

Université de Sherbrooke

**La tyrosine phosphatase SHP-2 : un régulateur important de l'inflammation
intestinale et du cancer colorectal**

Par
Jessica Gagné Sansfaçon
Programme de Biologie cellulaire

Thèse présentée à la Faculté de Médecine et des Sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de Philosophiæ doctor (Ph.D.)
en Biologie cellulaire

Sherbrooke, Québec, Canada
Juillet 2018

Membres du jury d'évaluation

P^{re} Nathalie Rivard, Université de Sherbrooke, programme de Biologie cellulaire
Pr Claude Asselin, Université de Sherbrooke, programme de Biologie cellulaire
P^{re} Jana Stankova, Université de Sherbrooke, programme d'Immunologie
Pr Michel Tremblay, Université McGill, programme de Biochimie

© Jessica Gagné Sansfaçon, 2018

La tyrosine phosphatase SHP-2 : un régulateur important de l'inflammation et du cancer colorectal

Par Jessica Gagné Sansfaçon

SHP-2 est une protéine tyrosine phosphatase qui régularise plusieurs voies de signalisation importantes dans la cellule, notamment les voies RAS/MAP Kinase et JAK/STAT. En 2009, des polymorphismes dans le gène qui code pour SHP-2 ont été associés à une susceptibilité accrue à développer une colite ulcéreuse (CU) chez une cohorte de patients Japonais. Par la suite, notre groupe a rapporté que l'expression de SHP-2 est significativement diminuée dans la muqueuse de patients atteints de CU. Par la génération d'un modèle murin de délétion dans les cellules épithéliales intestinales (*Shp-2^{CEI-KO}*), notre groupe a établi une corrélation directe entre la baisse d'expression de SHP-2 et le développement de l'inflammation dans le côlon. Par ailleurs, les travaux de cette thèse démontrent que les souris *Shp-2^{CEI-KO}* souffrent d'une CU chronique, avec une activation soutenue de Stat3 dans les CEI. De plus, une expression élevée des interleukines 6, 17 et 23 a été observée dans la muqueuse intestinale de ces souris avec une production importante d'espèces réactives de l'oxygène par les cellules immunitaires environnantes. À long terme, cette inflammation chronique engendre une prolifération régénérative, des dommages à l'ADN et des mutations dans le gène suppresseur de tumeur *Tp53*, tous des événements associés à l'apparition d'un cancer associé à la colite (CAC) chez les souris *Shp-2^{CEI-KO}*. Par opposition, nous avons généré des souris qui expriment une forme mutante constitutive active de Shp-2 dans les CEI (*Shp-2^{CEI-E76K}*) et avons observé que ces souris sont résistantes au développement d'une colite induite par un stress chimique ou une infection bactérienne. Nos résultats montrent que l'expression d'une forme active de Shp-2 dans l'épithélium intestinal augmente fortement la production des cellules caliciformes et la sécrétion du mucus, impliqués dans la protection de la muqueuse contre l'inflammation et le développement du CAC. Étonnamment, la mutation de SHP-2 sur le résidu E76 a déjà été retrouvée chez des patients atteints du cancer colorectal (CRC) de type sporadique, suggérant un rôle oncogénique pour cette phosphatase dans l'intestin. Les travaux actuels montrent que l'expression de SHP-2 est fortement augmentée dans les tumeurs colorectales de patients, particulièrement dans les adénomes et les tumeurs de stade 1. Ensuite, l'inhibition de son expression dans des cellules humaines de CRC en culture réduit leur capacité à croître en indépendance d'ancrage et à migrer au travers d'une matrice extracellulaire. Cette inhibition de SHP-2 renverse également la transformation oncogénique des CEI en culture induite par l'oncogène KRAS^{G12V}. De manière intéressante, les souris *Shp-2^{CEI-E76K}* développent de l'hyperplasie intestinale en vieillissant et des lésions de type festonné sessile, une lésion précurseur d'adénocarcinome. L'activation de Shp-2 accentue également la formation de polypes dans le modèle murin *Apc^{Min/+}*, suggérant que l'activation de SHP-2 protège le côlon contre l'inflammation mais y promeut la tumorigenèse. En résumé, nos résultats démontrent que SHP-2 peut agir à la fois comme un oncogène dans le côlon mais aussi comme un suppresseur de tumeur en contexte inflammatoire.

Mots clés : Cancer associé à la colite, cancer colorectal, cellule caliciforme, colite ulcéreuse, inflammation, oncogène, SHP-2, RAS/MAPK.

TABLE DES MATIÈRES

I. INTRODUCTION

Chapitre 1. La muqueuse intestinale

1.1 Généralités sur l'intestin.....	1
1.2 La paroi de l'intestin	1
1.3 L'épithélium intestinal.....	3
1.3.1 Renouvellement de l'épithélium intestinal et cellules souches.....	3
1.3.2 Signaux de différenciation de l'épithélium intestinal.....	5
1.4 Fonction barrière de la muqueuse intestinale.....	7
1.4.1 Les cellules absorbantes	8
1.4.2 Les cellules de Paneth.....	9
1.4.3 Les cellules caliciformes	10

Chapitre 2. Les maladies inflammatoires intestinales

2.1 Incidence des maladies inflammatoires intestinales	11
2.2 Facteurs de risque.....	12
2.3 Les cellules de Paneth et la microflore dans les MII	12
2.4 MUC2 et la fonction barrière dans la colite ulcéreuse	14

Chapitre 3. Le cancer colorectal

3.1 Incidence du cancer colorectal.....	15
3.2 Classification et progression du cancer colorectal	16
3.3 Séquence adénome-carcinome classique.....	16
3.3.1 Les mutations de la protéine Adenomatous Polyposis Coli	17
3.3.2 L'activation oncogénique de la voie RAS/MAPK.....	20
3.3.3 Le suppresseur de tumeur TP53	23
3.4 Le cancer de type "festonné"	24
3.5 Le cancer associé à la colite	27
3.6 La microflore promeut la tumorigenèse colorectale	30

Chapitre 4. Src homology domain 2-containing tyrosine phosphatase

4.1 Généralités sur SHP-2.....	32
4.2 Signalisation intracellulaire régulée par SHP-2.....	33
4.2.1 Activation des voies Ras/MAPK et PI3K/AKT par SHP-2.....	33
4.2.2 Activation de Rho par SHP-2	35
4.2.3 Inhibition de la voie JAK/STAT par SHP-2.....	35
4.3 Les mutations du gène encodant SHP-2 et le syndrome de Noonan	36
4.4 Le proto-oncogène SHP-2	37
4.5 SHP-2 : une dualité de rôle dans le cancer hépatique.....	39
4.6 SHP-2 dans les maladies inflammatoires intestinales.....	40

4.7 SHP-2 dans le cancer colorectal	41
Chapitre 5. Le projet de recherche	
Objectif 1. Déterminer la contribution de SHP-2 dans la carcinogénèse colorectale .	42
Objectif 2. Vérifier si SHP-2 est un oncogène pour l'épithélium intestinal.....	42
Objectif 3. Évaluer le potentiel anti-inflammatoire de SHP-2 dans le côlon.....	43
II. RÉSULTATS PUBLIÉS	
Manuscrit 1: SHP-2 phosphatase contributes to KRAS-driven intestinal oncogenesis but prevents colitis-associated cancer development.	
CONTRIBUTION.....	44
RÉSUMÉ EN FRANÇAIS	46
ABSTRACT.....	47
INTRODUCTION	48
RESULTS	50
DISCUSSION.....	64
MATERIALS AND METHODS.....	70
ACKNOWLEDGMENTS	74
CONFLICTS OF INTEREST	74
GRANT SUPPORT	74
REFERENCES.....	75
III. RÉSULTATS NON PUBLIÉS	
MATÉRIEL ET MÉTHODES	81
6.1 Anticorps.....	81
6.2 Génération et génotypage des souris expérimentales	81
6.3 Induction de la colite chimique au Dextran sulfate de sodium.....	83
6.4 Induction de la colite infectieuse avec <i>Citrobacter rodentium</i>	84
6.5 Euthanasie et coupes histologiques	85
6.6 Migration <i>in vivo</i>	85
6.7 Immunohistochimie et immunofluorescence	86
6.8 Coloration à l'Alcian bleu	86
6.9 Microscopie électronique	87
6.10 Extraction des ARN messagers, transcription inverse et PCR quantitatif.....	87
6.11 Immunobuvardage.....	89
6.12 Culture cellulaire et traitement des LS174T	90
6.13 Essai luciférase	91
6.14 Stabilité de la β -caténine	91
6.15 Culture d'organoïdes.....	92
6.16 Incorporation d'EdU	93

6.17 Analyses statistiques et figures.....	93
--	----

RÉSULTATS

7.1 L'activation de SHP-2 promeut la prolifération et la migration des cellules épithéliales intestinales chez la souris.....	94
7.2 L'activation de Shp-2 dans les CEI altère la différenciation des cellules caliciformes et des cellules de Paneth dans l'épithélium intestinal.....	94
7.3 L'activation de Shp-2 promeut le développement des organoïdes de façon Mek-dépendante	99
7.4 Régulation de la voie NOTCH par les kinases MEK/ERK dans les cellules LS174T	101
7.5 L'activation soutenue de Shp-2 protège contre le développement de la colite chez la souris.....	103
7.6 Stat3 participe au développement de l'inflammation dans le côlon des souris <i>Shp-2^{CEI-KO}</i>	105
7.7 L'expression de <i>Shp-2^{E76K}</i> dans les CEI mène au développement de lésions festonnées dans l'intestin chez la souris.....	106
7.8 Les souris <i>Shp-2^{CEI-E76K}</i> ne présentent pas de signes de sénescence dans l'intestin	110
7.9 SHP-2 régule la stabilité de la β -caténine et l'expression de ses gènes cibles....	111
7.10 La phosphorylation de SHP-2 est augmentée dans les lignées cancéreuses colorectales en culture	113

IV. DISCUSSION

8.1 Rôle de SHP-2 dans la carcinogenèse colorectale	
8.1.1 L'expression de SHP-2 est augmentée dans les tumeurs colorectales précoces humaines.....	116
8.1.2 SHP-2 est-elle un oncogène dans le côlon?	118
8.1.2.1 SHP-2 est nécessaire à la transformation induite par KRAS	118
8.1.2.2 SHP-2 contribue aux propriétés tumorales des cellules cancéreuses colorectales	121
8.1.2.2.1 La baisse d'expression de SHP-2 atténue l'agressivité des cellules cancéreuses du côlon en culture	121
8.1.2.2.2 SHP-2 ^{E76K} dans la transformation des cellules cancéreuses colorectales... ..	122
8.1.2.3 L'activation de Shp-2 promeut la tumorigenèse intestinale chez la souris ...	124
8.1.2.3.1 Les souris <i>Shp-2^{CEI-E76K}</i> développent des lésions festonnées dans l'intestin	124
8.1.2.3.2 L'activation de Shp-2 accentue la polypose dans le modèle <i>Apc^{Min/+}</i>	124
8.1.3 SHP-2 est-elle aussi un suppresseur de tumeur dans le côlon?.....	125
8.1.3.1 La délétion de Shp-2 dans l'épithélium des souris <i>Apc^{Min/+}</i> stimule la tumorigenèse intestinale.....	125
8.1.3.2 Les souris invalidées pour Shp-2 développent un cancer associé à la colite	127

8.1.3.2.1 La dysbiose dans la carcinogenèse colorectale en absence de Shp-2	128
8.1.3.2.2 Implication de l'axe IL-17/IL-23 dans le CAC induit par la délétion de Shp-2	128
8.1.3.2.3 La délétion de Shp-2 induit des dommages à l'ADN	130
8.2 Rôle de SHP-2 dans la protection du côlon contre l'inflammation	
8.2.1 Les cellules sécrétrices dans le développement de la colite	131
8.2.1.1 Shp-2 régule négativement la différenciation des cellules de Paneth	131
8.2.1.2 Shp-2 favorise la maturation des cellules caliciformes.....	132
8.2.2 SHP-2/STAT3 dans la régulation de l'inflammation	133
8.2.3 La réparation de blessure.....	135
8.2.3.1 SHP-2 promeut la migration des cellules épithéliales intestinales.....	136
8.2.3.2 SHP-2 dans le maintien des cellules souches et la régénération cryptale.....	137
8.3 Rôle de SHP-2/MAPK dans le contrôle de la différenciation des cellules caliciformes.....	138
8.4 Régulation de la β -caténine par SHP-2.....	139
8.5 SHP-2 chez les patients atteints de MII et du cancer colorectal : Une approche thérapeutique potentielle ?	
8.5.1 L'inhibition de SHP-2 dans le traitement du cancer colorectal	142
8.5.2 Cibler l'activité phosphatase de SHP-2 pour limiter l'inflammation intestinale	144
V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	146
VI. REMERCIEMENTS.....	151
VII. RÉFÉRENCES	152
VIII. ANNEXE	178
Annexe 1.....	178

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION

Figure 1. Structure de la paroi intestinale et colique	2
Figure 2. La différenciation des CEI dans l'axe crypte-villosité de l'intestin grêle.....	5
Figure 3. La barrière intestinale.....	8
Figure 4. Les MII sont des pathologies multifactorielles	13
Figure 5. Modèle simplifié de la progression adénome-carcinome.....	17
Figure 6. Voie de signalisation canonique Wnt.....	18
Figure 7. La voie RAS/MAP Kinase	21
Figure 8. Le cancer associé à la colite	28
Figure 9. Conformation de la protéine tyrosine phosphatase SHP-2.....	33
Figure 10. Mutations de SHP-2 dans les cancers solides et les leucémies	37

RÉSULTATS PUBLIÉS

Figure 1 manuscript: SHP-2 expression in sporadic human colorectal tumors.....	51
Figure 2 manuscript: SHP-2 is required for oncogenic activity of KRAS ^{G12V} in intestinal epithelial cells	52
Figure 3 manuscript: SHP-2 silencing in human CRC cells inhibits growth in soft agar and invasion capacity	53
Figure 4 manuscript: SHP-2 is required for full activation of MEK/ERK signaling in cells expressing oncogenic KRAS	55
Figure 5 manuscript: Expression of activated SHP-2 ^{E76K} mutant in intestinal epithelium deregulates crypt proliferation and increases tumor multiplicity in <i>Apc</i> ^{Min/+} mice.....	57
Figure 6 manuscript: Mice with loss of epithelial SHP-2 expression develop colorectal adenocarcinomas with age.....	59
Figure 7 manuscript: Aged <i>Shp-2</i> ^{IEC-KO} mice exhibit several typical features of colitis-associated cancer	60
Figure 8 manuscript: Aged <i>Shp-2</i> ^{IEC-KO} mice exhibit increased epithelial proliferation and signs of oxidative stress in their colon.....	62
Figure 9 manuscript: IEC-specific Shp-2 ablation exacerbates tumorigenesis in <i>Apc</i> ^{Min/+} mice.....	63

