particulier, celui de la chaîne effectrice du récepteur de l'IL-6, la gp 130 [29]. Dans les systèmes où cela a été étudié (essentiellement les cytokines de la famille IL-6), SOCS-3 ne s'associe ni aux récepteurs ni aux STAT activés [29].

Les données actuelles suggèrent que SOCS-3 inhibe une étape très précoce de la signalisation par un mécanisme différent de celui de SOCS-1 (interaction JAK/récepteur, accessibilité des substrats?). Une autre hypothèse serait qu'en interagissant avec des partenaires spécifiques, SOCS-3 inhibe d'autres effecteurs de la signalisation des cytokines. Par exemple, contrairement à SOCS-1, SOCS-3 se lie en double-hybride au domaine kinase de Lck, une tyrosine kinase de la famille Src [29], mais on ne connaît pas encore les conséquences fonctionnelles de cette interaction.

### **Et les autres SOCS?**

Les données sur les autres membres de la famille SOCS sont encore très fragmentaires.

SOCS-2 inhiberait la différenciation des cellules M1 par l'IL-6 sans toutefois modifier la réponse transcrip-

tionnelle à l'IL-6 sur des éléments de réponse à STAT3, mais ce résultat est controversé. Curieusement, la surexpression de SOCS-2 s'accompagne d'hypersensibilité aux effets biologiques des interférons [30]. De plus, SOCS-2 augmente la réponse transcriptionnelle en réponse aux interférons, à la GH et à l'Epo sur des éléments de réponse aux STAT [16, 29, 30]. La même observation a été faite pour SOCS-4 en réponse à l'Epo [29]. Ces données doivent être confirmées mais elles posent le problème d'une nouvelle fonction possible de certaines SOCS: potentialiser la réponse à certaines cytokines?

### SOCS et résistance aux cytokines

Sur la base d'études de corrélation, les protéines de la famille SOCS ont été impliquées dans divers états de résistance à des cytokines, mais la démonstration que ces protéines sont seules responsables d'une inhibition n'a pas toujours été apportée de façon définitive. En effet, le traitement de cellules par une cytokine peut interférer avec la réponse à d'autres cytokines par de nombreux autres mécanismes: diminution de l'expression de récepteurs membranaires ou de molécules de signalisation, compétition pour un élément de signalisation commun, activation ou induction de phosphatases, compétition entre facteurs de transcription pour la fixation à une même séquence d'ADN ou à des éléments de réponse distincts mais chevauchants, compétition pour un co-activateur transcriptionnel présent en quantités limitantes...

La leptine induit une forte expression de SOCS-3 et les concentrations élevées de leptine circulante de souris obèses porteuses de la mutation *A<sup>y</sup>/a* (*lethal yellow*) sont associés à une accumulation du messager de SOCS-3 dans l'hypothalamus de ces souris. SOCS-3 inhibant l'action de la leptine, il a été suggéré que la surexpression de SOCS-3 puisse être un des éléments qui participent à la résistance centrale à la leptine de ces souris [31]. L'expression de protéines SOCS pourrait rendre compte de phénomènes d'interférence entre cytokines. SOCS-3 pourrait être le facteur responsable de la résistance à l'interfé-