RÉSULTATS NON PUBLIÉS

Figure 11. L'activation soutenue de Shp-2 dans les CEI chez la souris induit de l'hyperplasie.	95
Figure 12. Shp-2 altère la différenciation des cellules sécrétrices de l'intestin grêle.....	96
Figure 13. L'activation de Shp-2 favorise la production des cellules caliciformes et la sécrétion du mucus dans le côlon.	98
Figure 14. L'activation de Shp-2 promeut la régénération cryptale de façon Mek-dépendante.	100
Figure 15. La voie RAS/MAPK induit la différenciation des cellules caliciformes en modulant l'activation de la voie NOTCH dans les cellules déterminées LS174T. ...	102
Figure 16. L'activation de Shp-2 dans les CEI protège contre la colite chimique.	104
Figure 17. L'activation de Shp-2 dans les CEI protège contre la colite infectieuse.....	105
Figure 18. La délétion de Stat3 atténue le développement de l'inflammation en absence de Shp-2 dans le côlon des souris.....	107
Figure 19. L'activation de Shp-2 induit la formation de cryptes hyperplasiques dans le jéjunum des souris.	109
Figure 20. Des lésions festonnées traditionnelles sont présentes dans le côlon proximal chez la souris <i>Shp-2^{CEI-E76K}</i>	110
Figure 21. L'activation de Shp-2 n'est pas suffisante pour induire la sénescence dans l'épithélium intestinal chez la souris	111
Figure 22. SHP-2 régule la stabilité de la β -caténine	112
Figure 23. L'expression de SHP-2 et sa phosphorylation sur tyrosine sont augmentées dans les cellules cancéreuses colorectales en culture.....	114
Figure annexe 1. L'activation de la voie Mek/Erk dans les souris <i>Shp-2^{CEI-KO}</i> inhibe le développement de la colite et restaure la différenciation des cellules sécrétrices.	178

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Identification génétique des souris expérimentales	83
Tableau 2. Séquence des amorces utilisées pour l'amplification en PCR quantitative	88

LISTE DES ABRÉVIATIONS

- A/E *E. coli* Attaching/effacing *Escherichia coli*
- AGR2 Anterior gradient 2
- AINS Anti-inflammatoires non stéroïdiens
- AOM Axozyméthane
- AP1 Activator protein 1
- APC Adenomatous polyposis coli
- ASCL2 Achaete-Scute Complex-Like 2
- ATG16L Autophagy related 16-like 1
- ATM Ataxia telangiectasia mutated
- ATR Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein
- AURKA Aurora kinase A
- BMI1 B cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1
- BrdU Bromodeoxyuridine
- CAC Cancer associé à la colite
- CBC Cellule souche à la base de la crypte
- CDC20 Cell division cycle 20
- CDC73 Cell division cycle 73
- CEI Cellule épithéliale intestinale
- CFU Unité formatrice de colonie
- CHK1/2 Checkpoint kinase 1 et 2
- CIMP Méthylation des ilots CpG
- CIN Instabilité chromosomique
- CK1 Caséine kinase 1
- COX2 Cyclooxygenase 2
- CRC Cancer colorectal
- CSK C-terminal Src kinase
- CU Colite ulcéreuse
- D61G Acide aspartique 61 changée en glycine
- DAI Disease activity index
- DBZ Dibenzazepine
- DCLK1 Doublecortin-like kinase 1 protein
- DLL Delta-like
- DNMT3 DNA Methyltransférase 3 β
- DSS Dextran sulfate de sodium
- E76K Acide glutamique 76 lysine
- EB1 End binding 1
- EdU 5-ethynyl-2'-deoxyuridine
- EGF Epidermal growth factor
- EGFR Epidermal Growth Factor receptor
- ELK1 ETS transcription factor
- EMT Transition épithéliale mésenchymateuse

• EPHB3	Ephrin type B receptor 3
• ERK1/2	Extracellular signal regulated kinases 1 and 2
• FAK	Focal adhesion kinase
• FAP	Syndrme de polypose familiale
• FCA	Foyer de crypte aberrante
• FGF	Fibroblast Growth Factor
• FITC	Isothiocyanate de fluorescéine
• GAB1	GRB2 associated binding protein 1
• GAP	Protéines activatrices de GTPases
• GEF	Facteurs d'échange de nucléotides guanyliques
• GFI1	Growth factor independent-1
• GRB2	Growth factor receptor-bound protein 2
• Gsk3	Glycogène synthase kinase 3
• GDP/GTP	Guanosine diphosphate/Guanosine triphosphate
• HD	Human defensin
• Hes1	Hairy and enhancer of split 1
• IF	Immunofluorescence
• IFN	Interféron
• IHC	Immunohistochimie
• IL	Interleukine
• INK4	Inhibitors of CDK4
• iNOS	Inducible nitric oxide synthase
• JAK	Janus-associated kinase
• JNK	c-Jun N-terminal kinase
• KLF4	Krüppel like factor 4
• KRAS	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
• LEF	Lymphoid enhancer-binding factor
• LGR5	Leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5
• LIE	Lymphocytes intraépithéliaux
• LOH	Loss of heretozygosity
• LPS	Lipopolysaccharide
• MAML1	Mastermind Like Transcriptional Coactivator 1
• MAPK	Mitogen-activated protein kinase
• MATH1	Mouse Atonal Homolog 1
• MC	Maladie de Crohn
• MDM2	Mouse double minute 2 homolog
• MEK1/2	Mitogen-activated protein kinase kinase ½
• MET	Mesenchymal-epithelial transition
• MHC-II	Complexes d'histocompatibilité de classe-II
• MII	Maladie inflammatoire intestinale
• MIN	Multiple intestinal neoplasia
• MLH1	MutL homolog 1
• MMP	Métalloprotéinase
• MMR	Mismatch repair

• MSH2	MutS protein homolog 2
• Muc2	Mucine 2
• NFκB	Nuclear factor-kappa B
• NGN3	Neurogénine 3
• NICD	Domaine intracellulaire du récepteur NOTCH
• NOD	Nucleotide oligomerization domain-like receptor
• NOS2	Nitric oxide synthase 2
• OLMF4	Olfactoméline 4
• PDGF	Platelet-derived growth factor
• PDK1	Protéine 3-phosphoinositide-dépendante kinase-1
• PFA	Paraformaldéhyde
• PGE2	Prostaglandine E2
• PH	Pleckstrin homology domain
• PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
• PIP2	Phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate
• PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate
• PTB	Phosphotyrosine-binding domain
• PTP	Protéine tyrosine phosphatase
• PTPN11	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11
• REG3	Regenerating islet-derived 3 factor
• RELMβ	Resistin-like molecule bêta
• RHOA	Ras homolog gene family member A
• ROS	Espèces réactives de l'oxygène
• RTK	Récepteur tyrosine kinase
• SEM	Erreur standard à la moyenne
• SFK	Kinase de la famille Src
• SH-2	Src homology domain 2
• shARN	Short hairpin RNA
• SHP-2	Src homology 2 (SH2) domain-containing PTP 2
• SOS	Son of Sevenless
• SOX-9	Sry-Box 9
• SPDEF	SAM pointed domain-containing Ets transcription factor
• SPRY	Sprouty
• SSA	Adénome festonné de type sessile
• STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
• TAZ	Transcriptional coactivator with a PDZ-binding domain
• TBP	Tata-binding protein
• TCF	Transcription factor
• TFF3	Facteur en trèfle 3
• TLR	Récepteurs Toll-like
• TNBS	Trinitrobenzène sulfonique
• TNFα	Tumor necrosis factor alpha
• TSA	Adénomes festonnés traditionnels
• UEA	Ulex europaeus-I agglutinin

- VEGF Vascular endothelial growth factor
- Wnt Wingless/Int-1
- YAP Yes-associated protein
- ZO1 Zonula occludens-1

« Qui vaine sans péril, triomphe sans gloire »

-Cid de Corneille

I. INTRODUCTION

CHAPITRE 1. LA MUQUEUSE INTESTINALE

1.1 Généralités sur l'intestin

L'intestin est le lieu principal de la digestion et de l'absorption des nutriments dans le système digestif. Il se divise en deux segments distincts, soit l'intestin grêle qui fait directement suite à l'estomac et le côlon qui se termine avec l'anus. L'intestin grêle est lui-même subdivisé en trois, soit le duodénum, le jéjunum et l'iléon (Kuitunen, 1966). Dans le duodénum, le chyme provenant de l'estomac se mélange aux sucs pancréatiques et à la bile provenant du foie pour la digestion de la nourriture. Les nutriments sont ensuite absorbés dans le jéjunum, tandis que les sels biliaires et les vitamines sont majoritairement captés par les cellules absorbantes de l'iléon. Ce sont les mouvements de péristaltisme des muscles lisses de l'intestin qui assurent un transit continu du bol alimentaire vers le côlon (Collins et Bhimji, 2017). Lorsque le côlon reçoit le chyme provenant de l'intestin grêle, les cellules épithéliales en absorbent l'eau et les électrolytes, ce qui concentre la nourriture non absorbée et engendre la production des fèces. Le côlon est également le lieu de la digestion des fibres alimentaires par les bactéries. Il faut dire que la microflore est omniprésente dans tout le tube digestif, mais c'est notamment au niveau du côlon où le transit est le plus lent que l'on retrouve la microflore la plus abondante et la plus diversifiée (Collins et Bhimji, 2017).

1.2 La paroi de l'intestin

Bien que les différents segments du tube digestif aient chacun des fonctions qui leurs sont propres, la structure générale de l'axe vertical est similaire sur toute la longueur de l'intestin, comme le démontre la Figure 1. En premier lieu, on retrouve la muqueuse en contact perpétuel avec le milieu extérieur et les composantes de la lumière intestinale. Cette première couche sert à la fois aux fonctions primaires de digestion et d'absorption des nutriments et à délimiter le milieu interne du corps (Collins et Bhimji, 2017; Zhang *et al.*, 2015). La muqueuse intestinale est composée d'un épithélium monostratifié (section 1.3), d'une *lamina propria* et d'une couche musculaire lisse, la *muscularis mucosae*. Le mésenchyme de la *lamina propria* supporte les fonctions de l'épithélium et participe à la défense immunitaire.

Ce tissu conjonctif est composé de fibres de collagène et contient des vaisseaux sanguins et lymphatiques pour permettre l'entrée des nutriments en circulation. Plusieurs types cellulaires nichent au sein même du mésenchyme intestinal, tels que des fibroblastes, des myofibroblastes, des cellules musculaires lisses ainsi que diverses cellules immunitaires (Powell *et al.*, 2011). Finalement, la *muscularis mucosae* se retrouve à la base de la muqueuse et elle y est responsable des mouvements régionalisés du tissu (Collins et Bhimji, 2017).

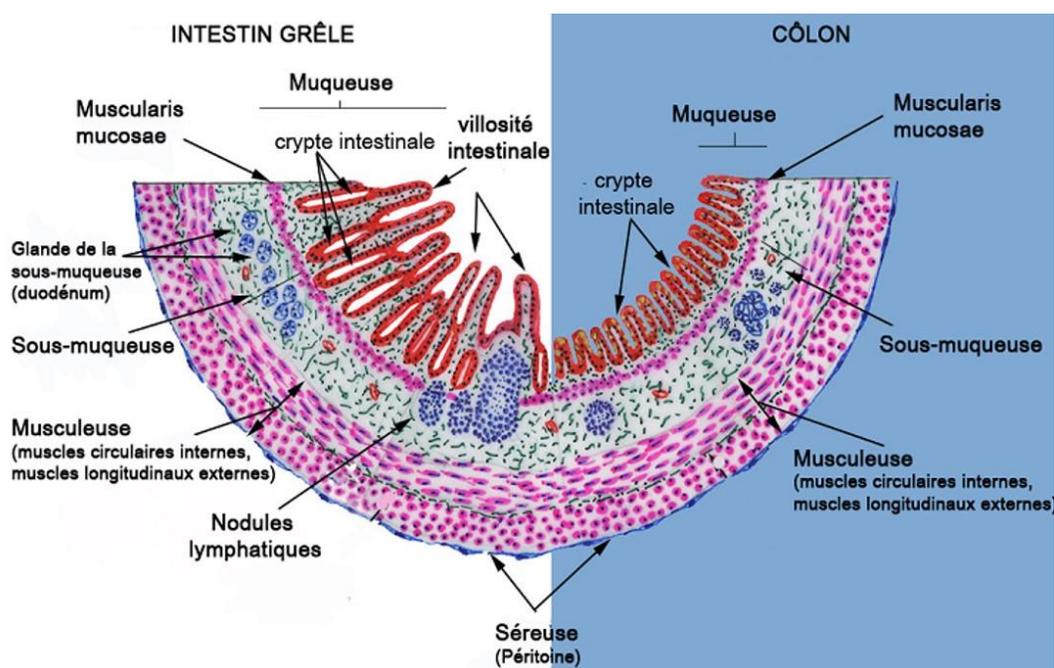


Figure 1. Structure de la paroi intestinale et colique

L'intestin se divise en deux segments principaux, l'intestin grêle (section de gauche) et le côlon (section de droite). La paroi intestinale est divisée en quatre couches, la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculeuse et la séreuse. Entre les deux premières couches, on retrouve la *muscularis mucosae* en rose. Figure adaptée de Caceci, 2008 (libre accès).

En-dessous de la muqueuse se situent trois autres couches tissulaires qui assurent le bon fonctionnement de l'intestin. D'abord, on retrouve un tissu conjonctif flexible contenant de nombreux vaisseaux sanguins ainsi qu'un réseau de neurones ganglionnaires. Ce tissu nommé sous-muqueuse supporte les fonctions de la muqueuse et permet une contraction contrôlée de la *muscularis mucosae* (Collins et Bhimji, 2017) (Figure 1). Plus en périphérie, se retrouve une succession de muscles lisses circulaires et longitudinaux responsables des

mouvements de péristaltisme dans le système digestif. Finalement, l'intestin est délimité par un tissu nommé séreuse qui fait partie du péritoine et qui maintient le tube digestif en place dans la cavité abdominale (Collins et Bhimji, 2017).