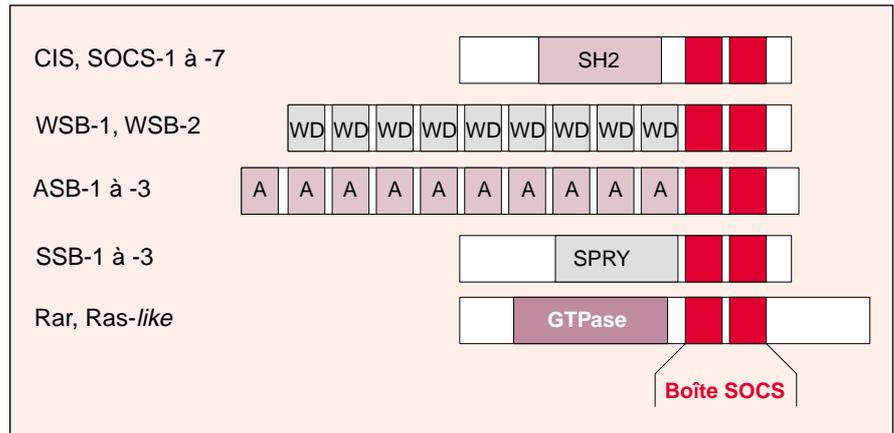


Figure 3. **Comparaison de la structure des différentes protéines contenant une boîte SOCS.** Les protéines CIS-SOCS contiennent un domaine SH2, WSB-1 et WSB-2 des répétitions WD 40 (WD), ASB-1 à ASB-3 des motifs ankyrine (A). Les protéines Rar et Ras-like sont deux GTPases de la famille Ras. La boîte SOCS est toujours située à l'extrémité carboxy-terminale de ces protéines.

ron  $\gamma$  de monocytes traités par l'IL-10 [32]. La résistance à l'IL-4 de lymphocytes B traités par l'interféron  $\gamma$  est probablement due à l'induction de SOCS-1 par cette cytokine [33]. De même, il est possible que des facteurs SOCS participent à la résistance à l'IL-6 de monocytes traités par le GM-CSF car, comme dans le cas précédent, il est établi que cette résistance requiert la synthèse d'ARN et de protéine.

La surexpression de SOCS-1 est probablement responsable de la résistance de certaines lignées cellulaires aux interférons [30]. On pourrait envisager que la résistance à l'interféron  $\alpha$  de patients atteints de leucémie myéloïde chronique soit due à l'expression de facteurs SOCS par les cellules leucémiques. En effet, la protéine Bcr-Abl induit l'activation constitutive de facteurs STAT et par conséquent l'expression de facteurs SOCS. On pourrait aussi envisager que des protéines SOCS, et en particulier SOCS-3 [16], participent au dimorphisme sexuel mâle/femelle. On sait en effet que celui-ci résulte du mode de production de la GH, continu chez les femelles, pulsatile chez les mâles.

La réponse optimale à une cytokine s'observe en effet dans des cellules préalablement sévrées, alors que la présence continue du même facteur provoque une réponse moindre (désensibilisation). Une conséquence de ces observations est que l'administration de cytokine à des fins thérapeutiques devrait être plus

efficace par traitement discontinu plutôt que continu.

### La boîte SOCS: un domaine d'association aux élongines

Outre des protéines de la famille CIS-SOCS, un certain nombre de protéines dépourvues de domaine SH2, et dont l'expression n'est pas induite par les cytokines, contiennent une boîte SOCS. Celle-ci est toujours située en position carboxy-terminale, en aval de domaines d'interaction protéine-protéine tels que motifs ankyrine, répétitions WD, motif SPRY, ou en aval d'un domaine GTPase ([34] figure 3).

L'existence d'un nouveau motif conservé au sein de protéines ayant une structure par ailleurs différente suggérerait que sa présence pouvait conférer des propriétés communes à ces protéines. Ainsi, il a été montré récemment que la boîte SOCS interagissait avec un complexe protéique, le complexe des «élongines BC» [35, 36]. Ce complexe était connu comme s'associant à deux autres protéines cellulaires, l'élongine A, un des facteurs d'élongation de l'ARN par l'ARN polymérase II, et le produit du gène suppresseur de tumeur muté dans le syndrome de von Hippel-Lindau (VHL) (*m/s* 1999, n° 8/9, p. 1008 et p. 1051). Ce syndrome héréditaire est caractérisé par la survenue de tumeurs rénales et vasculaires dues à la surexpression de gènes normale-

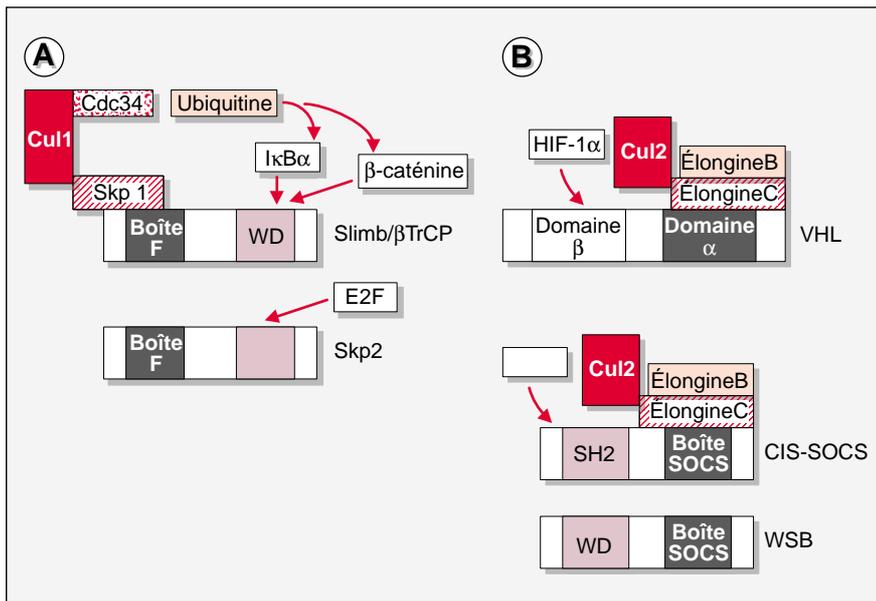


Figure 4. **Comparaison des structures du complexe SCF impliqué dans la polyubiquitinylation des protéines en A et du complexe des élongines en B.** A. Le complexe SCF contient une molécule de type Cdc 34 (enzyme E2 ou enzyme de conjugaison de l'ubiquitine) couplée à l'ubiquitine, une protéine de la famille des cullines (*cul1*) homologue avec Cdc 53, et la protéine *Skp1*. Les protéines à boîte F interagissent par la boîte F de *Skp1* et par un autre domaine d'interaction protéine-protéine à une (ou plusieurs) protéines cellulaires. On peut les considérer comme des adaptateurs permettant la sélection des protéines qui seront ubiquitinylées par le complexe E3 ligase. Chez les mammifères,  $\beta$ -TrCP (l'équivalent de *slimb* chez la drosophile) conduit à la dégradation de CD4 en interagissant avec la protéine vpu du virus de l'immunodéficience humaine [40, 45]. La même protéine est impliquée dans l'ubiquitinylation et la dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$  et de la  $\beta$ -caténine [41-43]. Une autre protéine à boîte F, *Skp2*, serait responsable de la dégradation d'E2F en phase S/G2 [44]. B. Le complexe des élongines comporte une molécule apparentée à l'ubiquitine : l'élongine B, la culline 2 et l'élongine C apparentée à *Skp1*. Le produit du gène VHL se fixe par son domaine  $\alpha$  à l'élongine C. VHL a un rôle d'adaptateur, permettant le recrutement de la sous-unité  $\alpha$  de HIF-1 au complexe des élongines, l'interaction entre VHL et HIF-1 $\alpha$  conduisant à la dégradation de cette protéine. Par analogie, on peut faire l'hypothèse selon laquelle la fonction de certaines protéines à boîte SOCS serait de sélectionner des protéines cellulaires qui seraient présentées au complexe des élongines puis dégradées.

ment induits par l'hypoxie. La majorité des mutations de la protéine VHL survenant dans son domaine d'association au complexe des élongines, il avait été suggéré que ce complexe participait à la fonction « gène suppresseur de tumeur » de VHL. L'élongine B est une petite protéine apparentée à l'ubiquitine. Le complexe des élongines est un complexe multiprotéique qui présente une certaine parenté avec un des complexes ayant une activité E3 ubiquitine ligase responsable de la polyubiquitinylation et de la dégradation de certaines protéines cellulaires par le protéasome, le complexe SCF pour *Skp1-CDC53* (*cul-*