1.3 L'épithélium intestinal

Les cellules épithéliales intestinales (CEI) constituent la portion de la muqueuse en contact direct avec le milieu extérieur. Cet épithélium est monostratifié et tapisse la totalité de la paroi de l'intestin grêle et du côlon. Ce feuillet permet de délimiter le milieu interne, de contrôler l'entrée des nutriments dans le corps et procure une barrière physique de première ligne contre le contenu de la lumière intestinale, notamment les bactéries de la microflore (Crosnier *et al.*, 2006). Afin d'accroître la surface de contact avec les nutriments contenus dans le bol alimentaire, l'épithélium de l'intestin grêle adopte une morphologie fonctionnelle spécialisée, l'axe crypte-villosité (Collins et Bhimji, 2017; Crosnier *et al.*, 2006). Comme l'illustrent les Figures 1 et 2, les villosités sont comme des expansions digitiformes qui ressortent de la muqueuse et se prolongent dans la lumière. Ces structures sont bordées par des CEI et elles sont régénérées par les cryptes de Lieberkühn qui s'enfoncent dans la muqueuse, protégeant ainsi les cellules souches contre d'éventuels dommages (Cheng et Leblond, 1974). Ces structures cryptiques sont également présentes dans le côlon, toutefois les villosités y sont remplacées par un épithélium de surface plat (Figure 1). Tout comme pour l'intestin grêle, les cellules souches du côlon se situent dans une niche localisée dans le bas des cryptes (Figure 2). En se divisant, ces cellules donnent naissance aux progéniteurs ainsi qu'à quatre types principaux de cellules différenciées, soit les cellules absorbantes, les cellules caliciformes, les cellules entéroendocrines et les cellules de Paneth. Il est à noter que ces dernières sont exclusivement retrouvées dans l'intestin grêle et sont absentes du côlon en situation d'homéostasie (Crosnier *et al.*, 2006).

1.3.1 Renouvellement de l'épithélium intestinal et cellules souches

Puisque la muqueuse de l'intestin est soumise au quotidien à de nombreux stress, son épithélium doit se renouveler constamment pour éviter l'accumulation de dommages. En fait, le taux de régénération cellulaire de l'épithélium intestinal figure parmi les plus rapides du

corps humain, soit de 3 à 5 jours (Cheng et Leblond, 1974). Ce renouvellement incessant est assuré par la présence de cellules souches à la base des cryptes de Lieberkühn (Figure 2). Il existe deux populations distinctes de cellules souches dans l'intestin. D'abord, on retrouve des cellules qui se situent complètement à la base des cryptes (CBC), de façon intercalée entre les cellules de Paneth. Celles-ci se divisent rapidement et expriment de nombreux marqueurs, tels que LGR5 (Leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5), ASCL2 (Achaete-Scute Complex-Like 2) et OLFM4 (Olfactomedin 4) (Barker *et al.*, 2007; Cheng et Leblond, 1974; van der Flier *et al.*, 2009; Schuijers *et al.*, 2015). Des études de traçabilité ont révélé que les CBC sont capables de générer tous les types cellulaires de l'épithélium intestinal, au contraire des cellules souches positionnées en position +4 dans la crypte (Muñoz *et al.*, 2012; Westphalen *et al.*, 2014). Cette deuxième population de cellules souches est beaucoup moins bien caractérisée que les cellules LGR5 positives. Selon les chercheurs, les cellules en position +4 seraient dans un état de quiescence et exprimeraient les marqueurs BMI1 (B cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1) et DCLK1 (Doublecortin-like kinase 1 protein) (Li et Clevers, 2010; Sangiorgi et Capecchi, 2008; Westphalen *et al.*, 2014). Ces cellules seraient « en réserve » et s'activeraient lors de dommages aux cellules souches CBC (Yamashita *et al.*, 2014).

Les CBC peuvent se diviser de façon asynchrone afin de repeupler le compartiment souche et de donner naissance aux cellules progénitrices (Cheng et Leblond, 1974). Ces progéniteurs vont ensuite subir 4 à 5 cycles de division en suivant une progression ascendante dans la crypte (Marshman *et al.*, 2002). Au cours de cette migration, les CEI reçoivent les signaux appropriés pour engager leur processus de différenciation (section 1.3.2). Lorsqu'elles atteignent la jonction crypte-villosité, ces cellules sont pleinement différenciées et ont perdu leur potentiel de division. À l'exception des cellules de Paneth, les cellules poursuivent leur ascension dans la villosité jusqu'à en atteindre l'apex où elles finissent par être desquamées puis éliminées dans les fèces (Crosnier *et al.*, 2006). Les cellules de Paneth quant à elles, entament une migration descendante et vont se loger dans le fond de la crypte aux côtés des cellules souches. Contrairement aux cellules épithéliales de la villosité qui ont un cycle de vie d'environ 3 jours, les cellules de Paneth vivent plusieurs semaines, voire des mois dans

cette niche (Ireland *et al.*, 2005). Ce sont, à ce jour, les seules CEI différenciées à bénéficier d'une telle longévité.

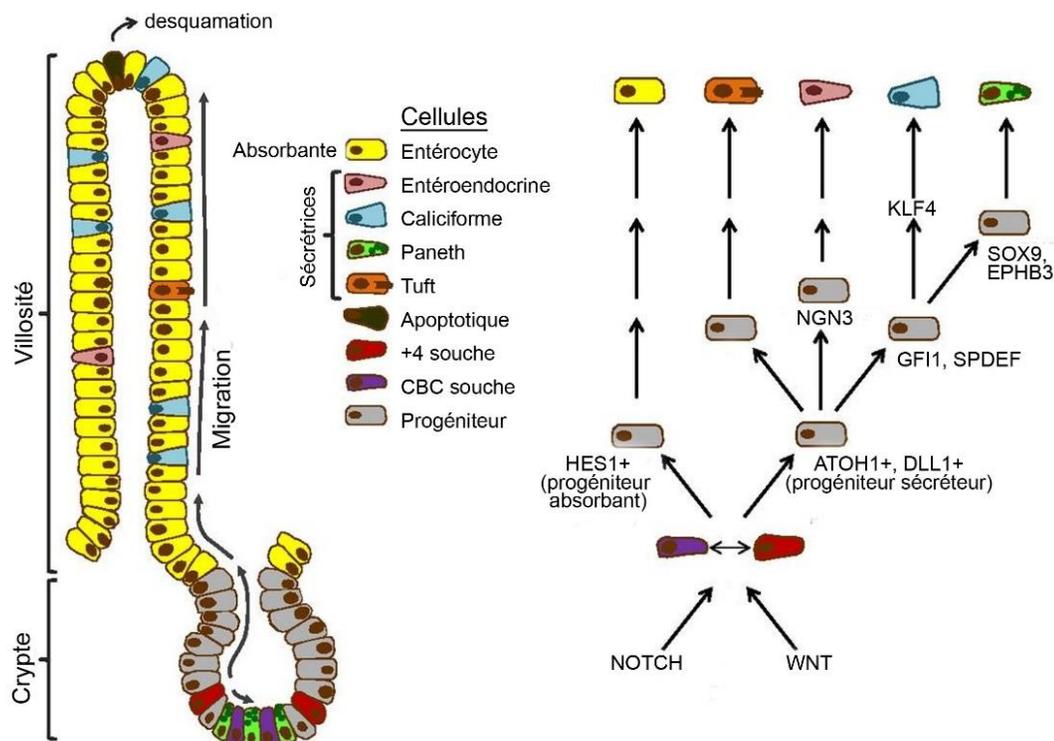


Figure 2. La différenciation des CEI dans l'axe crypte-villosité de l'intestin grêle.

Le renouvellement des CEI de l'axe crypte-villosité est assuré par la présence de cellules souches à la base des cryptes. Ces cellules produisent des progéniteurs qui se multiplient puis se différencient au cours de leur migration ascendante le long de la crypte. Les cellules de Paneth migrent plutôt vers la base de la crypte. Au cours de cette migration, différentes voies de signalisation et facteurs de transcription dictent la détermination puis la différenciation cellulaire. Figure adaptée de Aronson *et al.*, 2014 (libre accès).

1.3.2 Signaux de différenciation de l'épithélium intestinal

Les CEI différenciées sont classées en deux catégories, soit les cellules absorbantes et les cellules sécrétrices (Figure 2). La détermination des cellules progénitrices en précurseurs de type absorbant ou sécréteur se fait dans la crypte. Premièrement, les progéniteurs sont à proximité du compartiment souche, caractérisé par la présence abondante de ligands Wnt (Wingless/Int-1). Dans la niche, l'activation de la voie de signalisation Wnt/ β -catéline permet aux CBC de se diviser et d'exprimer les marqueurs LGR5 et ASCL2 (Noah *et al.*,

2011). Elle induit également la transcription de plusieurs gènes impliqués dans la différenciation cellulaire, dont DLL1 (Delta-like 1). Cette protéine transmembranaire est un ligand de la famille NOTCH (Crosnier *et al.*, 2006). Lorsque les progéniteurs sont soumis à cette signalisation juxtacrine, un phénomène d'inhibition latérale se produit. D'un côté, il y a les cellules avec une voie Wnt/ β -caténine active et qui expriment DLL1, ce qui entraîne une transduction du signal NOTCH dans les cellules voisines qui expriment alors HES1 (Hairy and enhancer of split 1). Ce répresseur transcriptionnel inhibe l'expression de MATH1 (Mouse atonal homolog 1) impliqué dans la différenciation de la lignée sécrétrice (Noah *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2001). Ainsi, les cellules HES1 positives deviennent des cellules de la lignée absorbante. Au contraire, les progéniteurs qui expriment DLL1 et MATH1 sont déterminés à se différencier en cellules sécrétrices (Tian *et al.*, 2015).

Au contraire des cellules absorbantes, la lignée sécrétrice comprend plusieurs types cellulaires. On retrouve les cellules caliciformes qui produisent du mucus, les cellules entéroendocrines qui produisent des hormones et des peptides puis, les cellules de Paneth qui sont spécialisées dans la synthèse et la sécrétion de peptides antimicrobiens. Ces trois types cellulaires proviennent du précurseur exprimant MATH1 (Yang *et al.*, 2001). Ce facteur de transcription participe à plusieurs étapes au cours de la différenciation des CEI (Figure 2). D'abord, il induit l'expression du Growth factor independent-1 (GFI1) menant à la production d'une cellule intermédiaire en cours de différenciation vers les cellules caliciformes et de Paneth (Shroyer *et al.*, 2005). MATH1 mène aussi à la transcription de la Neurogénine 3 (NGN3), impliquée dans la différenciation des cellules entéroendocrines (López-Díaz *et al.*, 2007). Ces dernières évoluent indépendamment des deux autres puisque NGN3 est inhibée par le répresseur transcriptionnel GFI1 (Shroyer *et al.*, 2005).

Les cellules intermédiaires qui mènent à la production des cellules caliciformes et de Paneth sont retrouvées tout près du compartiment souche. Elle expriment d'ailleurs des gènes cibles de la voie Wnt canonique, dont le marqueur SPDEF (SAM pointed domain-containing Ets transcription factor) (Gregorieff *et al.*, 2009). Lorsqu'exposées à un fort signal Wnt, les cellules intermédiaires produisent également les protéines SOX9 (Sry-Box 9) et

EPHB3 (Ephrin type B receptor 3), impliquées dans la différenciation terminale des cellules de Paneth (Blache *et al.*, 2004; Formeister *et al.*, 2009). Au contraire, lorsque les cellules intermédiaires migrent plus haut dans la crypte, la signalisation Wnt diminue. Elles expriment alors KLF4 (Krüppel like factor 4), responsable de la différenciation terminale des cellules caliciformes (Flandez *et al.*, 2008). Finalement, la signalisation RAS/MAPK (Mitogen-activated protein kinase) semble également impliquée dans la différenciation de ce type cellulaire. Bien que le mécanisme exact de cette régulation ne soit pas bien compris, les modèles murins exprimant des formes oncogéniques de KRas ont démontré que l'activation soutenue des kinases ERK1/2 (Extracellular signal regulated kinases) corrèle avec une augmentation du nombre de cellules caliciformes dans l'intestin des souris au détriment des cellules de Paneth (Feng *et al.*, 2011).

1.4 Fonction barrière de la muqueuse intestinale

La lumière intestinale est colonisée par plusieurs trilliards de microorganismes. Bien que certaines bactéries participent au métabolisme du corps humain, il est important de limiter leur contact avec la muqueuse et de contrôler adéquatement la réponse immunitaire pour préserver l'homéostasie (Cani et Delzenne, 2009). En ce sens, la muqueuse joue un rôle primordial dans le contrôle de la symbiose entre le microbiote et l'hôte (Figure 3). Premièrement, en plus de limiter physiquement la translocation bactérienne, les CEI sont impliquées dans la modulation de la composition de la flore et l'élimination des pathogènes. Elles peuvent également activer les cellules immunitaires résidentes de la *lamina propria* afin d'offrir une protection contre les antigènes, les microorganismes et les toxines contenus dans la lumière intestinale (Hershberg et Mayer, 2000; Hershberg *et al.*, 1997). Finalement, les cellules mésenchymateuses, telles que les fibroblastes et les myofibroblastes sont capables de présenter des antigènes aux cellules T et de moduler leur différenciation (Powell *et al.*, 2011). Ainsi, toutes les composantes de la muqueuse intestinale sont mises à contribution pour maintenir une barrière fonctionnelle contre le microbiote.

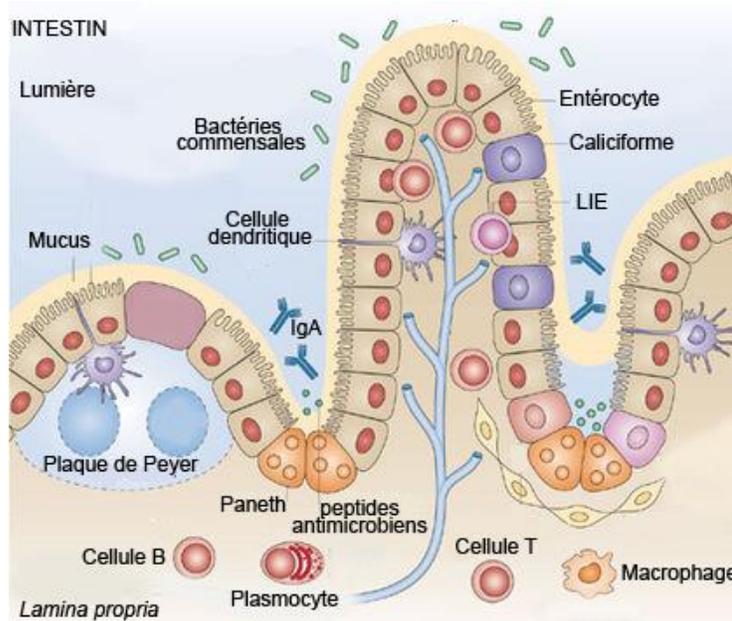


Figure 3. La barrière intestinale

Les cellules absorbantes et les cellules caliciformes procurent une barrière physique contre les bactéries de la lumière intestinale. Les cellules de Paneth sécrètent des peptides antimicrobiens pour créer une barrière chimique. La *lamina propria* renferme des cellules stromales, telles que des cellules B spécialisées dans la production de IgA ou plasmocytes, des cellules T, des cellules dendritiques, des macrophages ainsi que des lymphocytes intraépithéliaux (LIE). Figure adaptée de Abreu, 2010 (#4340910856107).