*lin*)-F-box-protein (figure 4) (*m/s* 1999, n° 8/9, p. 1008). Les deux complexes contiennent une protéine de type « culline ». La cristallisation récente du complexe VHL-élongines B + C [37], a confirmé l'homologie structurale entre élongine B et ubiquitine et entre élongine C et *Skp1*. De plus, cette étude a montré que le domaine de liaison à l'élongine C de VHL a la même structure que la boîte F des protéines à boîte F. Ces protéines contiennent, outre la boîte F, un motif d'interaction protéine-protéine de structure variable (pour revue, voir [38]). Certaines protéines à boîte F ont été, chez la levure et plus récem-

ment chez l'homme, impliquées dans la sélection de protéines qui sont présentées et polyubiquitinylées par le complexe E3 ligase puis dégradées par le protéasome. Cependant, jusqu'à très récemment, la participation du complexe des élongines à la dégradation de protéines cellulaires n'était pas établie [39]. Un pas en avant a été franchi par la découverte que l'association du produit du gène VHL à la sous-unité  $\alpha$  de HIF-1 (*hypoxia inducible factor 1*) conduit à la dégradation de cette protéine [40]. Si le complexe des élongines est impliqué dans la dégradation de protéines, on peut faire l'hypothèse selon laquelle certaines protéines à domaine SOCS partagent les propriétés de la protéine VHL : sélectionner, par leur domaine d'interaction protéine-protéine, les protéines cellulaires qui seront présentées au complexe des élongines et ensuite dégradées. Actuellement, aucun argument ne montre que la fixation au complexe des élongines conduit à la dégradation des protéines de la famille CIS-SOCS, ni que leur activité d'inhibiteur de la signalisation des cytokines résulte de la dégradation de leur cibles cellulaires. Dans le cadre d'études sur SOCS-1, il a été montré que la présence de la boîte SOCS augmentait la stabilité de SOCS-1 [22] et que la surexpression des élongines B et C augmentait la durée de vie de cette protéine [36]. Par ailleurs, une protéine cible de CIS, le récepteur de l'Epo, n'est pas dégradée par le protéasome (P. Mayeux, communication personnelle). De plus, la boîte SOCS n'est pas requise pour l'inhibition des JAK et de Tec par SOCS-1 [20, 22, 23]. Ces résultats suggèrent que la fixation du complexe des élongines n'est pas le mécanisme responsable de l'inhibition de la signalisation des cytokines par ces deux protéines. Cependant, on peut envisager que la liaison des protéines CIS-SOCS à d'autres protéines cellulaires – qui restent à identifier – induise leur dégradation par le protéasome ■

#### Remerciements

Je remercie Isabelle Dusanter, Catherine Lacombe et Patrick Mayeux pour leurs commentaires constructifs et leurs suggestions.

## Note ajoutée aux épreuves

Depuis la soumission de cette synthèse, des articles importants, parfois contradictoires avec des observations antérieures, ont été publiés.

L'étude de souris transgéniques surexprimant *CIS* a montré que *CIS* est un inhibiteur potentiel de toutes les cytokines activant STAT5, et en particulier de l'IL-2, l'hormone de croissance et la prolactine [46]. Cependant, le rôle physiologique de *CIS* n'est pas démontré car aucun phénotype n'est associé à l'inactivation de ce gène [47].

Deux équipes ont montré que le phénotype des souris mutantes pour SOCS-1 est lié à l'hypersensibilité à l'interféron  $\gamma$  produit par les lymphocytes T activés des souris *SOCS-1<sup>-/-</sup>* [48, 49].

Il semble que SOCS-3 se lie à tous les récepteurs de cytokines activant STAT5 [46] et cette interaction inhibe efficacement l'activation des JAK en réponse à ces cytokines [50]. Les résultats les plus inattendus proviennent de l'inactivation de ce gène qui conduit à une létalité embryonnaire associée à une érythrocytose. SOCS-3 apparaît donc comme un régulateur négatif important de l'érythropoïèse fœtale [47].