1.4.1 Les cellules absorbantes

Les entérocytes de l'intestin grêle et les colonocytes du côlon sont les cellules qui absorbent les nutriments. Elles représentent le type cellulaire majoritaire de l'épithélium intestinal. Ces cellules sont cylindriques et polarisées, possédant à leur pôle apical une bordure en brosse formée de microvillosités (Figure 3) (Crawley *et al.*, 2014; Noah *et al.*, 2011). Ces structures permettent d'accroître leur surface de contact avec la nourriture et sont riches en enzymes digestives et en protéines impliquées dans l'absorption des nutriments (Ferraris *et al.*, 1992; Siddiqi *et al.*, 2001). Au-delà de leurs fonctions primaires, les cellules absorbantes jouent un rôle clé dans la défense contre les bactéries de la lumière intestinale (Verecke *et al.*, 2011). Premièrement, elles forment un complexe apical de jonctions, composé des jonctions adhérentes, des jonctions serrées et des desmosomes. Ce réseau jonctionnel permet d'unir les CEI entre elles et de sceller l'espace intercellulaire entre les membranes plasmiques, empêchant ainsi la translocation bactérienne (Laukoetter *et al.*, 2006; Liang et Weber, 2014).

Les cellules absorbantes possèdent aussi du glycocalyx à la surface de leurs microvillosités afin de garder les bactéries à distance (Okumura et Takeda, 2017). Ce contact direct avec la microflore leur permet de sonder la composition du contenu luminal et de participer activement à la tolérance à la nourriture et aux antigènes. Pour ce faire, elles expriment des récepteurs TLRs (Toll-like) et NOD (nucleotide oligomerization domain-like receptor) (Miron et Cristea, 2012). La reconnaissance de structures bactériennes par ces familles de récepteurs convergent vers des mécanismes pro-inflammatoires et la production de chimiokines/cytokines (van Heel, 2006; Okumura et Takeda, 2017). Finalement, grâce aux complexes d'histocompatibilité de classe-II (MHC-II) qu'elles possèdent, les cellules absorbantes peuvent présenter des antigènes aux cellules de la *lamina propria* afin de les informer de la présence d'un pathogène dans la lumière (Hershberg et Mayer, 2000; Hershberg *et al.*, 1997).

1.4.2 Les cellules de Paneth

Les cellules de Paneth sont localisées à la base des cryptes de l'intestin grêle et leur population croît du duodénum jusqu'à l'iléon, puis cesse dans le côlon (Noah *et al.*, 2011). De par leur position, les facteurs de croissance et les ligands Wnt3 produits par ces cellules influencent directement le compartiment souche. Des études ont d'ailleurs révélé que leur délétion provoque une perte des cellules souches LGR5 positives *in vivo* (Sato *et al.*, 2011). En dehors de leur implication dans le maintien des cellules souches, les cellules de Paneth participent à la défense chimique de la muqueuse en sécrétant des composés antimicrobiens dans la lumière intestinale. Ces produits ont la capacité de se lier à l'hydrogel de mucus, ce qui accroît la durée du contact et procure une plus grande proximité avec la microflore (Ouellette, 2011). Parmi les peptides produits par les cellules de Paneth, on retrouve des hydrolases, tels que le lysozyme et la phospholipase A, ainsi que les facteurs Reg3 (Regenerating islet-derived 3 factor) qui s'attaquent spécifiquement aux bactéries Gram positives (Okumura et Takeda, 2017; Short *et al.*, 1996). Leur production et leur sécrétion sont des processus dynamiques étroitement liés à la composition du microbiote et régulés par la signalisation en aval des récepteurs TLR4 et NOD2 (Ayabe *et al.*, 2000; Kobayashi *et al.*, 2005; Vaishnava *et al.*, 2011). Ainsi, lorsqu'elles sont exposées à des antigènes bactériens, les cellules de Paneth sécrètent des composés antimicrobiens, comme les α -défensines qui

s'attaquent aux membranes des bactéries, des champignons et de certains virus enveloppés (Salzman, 2010). De cette façon, les cellules de Paneth sont responsables de moduler la composition du microbiote et d'en éliminer les pathogènes.

1.4.3 Les cellules caliciformes

Les cellules caliciformes constituent le type cellulaire prédominant de la lignée sécrétrice. Leur fonction primaire est de produire le mucus pour la protection physique et mécanique de la muqueuse (Noah *et al.*, 2011). Il existe deux classes de mucines, les principales protéines du mucus, soit les mucines transmembranaires 1, 3 et 4 ainsi que les mucines sécrétées, les mucines 2 et 5B (Gaudier et Hoebler, 2006; Porchet et Aubert, 2004). Malgré ce large éventail, le mucus intestinal est majoritairement composé de la mucine 2 (Muc2) chez la souris (Johansson *et al.*, 2013). Les mucines subissent de nombreuses modifications post-traductionnelles, telles que l'ajout de groupements sulfates qui leur procure des charges négatives et leur permet de limiter l'accès des bactéries à l'épithélium (Gaudier et Hoebler, 2006). De plus, la glycosylation des protéines formant le mucus est essentielle pour leur assemblage en oligomères. Dans l'intestin, les mucines s'assemblent en un vaste réseau à la surface de la muqueuse, telle une pellicule protectrice, qui peut atteindre une épaisseur de 50 μM (Johansson *et al.*, 2013; Porchet et Aubert, 2004). Dans le côlon, les microorganismes étant plus abondants que dans l'intestin grêle, ce film de mucus y est beaucoup plus dense et ne laisse pas pénétrer les bactéries. On y retrouve également une seconde couche de mucus afin d'assurer une protection accrue contre la microflore et le bol alimentaire. Contrairement à la précédente, cette couche extérieure plus lâche est colonisée par un large éventail de microbes (Johansson *et al.*, 2008, 2011).

En condition normale, bien que les modifications post-traductionnelles augmentent leur résistance, les mucines sont dégradées par les protéases bactériennes qui les utilisent comme source de carbone. Le mouvement des fèces favorise également l'élimination du mucus intestinal. Ainsi, les cellules caliciformes doivent sécréter en continu une petite quantité de mucus (Verdugo, 1990). Pour répondre rapidement à cette demande, elles emmagasinent des vésicules de mucines à leur pôle apical. En conditions pathologiques ou en réponse à un fort

stimulus, l'exocytose des vésicules peut être accélérée pour accroître la protection et favoriser l'élimination des bactéries (Birchenough *et al.*, 2015; Johansson *et al.*, 2013). Outre les mucines, les cellules caliciformes produisent d'autres médiateurs impliqués dans la défense antimicrobienne. Selon la littérature, le facteur en trèfle TFF3 qu'elles libèrent joue un rôle à la fois dans la stabilisation du mucus et dans la réparation de l'épithélium suite à des blessures. De son côté, la protéine RELM- β (Resistin-like molecule) influence la réponse immunitaire des cellules T CD4⁺ de la *lamina propria* (Artis *et al.*, 2004; Nair *et al.*, 2008). Ainsi, les cellules caliciformes assurent des fonctions primordiales dans le maintien de l'homéostasie intestinale et leur dérégulation est étroitement liée aux pathologies digestives (Chapitre 2 et 3).

CHAPITRE 2. LES MALADIES INFLAMMATOIRES INTESTINALES

2.1 Incidence des maladies inflammatoires intestinales

Les maladies inflammatoires intestinales (MII) représentent un groupe de pathologies caractérisé par une inflammation chronique du tube digestif. Au niveau de l'intestin, l'inflammation chronique nuit aux fonctions de digestion et d'absorption des nutriments en plus d'engendrer d'importantes douleurs, de la diarrhée et des saignements chez les personnes qui en sont atteintes. Malheureusement, le Canada a un taux de prévalence des MII parmi les plus élevés au monde (Ng *et al.*, 2017). Les MII peuvent se développer chez l'enfant et les jeunes adultes puis se poursuivre tout au long de la vie, puisqu'il n'existe aucun traitement pour les guérir. On retrouve deux pathologies majoritaires, soit la maladie de Crohn (MC) et la colite ulcéreuse (CU) (Xavier et Podolsky, 2007). Dans le premier cas, l'inflammation a lieu dans n'importe quelle partie du système digestif, de la bouche à l'anus, mais l'iléon est le plus souvent atteint. L'inflammation est sévère, s'attaque à toutes les couches de la paroi intestinale et peut même affecter les tissus périphériques. En ce qui concerne la CU, l'inflammation chronique débute à l'anus puis progresse dans la muqueuse et la sous-muqueuse du côlon (Kaser *et al.*, 2010).

2.2 Facteurs de risque

Les MII se développent chez des patients ayant une susceptibilité génétique. Récemment, des études effectuées sur le génome ont permis d'identifier 230 locus indépendants pour les MII (Cho et Brant, 2011; Kaser *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2015; Loddo et Romano, 2015). L'analyse des gènes spécifiquement modulés suggèrent que la MC est plutôt attribuée à des défauts dans l'autophagie, l'élimination bactérienne et le système immunitaire inné, tandis que la CU serait associée à des défauts dans la fonction barrière de l'épithélium colique (Deretic, 2009; Pastorelli *et al.*, 2013). En plus de la susceptibilité génétique, les MII se développent suite à une combinaison de facteurs de risque, tels que des altérations du microbiote intestinal, des facteurs environnementaux et un système immunitaire dérégulé (Figure 4) (Kaser *et al.*, 2010). Parmi les facteurs environnementaux, on retrouve entre autre l'alimentation riche en sucre et en gras, le tabagisme et l'utilisation de contraceptifs oraux (Molodecky et Kaplan, 2010). Ceux-ci perturbent la composition de la microflore intestinale qui participe à l'activation du système immunitaire. Ainsi, les MII sont des maladies multifactorielles qui découlent des interactions entre l'hôte et son environnement.

2.3 Les cellules de Paneth et la microflore dans les MII

Comme il a été mentionné précédemment, les cellules de Paneth de l'intestin grêle sont capables de moduler la composition de la microflore et d'en éliminer les pathogènes (Salzman, 2010). En situation pathologique, comme pour les MII, il arrive que les cellules de Paneth se retrouvent à des endroits où elles sont normalement absentes. On parle alors de métaplasie des cellules de Paneth. En plus d'avoir cette altération dans le côlon, les patients atteints de MC et de CU présentent généralement une hyperplasie des cellules de Paneth dans l'intestin grêle, soit une augmentation de leur nombre dans la crypte (Simmonds *et al.*, 2014; M. Tanaka *et al.*, 2001). Paradoxalement, chez les patients atteints de MC et qui ont une mutation du récepteur NOD2, la production des peptides antimicrobiens est fortement réduite bien que le nombre de cellules de Paneth soit augmenté, ce qui diminue la capacité de l'hôte à éliminer les bactéries pathogènes (Ogura *et al.*, 2001; Wehkamp *et al.*, 2009). D'autres anomalies génétiques sont associées à des défauts dans la fonctionnalité des cellules de Paneth, telles que les mutations d'*ATG16L* (Autophagy related 16-like 1), impliquée dans le processus d'autophagie (Adolph *et al.*, 2013; Naser *et al.*, 2012). Des études *in vivo* ont

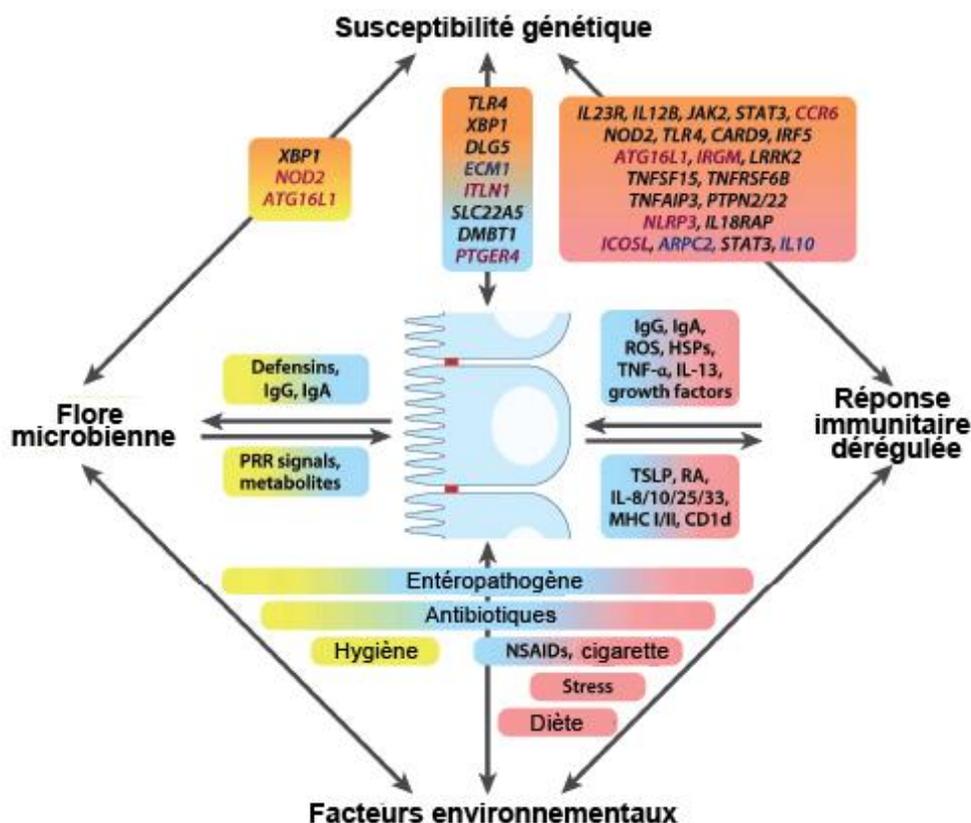


Figure 4. Les MII sont des pathologies multifactorielles

Le développement des MII est influencé par de nombreux facteurs incluant la susceptibilité génétique, le microbiote intestinal, des facteurs environnementaux et le système immunitaire de l'hôte. Les gènes et les mécanismes impliqués sont représentés avec leurs facteurs de risque respectifs. En noir, les gènes communs à la maladie de Crohn et à la colite ulcéreuse. Figure adaptée de Kaser *et al.* 2010 (#4367741378415).

démonstré que les cellules de Paneth qui présentent un défaut d'autophagie ont peu de granules de sécrétion et un contenu en peptides antimicrobiens limité. De plus, l'exocytose des granules est défectueux dans ces cellules (Cadwell *et al.*, 2009). Finalement, les cellules de Paneth déficientes en *Atg16l1* expriment plutôt des gènes impliqués dans l'inflammation, telle que la leptine et l'adiponectine, deux transcrits également augmentés chez les patients atteints de MC (Cadwell *et al.*, 2009).

De façon intéressante, la microflore retrouvée chez les patients atteints de MII est nettement différente des sujets sains. Bien que cette modulation soit variable d'un patient à l'autre, un

des changements le plus fréquemment observé au cours des MII est une réduction de l'abondance et de la diversité des *Firmicutes* et des *Bacteroidetes* (Frank *et al.*, 2007). Une augmentation des bactéries pathogènes du phylum *Proteobacteria* a également été associée au développement de l'inflammation intestinale, avec une prépondérance pour la famille des *Enterobacteriaceae* (Darfeuille-Michaud *et al.*, 1998; Mukhopadhyaya *et al.*, 2012). Cette microflore est beaucoup plus inflammatoire que celle retrouvée chez les individus sains et est impliquée dans le développement des MII.

2.4 MUC2 et la fonction barrière dans la colite ulcéreuse

La sécrétion de mucus par les cellules caliciformes est un élément clé de la barrière intestinale. Ce n'est donc pas surprenant qu'un défaut dans la biosynthèse de MUC2 a été observé chez les patients souffrant de CU dans des phases actives de la maladie (Dorofeyev *et al.*, 2013; Tytgat *et al.*, 1996). Des études réalisées chez la souris ont démontré que la délétion du gène *Muc2* mène au développement d'une inflammation du côlon typique de la CU (Van der Sluis *et al.*, 2006). De manière intéressante, les souris hétérozygotes *Muc2*^{+/-} soumises à un traitement au Dextran sulfate de sodium (DSS) développent une colite expérimentale plus sévère en comparaison aux souris de type sauvage, ce qui suggère qu'une simple diminution dans la production du mucus altère suffisamment la fonction barrière pour engendrer une susceptibilité accrue à développer une CU (Van der Sluis *et al.*, 2006). De plus, la réduction du mucus engendre une modulation de la composition des bactéries commensales de la flore chez les souris *Muc2*^{-/-}, comme il a été répertorié chez les patients atteints de MII (Bergstrom *et al.*, 2010; Hold *et al.*, 2014). Ces bactéries sont en contact direct avec les CEI chez les souris en absence de *Muc2*, entraînant une accumulation de neutrophiles, de cellules T et de macrophages dans la muqueuse (Wenzel *et al.*, 2014).

Chez les individus sains, une infection avec un pathogène mène à une sécrétion accrue de mucines dans la lumière intestinale. Dans certains cas, les cellules caliciformes se vident complètement et on note une absence du marquage à l'Alcian bleu dans l'épithélium colique (Johansson *et al.*, 2013; Mundy *et al.*, 2005). Chez les patients qui ont une diminution de la biosynthèse des mucines comme pour les patients atteints de CU, l'attachement et l'invasion

des bactéries dans la muqueuse sont fortement augmentés (Dorofeyev *et al.*, 2013). Pour étudier le rôle du mucus dans la résistance aux pathogènes, les auteurs ont infecté les souris *Muc2^{-/-}* avec *Citrobacter rodentium*, un pathogène murin similaire aux souches adhérentes et invasives (A/E) de *E. coli* responsables de recto-colites hémorragiques chez l'humain (Mundy *et al.*, 2005). Suite à l'inoculation avec *C. rodentium*, les souris *Muc2^{-/-}* ont développé une charge bactérienne jusqu'à 100 fois plus importante que les souris de type sauvage et ont perdu du poids de façon très rapide, en plus de présenter un taux de mortalité anormalement élevé de 90%. Ces souris ne sont donc pas capables d'éliminer le pathogène et de reconstruire une bicouche fonctionnelle tandis que les souris de type sauvage sont capables de se rétablir au bout de quelques semaines (Bergstrom *et al.*, 2010). Ainsi, la production de la mucine 2 par les cellules caliciformes est un événement critique pour la protection de la muqueuse du côlon contre le développement d'une colite infectieuse.

CHAPITRE 3. LE CANCER COLORECTAL

3.1 Incidence du cancer colorectal

Le cancer colorectal (CRC) est un fléau à l'échelle mondiale puisqu'il se situe au troisième rang des cancers les plus fréquents et des plus meurtriers dans les pays développés (Maida *et al.*, 2017). Ceci n'est pas étonnant puisque plusieurs habitudes de vie occidentale comptent parmi les facteurs de risque du CRC, tels que la sédentarité, le tabagisme, la consommation d'alcool, l'obésité, le diabète et la consommation importante de viande rouge et d'aliments transformés (Hughes *et al.*, 2017). Bien que l'incidence du CRC tende à diminuer depuis la dernière décennie en Amérique du Nord, le taux de mortalité associé à cette pathologie est encore très élevé. Seulement au Canada, 26 100 patients ont été diagnostiqués avec un CRC en 2016 et environ 9 300 d'entre eux en sont morts. Cette maladie est par conséquent associée à 12% de tous les décès par cancer au pays (Statistiques Canada). Ce taux de mortalité élevé est étroitement lié aux lacunes dans le dépistage précoce du CRC, souvent diagnostiqué à des stades tardifs et métastatiques. De plus, cette maladie coûte des milliards de dollars à la société pour les coûts d'hospitalisation, de traitements et de suivis des patients (Recio-Boiles et Cagir, 2017).

3.2 Classification et progression du cancer colorectal

Le CRC est une maladie complexe qui se subdivise en plusieurs sous-types. La vaste majorité des tumeurs colorectales sont de type adénocarcinome et elles prennent naissance au niveau des cellules de la crypte (Section 3.3) (Fearon et Vogelstein, 1990). Bien que le CRC puisse être d'origine héréditaire comme chez les personnes atteintes de la maladie de Lynch ou du syndrome de polypose familiale (FAP), plus de 60% d'entre eux sont d'origine sporadique (Recio-Boiles et Cagir, 2017). Il existe également des formes moins fréquentes du CRC qui ne suivent pas les étapes de progression classique. C'est le cas pour les tumeurs de type festonné (Section 3.4) qui se développent spécifiquement chez des patients porteurs de mutations *BRAF* et du cancer-associé à la colite (CAC) (Section 3.5) qui apparaît chez certains patients atteints de MII (Grivennikov, 2013; Patai *et al.*, 2013).

Les tumeurs colorectales sont classifiées en fonction de leur état de progression. En général, plus le numéro du stade est élevé, plus le cancer s'est propagé. Ainsi, au stade 0 la tumeur est dite *in situ* et strictement limitée à la muqueuse. Au stade 1 et 2, les cellules tumorales ont atteint les différentes couches musculaires et le péritoine qui entourent l'intestin. Finalement, les tumeurs sont dites de stade 3 si elles ont envahi les ganglions lymphatiques périphériques et de stade 4 si des métastases sont présentes à des sites distants de la tumeur primaire (Canadian Cancer Society). Chacun des stades du CRC peut être subdivisé en fonction de la classification TNM, prenant en considération les couches tissulaires atteintes (T0 : aucune tumeur primitive, T1 : muqueuse et *lamina propria*, T2 : musculuse, T3 : séreuse/péritoine, T4 : autres tissus/perforation du péritoine), le nombre de ganglions atteints (N) et le nombre de site métastatique (M) (« Stages of colorectal cancer - Canadian Cancer Society », s. d.).

3.3 Séquence adénome-carcinome classique

Le CRC se développe généralement selon une séquence de progression linéaire. Cette séquence adénome-carcinome décrite par Fearon et Vogelstein en 1990 stipule que les tumeurs colorectales proviennent d'une expansion clonale de cellules ayant accumulé des mutations génétiques (Figure 5). Ces altérations surviennent généralement dans des régions chromosomiques et génomiques instables, menant à l'inactivation de gènes suppresseurs de

tumeur tels qu'*APC* (*Adenomatous polyposis coli*), *SMAD4* et *TP53* ainsi qu'à l'activation de proto-oncogènes tel que *KRAS* (v-Ki-Ras2 Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog) (Walther *et al.*, 2009). Des mutations sont également répertoriées dans les mécanismes de réparation de l'ADN, dont les protéines MLH1 (MutL homolog 1), MSH2 (MutS protein homolog 2) et le complexe MMR (Mismatch repair) (Powell *et al.*, 1992; Recio-Boiles et Cagir, 2017; Walther *et al.*, 2009). La progression de l'adénome bénin vers l'adénocarcinome survient lorsque des mutations s'accumulent dans un minimum de 4 à 5 gènes, conférant ainsi aux CEI un potentiel accru de prolifération, de survie et de migration (Fearon et Vogelstein, 1990).

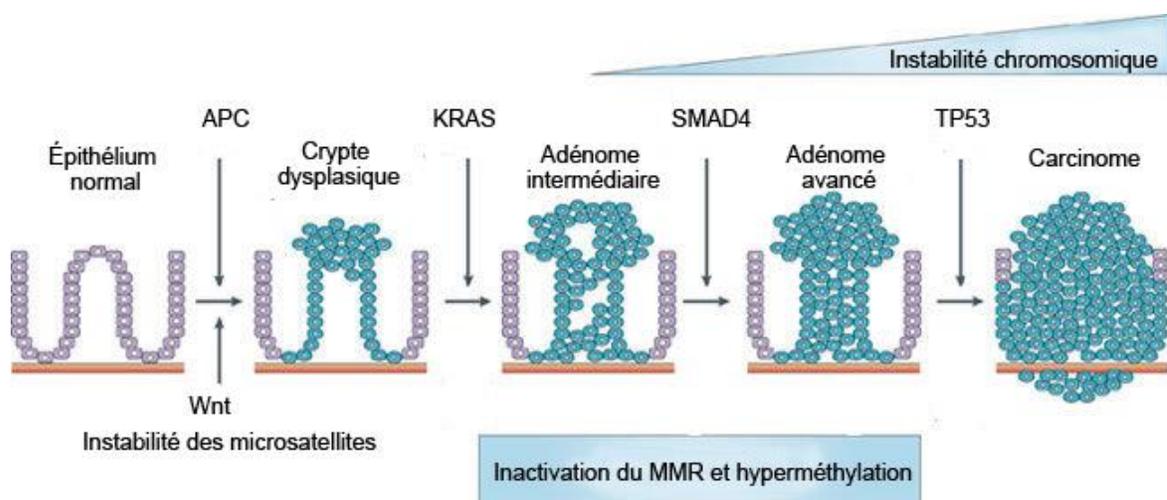


Figure 5. Modèle simplifié de la progression adénome-carcinome

L'étape initiale de la tumorigenèse est la formation d'adénome associée à la perte de fonction d'*APC*. La progression tumorale se poursuit avec l'acquisition de mutation oncogénique de *KRAS*, suivie d'une délétion de *SMAD4*. Finalement, les carcinomes sont caractérisés par une inactivation du suppresseur du tumeur *TP53* et des mécanismes de réparation de l'ADN en plus de l'instabilité chromosomique. Figure adaptée de Walther *et al.*, 2009 (#4340921471207).

3.3.1 Les mutations de la protéine Adenomatous Polyposis Coli

La protéine APC est un régulateur clé de la signalisation canonique Wnt puisqu'elle est responsable de la formation du complexe de destruction de la β -caténine (Figure 6) (Kikuchi, 2000). Des mutations inactivatrices dans le gène suppresseur de tumeur *APC* sont retrouvées dans plus de 60% des CRC. Lorsqu'*APC* n'est pas muté, on retrouve fréquemment des mutations dans les gènes encodant la β -caténine (*CTNNB1*) ou l'AXINE 2 (Powell *et al.*,

1992). Dans tous les cas, cela interfère avec les mécanismes de dégradation de la β -caténine, qui s'accumule et transloque au noyau. Lorsqu'elle s'associe à TCF/LEF (Transcription factor/Lymphoid enhancer-binding factor), la β -caténine participe à la transcription de gènes encodant des protéines impliquées dans la progression du cycle cellulaire et la survie telles que *CD44*, *CYCLINE D1* et *MYC* (He *et al.*, 1998; Korinek *et al.*, 1997; Shtutman *et al.*, 1999; Wielenga *et al.*, 1999). Dans le CRC, les mutations des effecteurs de la voie Wnt/ β -caténine sont fréquemment associées à l'initiation de la tumorigenèse, puisqu'elles favorisent une expansion du compartiment souche et une inhibition de la différenciation cellulaire. Dans les stades plus avancés de la pathologie, l'activation de la β -caténine et de ses gènes cibles est aussi associée à une progression tumorale, au potentiel d'invasion et à la formation de métastases (Brabletz *et al.*, 1999; Crawford *et al.*, 1999; Mann *et al.*, 1999).

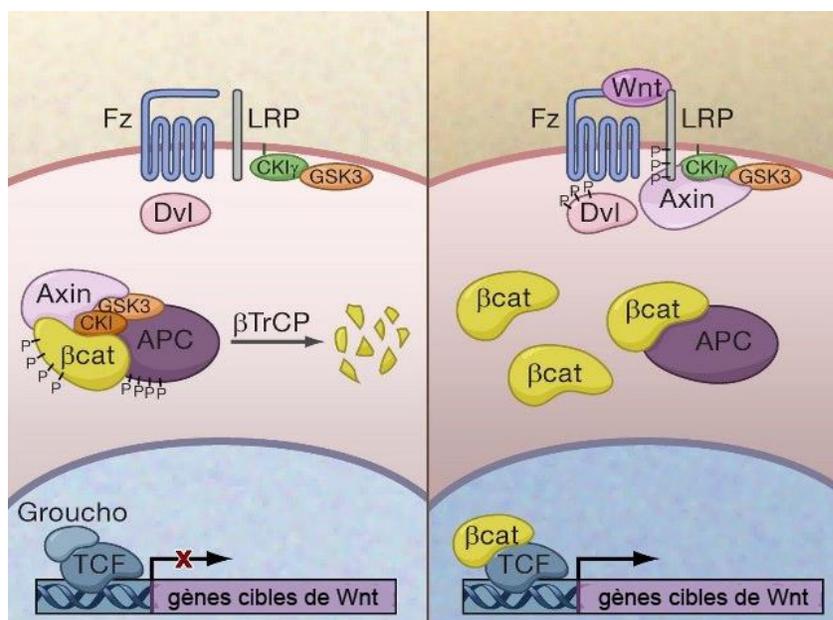


Figure 6. Voie de signalisation canonique Wnt

En absence de facteurs Wnt, la β -caténine est soit liée aux jonctions adhérentes ou séquestrée dans un complexe formé des protéines APC, AXINE, Caséine kinase 1 (CK1) et Glycogène synthase kinase 3 (GSK3 β). La β -caténine est alors phosphorylée, puis dégradée par le protéasome. Lorsque le récepteur Frizzled/LRP5/6 se lie aux facteurs Wnt, l'AXINE est recrutée au complexe récepteur, ce qui libère la β -caténine qui s'accumule et transloque au noyau. Sa liaison avec des facteurs de transcription de la famille TCF permet la formation d'un complexe actif qui stimule la transcription de différents gènes cibles. Figure adaptée de Clevers, 2006 (#4340930096194).