## RÉFÉRENCES

1. Ward AC, van Aesch YM, Schelen AM, Touw IP. Defective internalization and sustained activation of truncated granulocyte colony-stimulating factor receptor found in severe congenital neutropenia/acute myeloid leukemia. *Blood* 1999; 93: 447-58.
2. Hunter MG, Avalos BR. Deletion of a critical internalization domain in the G-CSFR in acute myelogenous leukemia preceded by severe congenital neutropenia. *Blood* 1999; 93: 440-6.
3. Shultz LD, Schweitzer PA, Rajan TV, et al. Mutations at the murine motheaten locus are within the hematopoietic cell protein-tyrosine phosphatase (Hcph) gene. *Cell* 1993; 73: 1445-54.
4. Kozlowski M, Mlinaric-Rascan I, Feng GS, Shen R, Pawson T, Siminovitch KA. Expression and catalytic activity of the tyrosine phosphatase PTPIC is severely impaired in motheaten and viable motheaten mice. *J Exp Med* 1993; 178: 2157-63.
5. de la Chapelle A, Traskelin AL, Juvonen E. Truncated erythropoietin receptor causes dominantly inherited benign human erythrocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 4495-9.
6. Sun H, Charles CH, Lau LF, Tonks NK. MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase *in vivo*. *Cell* 1993; 75: 487-93.
7. Myers MP, Pass I, Batty IH, et al. The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 13513-8.
8. Damen JE, Liu L, Rosten P, et al. The 145-kDa protein induced to associate with Shc by multiple cytokines is an inositol tetraphosphate and phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate 5-phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 1689-93.
9. Liu B, Liao J, Rao X, et al. Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 10626-31.
10. Chung CD, Liao J, Liu B, Rao X, Jay P, Berta P, Shuai K. Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science* 1997; 278: 1803-5.
11. Vignais ML. Protéines JAK et STAT dans la transmission du signal cellulaire. *Med Sci* 1997; 13: 1277-84.
12. Yoshimura A, Ohkubo T, Kiguchi T, et al. A novel cytokine-inducible gene CIS encodes an SH2-containing protein that binds to tyrosine-phosphorylated interleukin 3 and erythropoietin receptors. *EMBO J* 1995; 14: 2816-26.
13. Matsumoto A, Masuhara M, Mitsui K, et al. CIS, a cytokine inducible SH2 protein, is a target of the JAK-STAT5 pathway and modulates STAT5 activation. *Blood* 1997; 89: 3148-54.
14. Verdier F, Rabionet R, Gouilleux F, et al. A sequence of the CIS gene promoter interacts preferentially with two associated STAT5A dimers: a distinct biochemical difference between STAT5A and STAT5B. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 5852-60.
15. Verdier F, Chrétien S, Muller O, et al. Proteasomes regulate erythropoietin receptor and STAT5 activation: possible involvement of the ubiquitinated Cis protein. *J Biol Chem* 1998; 273: 28185-90.
16. Adams TE, Hansen JA, Starr R, Nicola NA, Hilton DJ, Billestrup N. Growth hormone preferentially induces the rapid, transient expression of SOCS-3, a novel inhibitor of cytokine receptor signalling. *J Biol Chem* 1998; 273: 1285-7.
17. Starr R, Willson TA, Viney EM, et al. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 1997; 387: 917-21.
18. Naka T, Narazaki M, Hirata M, et al. Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature* 1997; 387: 924-9.
19. Endo TA, Masuhara M, Yokouchi M, et al. A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature* 1997; 387: 921-4.
20. Ohya Ki, Kajigaya S, Yamashita Y, et al. SOCS-1/JAB/SSI-1 can bind to and suppress Tec protein-tyrosine kinase. *J Biol Chem* 1997; 272: 27178-82.
21. De Sepulveda P, Okkenhaug K, Rose JL, Hawley RG, Dubreuil P, Rottapel R. Socs1 binds to multiple signalling proteins and suppresses steel factor-dependent proliferation. *EMBO J* 1999; 18: 904-15.
22. Narazaki M, Fujimoto M, Matsumoto T, et al. Three distinct domains of SSI-1/SOCS-1/JAB protein are required for its suppression of interleukin 6 signalling. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 13130-4.
23. Nicholson SE, Willson TA, Farley A, et al. Mutational analyses of the SOCS proteins suggest a dual domain requirement but distinct mechanisms for inhibition of LIF and IL-6 signal transduction. *EMBO J* 1999; 18: 375-85.
24. Yasukawa H, Misawa H, Sakamoto H, et al. The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *EMBO J* 1999; 18: 1309-20.
25. Starr R, Metcalf D, Elefanty AG, et al. Liver degeneration and lymphoid deficiencies in mice lacking suppressor of cytokine signaling-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 14395-9.
26. Naka T, Matsumoto T, Narazaki M, et al. Accelerated apoptosis of lymphocytes by augmented induction of Bax in SSI-1 (STAT-induced STAT inhibitor-1) deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 15577-82.
27. Suzuki R, Sakamoto H, Yasukawa H, et al. CIS3 and JAB have different regulatory roles in interleukin-6 mediated differentiation and STAT3 activation in M1 leukemia cells. *Oncogene* 1998; 17: 2271-8.
28. Song MM, Shuai K. The suppressor of cytokine signalling (SOCS) 1 and SOCS3 but not SOCS2 proteins inhibit interferon-mediated antiviral and antiproliferative activities. *J Biol Chem* 1998; 273: 35056-62.
29. Masuhara M, Sakamoto H, Matsumoto A, et al. Cloning and characterization of novel CIS family genes. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 239: 439-46.
30. Sakamoto H, Yasukawa H, Masuhara M, et al. A Janus kinase inhibitor, JAB, is an interferon-gamma-inducible gene and confers resistance to interferons. *Blood* 1998; 92: 1668-76.
31. Bjorbaek C, Elmquist JK, Frantz JD, Shoelson SE, Flier JS. Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Mol Cell* 1998; 1: 619-25.
32. Ito S, Ansari P, Sakatsume M, et al. Interleukin-10 inhibits expression of both interferon alpha- and interferon gamma-induced genes by suppressing tyrosine phosphorylation of STAT1. *Blood* 1999; 93: 1456-63.
33. Venkataraman C, Leung S, Salvekar A, Mano H, Schindler U. Repression of IL-4 induced gene expression by IFN-gamma requires Stat1 activation. *J Immunol* 1999; 162: 4053-61.
34. Hilton DJ, Richardson RT, Alexander WS, et al. Two proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 114-9.
35. Zhang JG, Farley A, Nicholson SE, et al. The conserved SOCS box motif in suppressors of cytokine signalling binds to elongins B and C and may couple bound proteins to proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 2071-6.