En plus de leur impact sur la voie canonique Wnt, les mutations d'*APC* favorisent aussi l'instabilité chromosomique (CIN) nécessaire à la progression du CRC. En condition normale, l'association de la portion C-terminale d'*APC* avec les microtubules lui permet de participer à la ségrégation des chromosomes, d'influencer l'adhésion et de participer à la migration cellulaire (Munemitsu *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1994). Au cours de la mitose, cette protéine co-localise avec les kinétochores en s'associant avec la protéine EB1 (End binding 1) (Kaplan *et al.*, 2001). Cette interaction est essentielle pour la liaison des chromosomes aux microtubules du fuseau mitotique puisque ce phénomène est défectueux dans les cellules mutées pour *APC*. Ces cellules deviennent alors aneuploïdes à la suite d'une non-disjonction des chromosomes en anaphase. De plus, un nombre anormal de centrosomes et de pôles mitotiques sont retrouvés en mitose dans les cellules mutées pour *APC*, ce qui engendre l'apparition de forces multidirectionnelles, favorisant les cassures et les réarrangements chromosomiques (Doxsey, 1998; Fodde *et al.*, 2001). Ainsi, les mutations d'*APC* engendrent à la fois l'activation de la voie canonique Wnt et l'instabilité génomique impliquées dans le développement du CRC (Cottrell *et al.*, 1992; Fodde, 2002).

De nombreux modèles animaux ont été générés afin de mieux comprendre l'implication des différentes mutations d'*APC* dans le CRC. Un des modèles le plus fréquemment employé est la souris *Apc*^{Min/+}, Min pour Multiple Intestinal Neoplasia. Comme leur nom l'indique, ces souris développent de multiples tumeurs dans l'intestin grêle et quelques-unes au niveau du côlon (Moser *et al.*, 1990, 1995). Ces adénomes sont majoritairement bénins, mais on note quand même la présence de quelques adénocarcinomes non invasifs (Oshima *et al.*, 1995). Des études plus approfondies ont démontré que ces souris sont porteuses de la mutation T2549A. Cette substitution d'acide aminé induit le remplacement d'une leucine par un codon stop, menant ainsi à la formation d'une protéine Apc tronquée (Su *et al.*, 1992). Puisque cette mutation impacte directement le rôle d'Apc dans sa régulation de la voie Wnt, il est impossible de maintenir son expression de façon homozygote à cause de défauts importants au cours de l'embryogenèse (Moser *et al.*, 1995). Les souris naissent donc hétérozygotes et ce sont des événements génétiques subséquents qui favorisent la perte de l'allèle sauvage d'*Apc* pour supporter la formation de microadénomes. Cette perte d'hétérozygotie (LOH; loss of heterozygosity) est le résultat d'une instabilité chromosomique, elle-même influencée

par la présence d'un allèle muté d'*Apc*. D'autres modèles sont très similaires aux souris *Apc*^{Min/+}, telles que les souris *Apc*^{delta716} et *Apc*^{delta14} (Calcagno *et al.*, 2008; Oshima *et al.*, 1995). L'utilisation de ces modèles a permis de mieux comprendre le rôle de certains gènes dans l'initiation et la progression du cancer colorectal.

3.3.2 L'activation oncogénique de la voie RAS/MAPK

Un oncogène est un gène dont la surexpression ou l'hyperactivation favorise le développement d'une tumeur. Certains gènes sont plus propices à promouvoir la tumorigenèse, comme c'est le cas pour *KRAS* qui est l'oncogène plus fréquent dans tous les cancers chez l'humain (Jančík *et al.*, 2010). De façon intéressante, des études épidémiologiques ont révélé que des formes oncogéniques de *KRAS* sont exprimées chez près de 50% des patients atteints du CRC, touchant le plus souvent les codons 12 et 13 (Brink *et al.*, 2003; Dinu *et al.*, 2014). De plus, environ 10% des tumeurs du côlon démontrent une activation constitutive de la kinase *BRAF* avec une prépondérance pour la substitution de la valine 600 en acide glutamique (V600E) (Barras, 2015; Leslie *et al.*, 2002). L'expression des oncogènes *KRAS* et *BRAF* entraîne l'activation des kinases en aval, *MEK1/2* (MAPK kinase) et *ERK1/2*, indépendamment d'une stimulation externe par des facteurs de croissance (Figure 7). Cette voie de signalisation peut également être modulée par une expression accrue de certains récepteurs tyrosines kinases (RTKs), tel que le récepteur EGFR (Epidermal Growth Factor receptor) dont le gène subit des duplications au cours de la carcinogénèse colorectale (Cappuzzo *et al.*, 2008; Ito *et al.*, 1990). Toutes ces mutations ont le même effet, soit la phosphorylation subséquente et soutenue des kinases ERK. Lorsqu'elles sont présentes au noyau, les kinases *ERK1/2* phosphorylent de nombreux facteurs de transcription comme *ELK1* (ETS transcription factor), *C-MYC* et *FRA-1* (Urosevic *et al.*, 2014; Yordy et Muisse-Helmericks, 2000). Ces facteurs sont impliqués dans des processus soutenant la progression du cycle cellulaire, la migration et la survie, ce qui avantage les cellules cancéreuses dans l'acquisition des propriétés prolifératives et d'un potentiel invasif.

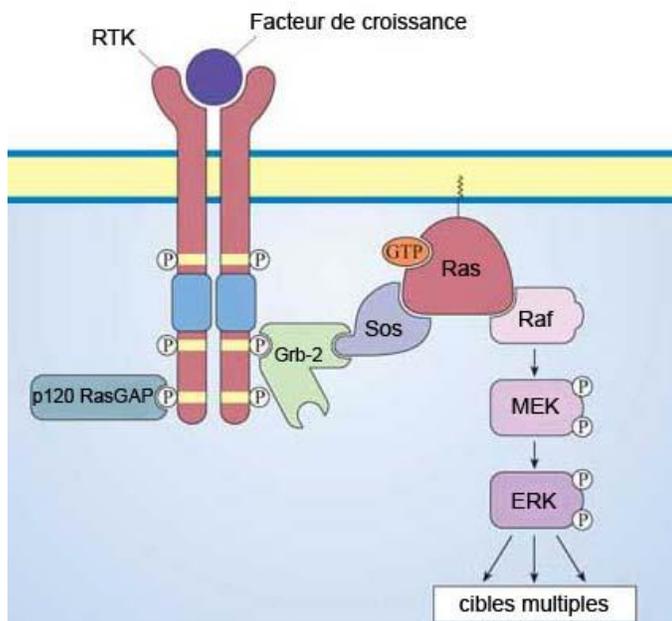


Figure 7. La voie RAS/MAP Kinase

La liaison de facteurs de croissance à des RTKs engendre une autophosphorylation de leur queue cytoplasmique. Ces sites sont alors disponibles pour le recrutement du complexe protéique GRB2/SOS. Le couplage subséquent de RAS au GTP engendre une cascade de phosphorylation qui débute par les kinases de la famille RAF, suivie des kinases MEK1/2 et des kinases effectrices ERK1/2. Le signal est interrompu lorsque le GTP est hydrolysé à la suite de l'action de p120RasGAP. Figure adaptée de (« Cell signalling ») (Libre accès).

La fonction des oncogènes *KRAS* et *BRAF* au cours de la progression adénome-carcinome a longtemps été étudiée. Dans un premier temps, l'expression des formes oncogéniques *KRAS*^{G12V} et de *BRAF*^{V600E} dans des lignées de CEI normales mais immortalisées en culture mène à un changement morphologique de ces cellules (Bates et Mercurio, 2005; Cagnol et Rivard, 2013). Cette transformation est associée à une activation accrue de MEK1/2, puisque leur inhibition par un traitement pharmacologique permet de restaurer la morphologie épithéliale. D'ailleurs, l'expression d'une forme constitutive active de MEK1, bien que non répertoriée chez les patients, induit également une transformation morphologique similaire des CEI (Boucher *et al.*, 2004; Lemieux *et al.*, 2009; Voisin *et al.*, 2008). Ce phénotype est typique d'une transition épithéliale-mésenchymateuse (EMT) et a été caractérisée en détails par notre équipe (Lemieux *et al.*, 2009). En plus de l'EMT, l'expression des formes oncogéniques de *KRAS* et *MEK1* dans les CEI leur confère un potentiel de poursuivre leur prolifération à post-confluence, à croître en indépendance d'ancrage et à former des tumeurs

invasives chez la souris immunodéficente (Boucher *et al.*, 2004; Lemieux *et al.*, 2009; Voisin *et al.*, 2008). De manière intéressante, ces cellules ont également une présence accrue de la β -caténine au noyau, avec une augmentation de l'activité transcriptionnelle du complexe β -caténine/TCF4 et de l'expression des gènes cibles *Ccnd1* et *Myc* (Lemieux *et al.*, 2015). Cette activation du complexe transcriptionnel β -caténine/TCF4 est importante puisque son inhibition par l'expression d'un mutant dominant-négatif de TCF4 bloque le potentiel tumoral et invasif des cellules exprimant la forme oncogénique de MEK1. Ainsi, l'activation de la voie Wnt médie, au moins en partie, les effets oncogéniques de la signalisation RAS/MAPK dans les CEI en culture.

Bien que les modèles *in vitro* suggèrent un rôle important de l'oncogène *KRAS* et de la voie MAPK dans la transformation cellulaire et l'acquisition des propriétés tumorales par les CEI, les études *in vivo* démontrent que cette activation n'est pas suffisante à induire un CRC. Plusieurs groupes se sont penchés sur le rôle putatif pro-tumoral de *Kras*^{G12D} chez la souris en utilisant des promoteurs distincts afin de permettre l'expression de cet oncogène dans les CEI. Autant les souris *Villine-Cre;Kras*^{G12D/+} (Calcagno *et al.*, 2008) que les souris *CDX2P9.5-G22Cre;Kras*^{G12D/+} et *Fabl-Cre;Kras*^{G12D/+} (Feng *et al.*, 2011) développent de l'hyperplasie intestinale avec une augmentation de la prolifération cellulaire, un allongement important des cryptes et une production accrue de cellules caliciformes aux dépens des cellules de Paneth. Cependant, aucun carcinome ne se forme spontanément dans aucun de ces trois modèles. Selon la séquence adénome-carcinome décrite par Fearon et Vogelstein en 1990, les mutations d'*APC* et de *KRAS* apparaissent très tôt et semblent être en synergie pour la progression du CRC. L'expression de *Kras*^{G12D} chez les souris *Apc*^{Min/+} augmente le nombre de tumeurs présentes dans le côlon des souris (Luo *et al.*, 2009) alors que le croisement des souris *Apc*^{delta14} avec le modèle *Fabl-Cre;Kras*^{G12D/+} mène à la formation de tumeurs à des stades plus avancés, avec la présence d'hyperplasie de haut grade, une absence de cellules normalement différenciées et une perte de la polarité cellulaire (Haigis *et al.*, 2008). Ainsi, bien que l'activation soutenue de la voie RAS/MAPK dans les CEI *in vivo* ne soit pas suffisante pour induire la tumorigenèse, elle potentialise la progression des lésions néoplasiques chez des souris ayant des mutations pour *Apc*.

3.3.3 Le suppresseur de tumeur TP53

La protéine TP53 est un facteur de transcription activé en réponse à divers stress, tels que les dommages à l'ADN, l'hypoxie et l'activation d'oncogènes (Levine et Oren, 2009). Puisqu'elle limite la division des cellules endommagées, cette protéine est le suppresseur de tumeur le plus fréquemment muté dans les cancers chez l'humain (Kandoth *et al.*, 2013). TP53 exerce ses fonctions anti-tumorales en se liant à l'ADN pour induire la transcription de gènes impliqués dans les processus d'arrêt du cycle cellulaire et de l'apoptose, tels que l'inhibiteur p21 et l'homologue pro-apoptotique de Bcl-2 Bax (Ryan *et al.*, 2001). Dans le CRC, des mutations de *TP53* sont présentes chez approximativement 50% des patients et elles sont associées à des stades avancés de la maladie et à un mauvais pronostic (López *et al.*, 2012). Ces mutations sont majoritairement situées dans les exons 5 à 8 qui codent pour les domaines de liaison à l'ADN. Certains codons sont plus fréquemment touchés que les autres, tels que les codons 175, 245, 273 et 282, mais leur impact sur les propriétés de la tumeur et le pronostic est spécifique à chacun d'entre eux (Russo *et al.*, 2005).

En plus d'être la cible fréquente de mutations génétiques, la protéine TP53 est sujette à des modifications post-traductionnelles qui peuvent moduler ses fonctions de suppresseur de tumeur. Par exemple, la poly-ubiquitination de Tp53 par l'E3-ligase MDM2 (Mouse double minute 2 homolog) engendre sa dégradation par le protéasome, influençant ainsi sa stabilité (Hernández-Monge *et al.*, 2016). D'un autre côté, la mono-ubiquitination de Tp53 entraîne son expulsion hors du noyau et par le fait même, inhibe son activité transcriptionnelle (Li *et al.*, 2003). La phosphorylation de Tp53 en réponse aux dommages à l'ADN est un autre processus grandement étudié. Cette phosphorylation par les kinases ATR (Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein), ATM (Ataxia telangiectasia mutated) et CHK1/2 (Checkpoint kinase 1 et 2) permet de modifier la spécificité des interactions entre Tp53 et ses partenaires afin d'influencer la réponse cellulaire appropriée (Kruse et Gu, 2009). Finalement, l'activité transcriptionnelle de Tp53 peut être régulée par acétylation de sa queue C-terminale et de son domaine de liaison à l'ADN. Ces modifications engendrent un changement de conformation de Tp53, ce qui favorise ses interactions avec l'ADN et accroît son potentiel transcriptionnel. Des études ont même révélé que l'acétylation de Tp53 est essentielle pour sa capacité à induire l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire (Tang *et al.*,

2008). Ainsi, que ce soit par mutation génique ou par des modifications post-traductionnelles, la régulation de TP53 est compromise au cours du CRC.