## RÉFÉRENCES

36. Kamura T, Sato S, Haque D, *et al.* The Elongin BC complex interacts with the conserved SOCS-box motif present in members of the SOCS, ras, WD-40 repeat, and ankyrin repeat families. *Genes Dev* 1998; 12: 3872-81.
37. Stebbins CE, Kaelin WG Jr, Pavletich NP. Structure of the VHL-ElonginC-ElonginB complex: implications for VHL tumor suppressor function. *Science* 1999; 284: 455-61.
38. Harper JW, Elledge SJ. Skipping into the E2F1-destruction pathway. *Nat Cell Biol* 1999; 1: E5-E7.
39. Tyers M, Willems AR. One ring to rule a superfamily of E3 ubiquitin ligases. *Science* 1999; 284: 601-4.
40. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, *et al.* The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 1999; 399: 271-5.
41. Margottin F, Bour SP, Durand H, *et al.* Novel human WD protein, h-beta TRCP, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif. *Mol Cell* 1998; 1: 565-74.
42. Yaron A, Hatzubai A, Davis M, *et al.* Identification of the receptor component of the Ikappa B alpha-ubiquitin ligase. *Nature* 1998; 396: 590-4.
43. Winston JT, Strack P, Beer-Romero P, Chu CY, Elledge SJ, Harper JW. The SCF-beta-TRCP-ubiquitin ligase complex associates specifically with phosphorylated destruction motifs in Ikappa B alpha and beta-catenin and stimulates Ikappa B alpha ubiquitination *in vitro*. *Genes Dev* 1999; 13: 270-83.
44. Spencer E, Jiang J, Chen ZJ. Signal-induced ubiquitination of Ikappa B alpha by the F-box protein Slimb/beta-TrCP. *Genes Dev* 1999; 13: 284-94.
45. Marti A, Wirbelauer C, Scheffner M, Krek W. Interaction between ubiquitin-protein ligase SCFSP2 and E2F-1 underlies the regulation of E2F-1 degradation. *Nat Cell Biol* 1999; 1: 14-9.
46. Matsumoto A, Seki Y, Kubo M, *et al.* Suppression of STAT5 functions in liver, mammary glands, and T cells in cytokine-inducible SH2-containing protein 1 transgenic mice. *Mol Cell Biol* 1999; 9: 6396-407.
47. Marine JC, McKay C, Wang D, *et al.* SOCS3 is essential in the regulation of fetal liver erythropoiesis. *Cell* 1999; 5: 617-27.
48. Alexander WS, Starr R, Fenner JE, *et al.* SOCS1 is a critical inhibitor of interferon gamma signaling and prevents the potentially fatal neonatal actions of this cytokine. *Cell* 1999; 5: 597-608.
49. Marine JC, Topham DJ, McKay C, *et al.* SOCS1 deficiency causes a lymphocyte-dependent perinatal lethality. *Cell* 1999; 5: 609-16.
50. Cohnen SJ, Sanden D, Cacalano NA, *et al.* SOCS3 is tyrosine phosphorylated in response to interleukin-2 and suppresses STAT5 phosphorylation and lymphocyte proliferation. *Mol Cell Biol* 1999; 7: 4980-8.

## TIRÉS À PART

S. Gisselbrecht.

## Summary

### The CIS-SOCS proteins: a new family of modulators of cytokine signalling

This review describes the main properties of a family of cytokine-inducible proteins. CIS (cytokine inducible SH2-containing protein) and SOCS proteins (suppressor of cytokine signalling) have two conserved regions: a SH2 domain and a new motif termed the SOCS Box, located at the C-terminus of the protein. Eight members of this family have been described: CIS and SOCS-1 to -7. Three of them: CIS, SOCS-1 and SOCS-2 have been shown to inhibit cytokine signalling. These proteins appear to interfere with the Jak/STAT transduction pathway and to negatively regulate the duration of signal activation. They also have the property to inhibit the response to a cytokine different from the one used to induce their expression (cross interference). Therefore, the CIS/SOCS family of proteins are potentially important regulators of inflammatory and immune responses, modulators of hematopoiesis and hormone response.

**B  
I  
O  
I  
N  
F  
O  
R  
M  
A  
T  
I  
Q  
U  
E**

**INSERM**  
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ  
ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE

### PROGRAMME

- Présentation de l'environnement informatique et connexion aux serveurs
- Bases de données de séquences nucléiques et protéiques (description, diffusion et mode d'interrogation)
- Traitement simple sur des séquences nucléiques et protéiques (cartes de restriction, etc.)
- Comparaison de séquences (recherche de motifs, recherche de similitude entre séquences ou avec des bases de données)
- Messagerie et transfert de fichiers

### PUBLIC

Chercheurs, Ingénieurs, Techniciens (ayant peu ou pas de pratique dans ce domaine)

### OBJECTIFS

- Acquérir les bases pour l'utilisation de l'informatique dans le domaine de la Biologie Moléculaire.

### RESPONSABLE PÉDAGOGIQUE

Christian FONDRAT

### INSCRIPTION

Dossiers à retirer auprès de votre Correspondant Formation avant le **23 décembre 1999** (date limite d'inscription)

D'autres formations pourront être organisées ultérieurement. **Nombre de participants limité à 10**

### DATES ET LIEU

Judi 20 et vendredi 21 janvier 2000 de 9 h 30 à 17 h 30

Journée questions/réponses : vendredi 4 février 2000 de 9 h 30 à 12 h 30

### SGIR (ex CITI 2)

Faculté de Médecine, 45 rue des Saints-Pères, 75006 PARIS, France  
Renseignements et inscriptions : Véronique SPRINGHETTI,  
ADR 12 PARIS VII SAINT-LAZARE, 107, rue du Faubourg-Saint-Denis  
75475 Paris Cedex 10, France. Tél. : 01 45 23 73 51 - Fax : 01 45 23 73 42  
E-mail : springhe@idf.inserm.fr