Bien que les mutations dans le gène suppresseur de tumeur *TP53* soient assez courantes dans le CRC chez l'humain, les tumeurs intestinales sont plutôt rares dans les modèles murins. Ce sont seulement 2% des souris hétérozygotes *Tp53*^{+/-} qui développent des adénocarcinomes tandis que les souris *Tp53*^{-/-} n'en développent pas du tout. Ces animaux vont plutôt développer d'autres types de cancer, principalement des lymphomes et des sarcomes (Harvey *et al.*, 1993). Des mécanismes de compensation pourraient être à l'origine de ce phénotype chez la souris, puisqu'il existe des homologues à Tp53, soit les protéines p63 et p73 qui peuvent réguler la réparation de l'ADN et l'entrée en apoptose dans les CEI (Levrero *et al.*, 2000). De manière intéressante, les souris qui expriment les formes mutantes Trp53^{R172H} ou Trp53^{R270H} en remplacement d'un allèle endogène (codons 175 et 273 chez l'humain) développent toutes deux des adénocarcinomes pulmonaires et intestinaux (Olive *et al.*, 2004). Ceci démontre que les mutations de Tp53 agissent de façon positive lors du développement tumoral en comparaison à une perte de fonction simple. De plus, l'expression de Trp53^{R270H} chez les souris *Apc*^{delta716} mène à l'accumulation massive de Tp53 dans le noyau des cellules localisées au front d'invasion. Lorsque cultivées en organoïdes, les tumeurs des souris *Apc*^{delta716}; *Trp53*^{R270H} démontrent une morphologie altérée, associée à l'acquisition de propriétés d'invasion et à un changement important dans le transcriptome des cellules. Ces tumoroïdes présentent une activation significative des réponses inflammatoires et immunitaires innées (Nakayama *et al.*, 2017). Ainsi, les mutations de *Tp53* sont associées à la progression tumorale puisqu'elles promeuvent l'agressivité des tumeurs et induisent des modulations du microenvironnement tumoral contrairement à la délétion complète du gène qui ne semble pas moduler l'incidence du CRC chez la souris.

3.4 Le cancer de type "festonné"

En plus des cancers qui se développent selon la séquence adénome-carcinome classique, le CRC peut apparaître selon une progression morphologique différente, le cancer de type festonné. Au contraire du précédent, le cancer festonné est beaucoup moins bien caractérisé

et souvent sous-estimé. Selon les données de la littérature, le pourcentage des carcinomes qui serait associé à la progression des lésions de type festonné varierait de 10 à 35% (Müller *et al.*, 2016; Snover, 2011). Une des caractéristiques de ce cancer est la présence de mutations oncogéniques dans les gènes *BRAF* (le plus fréquent) ou *KRAS* (moins fréquent) avec de l'instabilité des microsatellites (Bettington *et al.*, 2015; Chan *et al.*, 2003). Au contraire des CRC de type classique, l'inactivation d'*APC* est un événement rare dans les tumeurs de type festonné. Une augmentation de l'accumulation nucléaire de la β -caténine est tout de même nécessaire pour l'apparition de la dysplasie dans ces lésions, mais les mécanismes moléculaires conventionnels ne semblent pas être en cause (Borowsky *et al.*, 2017).

Il existe trois types de lésions festonnées, soit les polypes hyperplasiques, les adénomes festonnés de type sessile (SSA) et les adénomes festonnés traditionnels (TSA) (Singh *et al.*, 2016). On peut les différencier selon leurs aspects morphologiques distincts. D'abord, les TSA touchent plus souvent le côlon distal. Ils ont une prévalence pour les mutations de *KRAS* et présentent des microsatellites stables. Histologiquement, les TSA sont diagnostiqués en fonction du caractère éosinophile des CEI, de la localisation centrale de leur noyau et par la formation de cryptes ectopiques donnant une apparence de villosités dans le côlon (Bettington *et al.*, 2015; Longacre et Fenoglio-Preiser, 1990). De leur côté, les SSA sont majoritairement retrouvés dans le côlon proximal et ont plus souvent des mutations de *BRAF*. La méthylation des îlots CpG (CIMP) apparaît très tôt dans la formation des polypes SSA et mène à de l'instabilité des microsatellites, associé à l'hyperméthylation du promoteur de *MLH1* (Park *et al.*, 2003). Les SSA sont de formes atypiques, avec une dilatation importante de la base des cryptes et une présence de très grosses cellules caliciformes (Chetty *et al.*, 2014). Ceci est attribué à la délocalisation du compartiment prolifératif plus haut dans la paroi cryptale et à une migration bidirectionnelle des cellules différenciées qui vont aller se loger dans le fond des cryptes plutôt que de migrer exclusivement vers la lumière (Snover, 2011). Finalement, les polypes hyperplasiques sont le résultat d'une élongation importante des cryptes due à une augmentation du nombre de cellules prolifératives et à une diminution de l'apoptose, donnant une apparence festonnée à la muqueuse (Snover, 2011).

Les lésions festonnées se caractérisent par une élongation, une délocalisation et une multiplication de la zone proliférative de la crypte (Hisamatsu *et al.*, 2017). Cette hyperprolifération induite notamment par les oncogènes *KRAS* ou *BRAF* est perçue comme un stress par les CEI qui entrent alors en sénescence pour limiter leur prolifération et donc, l'apparition de tumeur. Il existe plusieurs inhibiteurs du cycle cellulaire pouvant contrôler ce processus, dont la famille INK4 (Inhibitors of CDK4) (Sherr, 2012). Dans les adénomes festonnés chez l'humain, c'est p16^{INK4a} qui est le plus fréquemment surexprimé (Schmitt, 2007). Pour qu'il y ait progression en carcinome, il doit y avoir une inactivation du gène encodant cet inhibiteur par un phénomène d'hyperméthylation de promoteur dans les adénomes. Ce mécanisme d'inhibition génique est associé au phénotype CIMP, retrouvé conjointement avec les mutations de *BRAF* dans les SSA, d'où origine 90% des cancers festonnés (Kriegel *et al.*, 2011).

Quelques études se sont penchées sur l'impact de l'expression de *Braf*^{V637E} (l'équivalent du mutant V600E chez l'humain) dans les CEI chez la souris. De manière intéressante, ces souris développent très rapidement de l'hyperplasie dans l'intestin grêle et dans le côlon (Carragher *et al.*, 2010; Rad *et al.*, 2013). Les analyses histologiques ont démontré que les villosités de leur intestin sont d'apparence déformée et ramifiée, tandis que leur côlon présente des protrusions ressemblant à des structures villositaires, composées de cellules hautement éosinophiles. Tout comme dans les lésions festonnées chez l'humain, les cellules positives au Ki67 sont plus nombreuses et sont délocalisées plus haut dans la paroi de la crypte chez les souris exprimant *Braf*^{V637E} (Carragher *et al.*, 2010; Rad *et al.*, 2013). De plus, les CEI contenues dans ces zones prolifératives ectopiques ont un fort marquage nucléaire de la β -caténine, marquage qui est restauré suite à l'inhibition pharmacologique de MEK1/2 (Carragher *et al.*, 2010). Ainsi, l'expression de l'oncogène *Braf*^{V637E} dans les CEI est suffisante pour induire l'activation de la voie Wnt et la formation de lésions festonnées dans l'intestin chez la souris.

Avec l'âge, les souris *Villine-Cre;Braf*^{*Δ*SL-V637E/+} développent de la dysplasie et des adénomes macroscopiques. Étonnamment, ces tumeurs se retrouvent à 95% dans l'intestin grêle (Rad

et al., 2013). D'autre part, seulement 13% de ces souris développent des carcinomes dû à l'apparition de sénescence dans les régions dysplasiques et les adénomes, caractérisée par la présence des marqueurs β -galactosidase et p16. Tout comme chez l'humain, pour permettre la progression des carcinomes, les souris qui expriment $Braf^{V637E}$ présentent une baisse d'expression de p16 dans leurs tumeurs. Les auteurs ont attribué cette réduction à la méthylation du promoteur de p16, possiblement en lien avec la surexpression de la DNA méthyltransférase 3 β (Dnmtb3b) (Carragher *et al.*, 2010). De manière intéressante, lorsque les souris *Villine-Cre;Braf^{LSL-V637E/+}* sont croisées avec un modèle invalidé pour l'expression de p16, la formation de tumeur est augmentée de plus de 6 fois et certaines souris développent même des métastases hépatiques (Rad *et al.*, 2013). Ces résultats suggèrent que BRAF est un puissant médiateur de la formation des lésions festonnées dans l'intestin et que la sénescence est un frein important pour leur progression en carcinome.

3.5 Le cancer associé à la colite

Le cancer associé à la colite (CAC) est une pathologie fréquente chez les patients souffrant de MII et son incidence s'accroît avec les années. Ainsi, ce sont près de 20% des patients atteints de CU qui développent un cancer dans les 30 années suivant l'apparition de la maladie (Van Der Kraak *et al.*, 2015). De plus, l'utilisation de composés anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) semble diminuer l'incidence du CAC, ce qui met l'accent sur le rôle de l'inflammation active dans le développement de la pathologie (Wang et Dubois, 2010). En plus du CAC, les patients atteints de MII sont également plus à risque de développer un CRC de type classique que la population générale (Terzić *et al.*, 2010). D'ailleurs, les mutations génétiques menant à l'apparition du cancer sont similaires dans les deux cas (*APC*, *TP53*, *KRAS*, *CTNNB1*), avec une séquence d'apparition quelque peu différente (Figure 8). Par exemple, les mutations d'*APC* sont tardives dans le CAC en comparaison au cancer sporadique, où elles sont répertoriées dans les phases initiales de la maladie (Terzić *et al.*, 2010). C'est plutôt les mécanismes induits par les dommages à la muqueuse et le stress inflammatoire qui initie la formation d'adénomes chez les patients atteints de MII.

L'inflammation chronique est caractérisée par le recrutement massif de cellules immunitaires dans la muqueuse et la sous-muqueuse. Ces cellules produisent de nombreux composés pro-inflammatoires et des cytokines, dont l'interleukine 6 (IL-6) (Becker *et al.*, 2004; Grivennikov *et al.*, 2009). Les CEI sont également capables de produire de l'IL-6, dont elles expriment le récepteur. Lorsque stimulé, le récepteur de l'IL-6 mène à l'activation du facteur de transcription STAT3 (Signal Transducers and Activators of Transcription 3). Dans les CEI, l'activation de STAT3 stimule leur prolifération, via l'induction des gènes encodant la Cycline D1 et c-Myc ainsi que leur survie, via l'induction de gènes anti-apoptotiques comme Bcl-2 ou Bcl-XL (Atreya et Neurath, 2005; Naugler et Karin, 2008). La voie de signalisation de NFκB est également stimulée dans les CEI lors de l'inflammation chronique de la muqueuse (Bollrath et Greten, 2009; Lee *et al.*, 2009). Dans les CEI, ce facteur de transcription régule des mécanismes similaires à STAT3, soit la migration, la prolifération et la survie. Ainsi, l'activation soutenue de STAT3 et de NFκB dans les CEI des patients atteints de MII stimule la formation de foyers de cryptes aberrantes et à long terme, favorise leur progression en adénomes puis en carcinomes.

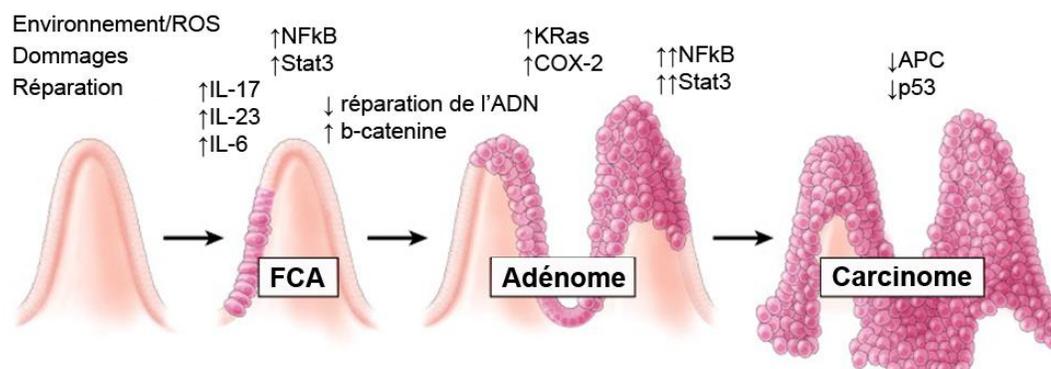


Figure 8. Le cancer associé à la colite

L'inflammation chronique du côlon induit des dommages perpétuels à l'épithélium, une augmentation de la perméabilité, un contact accru avec le contenu luminal et une activation locale des cellules immunitaires. La production de cytokines par ces cellules induit l'activation des voies JAK/STAT et NFκB dans les CEI, stimulant leur prolifération et leur survie. L'environnement riche en espèces réactives de l'oxygène (ROS) induit des dommages à l'ADN, menant à l'apparition de mutations dans des gènes suppresseurs de tumeurs comme *TP53* et/ou des proto-oncogènes comme *KRAS*, ce qui favorise la progression des foyers de cryptes aberrantes (FCA) en adénocarcinomes. Figure adaptée de Terzić *et al.* 2010 (#4340930213449).

Tout comme pour le CRC de type classique, des altérations génétiques doivent survenir afin de soutenir la progression du CAC. C'est la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires ainsi que la production des ROS et des intermédiaires réactifs du nitrogène (NOS) par les cellules immunitaires qui induisent des dommages à l'ADN et de l'instabilité génomique dans les CEI chez les patients atteints de MII (Terzić *et al.*, 2010). De plus, l'inflammation chronique stimule l'activation de l'enzyme COX2 (Cyclooxygénase 2) qui inhibe l'apoptose des CEI en augmentant l'expression des homologues Bcl-2 (Pozzi *et al.*, 2004; Tessner *et al.*, 2004). Cette enzyme induit également la production de la prostaglandine E2 (PGE2) qui stimule la prolifération épithéliale via l'activation de la signalisation de la β -caténine. Dans les cellules dendritiques, la PGE2 stimule la production de cytokines, dont l'IL-23 (Castellone *et al.*, 2005; Khayrullina *et al.*, 2008). Cette interleukine est responsable du recrutement des cellules Th17 qui produisent à leur tour l'IL-17 et IL-22 pour le recrutement de neutrophiles et de monocytes à la muqueuse (Gaffen *et al.*, 2014). En réponse à l'IL-17, les CEI vont activer les voies MAPK et NF κ B, en plus de produire de puissants médiateurs inflammatoires, dont NOS-2 (Nitric oxyde synthase 2) et l'IL-6, responsable de l'activation de STAT3 (Kolls et Lindén, 2004; Nakae *et al.*, 2003). Ainsi, chez les patients atteints de MII, le microenvironnement pro-inflammatoire induit des dommages à l'ADN, une prolifération accrue et une inhibition de l'apoptose dans les CEI, ce qui à long terme favorise le développement tumoral (Terzić *et al.*, 2010).

Les modèles murins qui développent une CU présentent plusieurs similarités avec les patients atteints de MII et sont d'excellents modèles pour étudier la susceptibilité à développer un CAC. Prenons par exemple les souris *Muc2*^{-/-} qui développent une inflammation dans le côlon dès 5 semaines de vie (Van der Sluis *et al.*, 2006). Chez ces souris, des anomalies dans la bicouche de mucus permettent aux composantes de la lumière intestinale, dont les bactéries, d'entrer en contact direct avec la muqueuse. Chez les patients atteints de CU, des études ont également démontré que les bactéries pouvaient entrer en contact direct avec les CEI et participer au recrutement massif de cellules immunitaires, responsables de la production de médiateurs inflammatoires (Wenzel *et al.*, 2014). Tout comme ces patients, les souris *Muc2*^{-/-} démontrent une production de cytokines élevée, dont l'IL-6 et le TNF α (Tumor necrosis factor α), ainsi qu'une augmentation de l'expression des

ROS et de COX2 (Bao *et al.*, 2014; Tadesse *et al.*, 2017; Van der Sluis *et al.*, 2006). Ces signaux pro-inflammatoires mènent à l'apparition de dommages à l'ADN et à de l'hyperprolifération dans les CEI. Suite à l'accumulation de stress inflammatoires et oncogéniques, 68% des souris *Muc2*^{-/-} vont développer un CAC dans leur première année de vie, ce qui est très rapide (Bao *et al.*, 2014; Velcich *et al.*, 2002). Ces résultats démontrent que l'inflammation chronique dans le côlon causée par une altération épithéliale est suffisante pour induire la carcinogenèse avec le temps, mais suggèrent également que la microflore et le mucus seraient impliqués dans la tumorigenèse colorectale.

3.6 La microflore promeut la tumorigenèse colorectale

Il est connu que des agents infectieux peuvent induire l'apparition du cancer comme par exemple le virus du papillome humain, le virus de l'hépatite B ainsi que la bactérie *Helicobacter pylori* (Parkin, 2006). Par contre, les évidences sont beaucoup plus limitées en ce qui concerne l'implication directe de la flore intestinale dans le développement du CRC. Afin de comprendre le rôle du microbiote dans la carcinogenèse du côlon, Lee et collaborateurs ont généré une souris ayant une délétion de Myd88 dans les CEI (Lee *et al.*, 2010). Normalement, Myd88 est une protéine adaptatrice permettant de relayer le signal en aval de plusieurs récepteurs TLRs pour l'activation des voies MAPK et NFκB (Deguine et Barton, 2014). Sa délétion inhibe donc en partie les mécanismes inflammatoires et prolifératifs induits en réponse à la flore intestinale. De manière intéressante, l'inhibition de Myd88 chez les souris *Apc*^{Min/+} réduit fortement la formation de polypes, ce qui suggère que la microflore joue un rôle dans l'initiation tumorale. De plus, les tumeurs qui se forment en absence de Myd88 sont beaucoup plus petites que celles observées chez les souris *Apc*^{Min/+} seules, ce qui a été attribué à une diminution de l'activation des kinases ERK en aval des TLRs (Lee *et al.*, 2010). Ainsi, les auteurs ont conclu que l'activation des voies TLR/Myd88/ERK par les produits bactériens de la lumière intestinale participe activement à l'initiation et à la croissance tumorale.

Les patients atteints de CRC présentent des changements dans la composition de leur microflore, avec une modulation des bactéries commensales et l'apparition de pathogènes

(Garrett, 2015). Des études ont démontré que le transfert oral du microbiote provenant de cinq patients atteints de CRC augmente la formation de polypes chez des souris traitées avec un agent carcinogène, l'axozyméthane (AOM), en comparaison au transfert de la flore provenant de sujets sains (Jobin, 2017). De plus, les souris ayant reçu le microbiote des patients atteints de CRC démontrent une expression accrue des interleukines 17, 22 et 23, accompagnée d'un recrutement important des cellules immunitaires dans l'intestin, dont les cellules Th17 et Th1, des cellules productrices de l'interféron (IFN). Finalement, l'expression de facteurs pro-oncogéniques a été détectée dans le côlon de ces souris en comparaison à celles ayant reçu la flore de sujets sains, tels que Aurka (Aurora kinase A), Cdc20 (Cell division cycle 20) et BMI1 (Jobin, 2017). Il semblerait donc que les modulations de la microflore observées chez les patients atteints de CRC soient directement impliquées dans l'apparition de changements clinico-pathologiques associés à la progression tumorale.

Des études taxonomiques ont révélé que la microflore des patients atteints de CRC est enrichie en bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae* et *Fusobacterium*, récemment liées au développement du cancer (Arthur *et al.*, 2014; Castellarin *et al.*, 2012; Kostic *et al.*, 2013). Lorsque des cellules humaines de CRC en culture sont inoculées avec *Fusobacterium nucleatum* (*Fn*), leur prolifération est fortement augmentée (Rubinstein *et al.*, 2013). Ces bactéries peuvent se lier directement à l'E-cadhérine des cellules cancéreuses, via leur adhésine FadA, ce qui induit l'endocytose conjointe de la E-cadhérine et des bactéries (Rubinstein *et al.*, 2013). De manière intéressante, l'expression de l'adhésine FadA par les bactéries *Fn* est augmentée significativement dans les biopsies chez l'humain, ce qui corrèle avec une translocation bactérienne importante. L'internalisation de *Fn* dans les CEI en culture engendre la production de l'IL-6, l'IL-8 et l'IL-18 en plus de l'activation de NFκB (Rubinstein *et al.*, 2013). De plus, l'endocytose de l'E-cadhérine est accompagnée par une diminution de la phosphorylation de la β-caténine et une augmentation de sa translocation nucléaire, menant à l'expression accrue de la Cycline D1 et de Myc (Rubinstein *et al.*, 2013). *In vivo*, l'infection des souris *Apc^{Min/+}* avec *Fn* accentue la formation de polypes dans l'intestin et le côlon, avec une expression accrue de COX-2, IL-6, IL-8 et du TNFα (Kostic *et al.*, 2013). Finalement, la quantité de bactéries obtenue en culture à partir des tissus isolés des souris *Apc^{Min/+}* est enrichie dans les tumeurs en comparaison à la muqueuse normale

adjacente, ce qui démontre bien l'invasion bactérienne de la muqueuse épithéliale au cours de l'initiation tumorale (Kostic *et al.*, 2013). Ainsi, ce résumé très succinct de certaines données de la littérature, met en évidence l'implication de la microflore et de certaines bactéries en particulier dans les mécanismes menant à la progression de la tumorigenèse colorectale.

CHAPITRE 4. SRC HOMOLOGY DOMAIN 2-CONTAINING TYROSINE PHOSPHATASE

4.1 Généralités sur SHP-2

La protéine SHP-2 (Src homology domain 2 (SH2)-containing tyrosine phosphatase) fait partie de la superfamille des protéines tyrosines phosphatases (PTP). Elle se retrouve dans la catégorie des protéines non transmembranaires, tout comme son homologue SHP-1 (Hunter, 1995). SHP-2 est exprimée de façon ubiquitaire et est codée par le gène *PTPN11* (PTP non-receptor type 11) (Tiganis et Bennett, 2007). Sa séquence protéique est constituée de plusieurs domaines, dont 2 domaines SH2 situés en N-terminal, un domaine PTP central et une queue C-terminale riche en prolines (Pluskey *et al.*, 1995). En condition non stimulée, SHP-2 adopte une conformation intramoléculaire inactive puisque des acides aminés contenus dans le premier domaine SH2 forment des ponts hydrogènes avec le domaine catalytique (Figure 9) (Qiu *et al.*, 2014). Cette liaison provoque un encombrement stérique limitant l'accès du domaine PTP avec ses substrats (Pluskey *et al.*, 1995). Lorsque les domaines SH2 en tandem sont engagés par des protéines phosphorylées sur tyrosine, SHP-2 change de conformation et son domaine catalytique est libéré.

L'activité de SHP-2 peut être modulée de différentes façons. D'abord, SHP-2 peut être phosphorylée sur des tyrosines présentes dans sa queue C-terminale suite à son rapprochement avec des kinases, dont les kinases de la famille Src (SFK) (Bromann *et al.*, 2004). La phosphorylation des tyrosines 542 et 580 augmente l'activité catalytique de SHP-2 et sert de site de liaison pour des protéines contenant des domaines SH2 ou PTB (Phosphotyrosine-binding domain), dont Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2) (Araki *et al.*, 2003; Songyang *et al.*, 1994; Vogel *et al.*, 1993). SHP-2 peut également s'auto-activer suite à une interaction intramoléculaire entre les domaines SH2 et les tyrosines

phosphorylées de sa queue C-terminale. Ce mécanisme permet de lever l'inhibition basale du domaine catalytique sans avoir recours à des ligands (Barford et Neel, 1998). Finalement, des mutations ciblant les acides aminés responsables de l'auto-inhibition ont été répertoriées dans diverses pathologies. Ces altérations génétiques entraînent généralement la production d'une forme constitutive active de SHP-2, qui participe alors à l'activation ou à l'inhibition de diverses voies de signalisation intracellulaire (Bentires-Alj *et al.*, 2004).

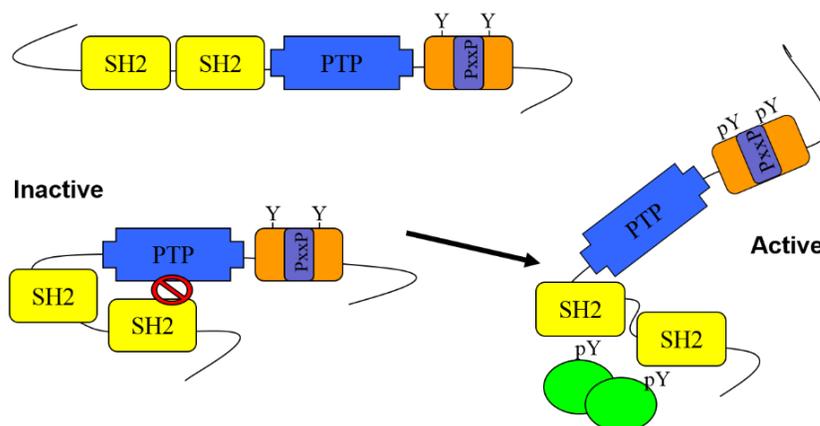


Figure 9. Conformation de la protéine tyrosine phosphatase SHP-2

En condition non stimulée, SHP-2 adopte une conformation inactive due à des ponts hydrogènes entre le premier domaine SH2 et son domaine PTP. En présence de protéines phosphorylées sur tyrosine, les domaines en tandem SH2 se lient à leurs partenaires, ce qui libère le domaine catalytique impliqué dans la déphosphorylation des substrats de SHP-2. La phosphorylation de SHP-2 sur tyrosine augmente son activité catalytique.

4.2 Signalisation intracellulaire régulée par SHP-2

4.2.1 Activation des voies Ras/MAPK et PI3K/AKT par SHP-2

Bien que la déphosphorylation soit plus souvent associée à un phénomène d'inhibition, SHP-2 est impliquée dans l'activation de la signalisation en aval de la majorité des RTKs (Araki *et al.*, 2003). Comme l'illustre la Figure 7, l'activation des RTKs engendre le recrutement du complexe protéique Grb2/SOS (Son of sevenless) (Skolnik *et al.*, 1993). La protéine SOS catalyse la conversion du RAS-GDP (Guanosine diphosphate) inactif associé à la membrane en une forme active RAS-GTP (Guanosine triphosphate). Lorsqu'elle est liée au GTP, RAS interagit avec des effecteurs de signalisation, comme les sérines/thréonines kinases de la

famille RAF. Une fois à proximité de la membrane plasmique, RAF est phosphorylée par différentes kinases, dont la Protéine kinase C (Avruch *et al.*, 2001; Marais *et al.*, 1995). Ainsi activée, RAF phosphoryle les kinases MEK1/2 qui phosphorylent les kinases effectrices ERK1/2 (Plotnikov *et al.*, 2011). D'un autre côté, la protéine GTPase RAS promeut également l'activation de la phosphatidylinositol 3-kinase ou PI3K (Castellano et Downward, 2011). Cette kinase convertit le PIP2 (phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate) en PIP3 (phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate), ce qui permet le recrutement des effecteurs PDK1 (Protein 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1) et AKT à la membrane via leur domaine PH (Pleckstrin homology) (Fresno Vara *et al.*, 2004). Tout comme la voie RAS/MAPK, la voie PI3K/AKT prend part à la régulation de nombreux processus cellulaires, tels que la prolifération, la synthèse protéique, la différenciation, la réorganisation du cytosquelette et la survie.

SHP-2 participe à l'activation des voies RAS/MAPK et RAS/PI3K/AKT en modulant positivement l'activation de RAS. Dans un premier temps, elle peut agir comme protéine adaptatrice en favorisant le recrutement de Grb2/SOS aux RTKs. Des études ont démontré que la phosphorylation de la tyrosine 542 de Shp-2 en réponse au PDGF (Platelet-derived growth factor) ou au FGF (Fibroblast Growth Factor) de même que la phosphorylation de la tyrosine 580 en réponse à l'EGF (Epidermal growth factor) induit son interaction avec Grb2 et l'activation subséquente de la voie MAPK (Bennett *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1994; Lu *et al.*, 2001). Par ailleurs, le recrutement de Grb2 aux RTKs est normalement inhibé par les protéines Sprouty (Spry) (Mason *et al.*, 2006). Il a été démontré que Shp-2 peut déphosphoryler directement Spry pour empêcher sa liaison avec le complexe Grb2/Sos afin de permettre l'activation de RAS (Zhang *et al.*, 2002). Finalement, l'activation de la voie MAPK est abrogée par le retour de RAS-GTP sous sa conformation inactive RAS-GDP. Cette hydrolyse est catalysée par des protéines de la famille GAP (Protéine activatrice des GTPase), dont p120 RASGAP (King *et al.*, 2013). Il a été démontré que Shp-2 inhibe le recrutement de p120 RAS-GAP sur les RTKs, ce qui permet de prolonger l'activation de RAS et des voies MAPK et PI3K/AKT dans le temps (Dance *et al.*, 2008; Tefft *et al.*, 2002).

4.2.2 Activation de Rho par SHP-2

En plus de la GTPase RAS, SHP-2 régularise positivement l'activité de RhoA (Ras homolog gene family member A) (Schoenwaelder *et al.*, 2000). RhoA est une protéine ancrée à la membrane plasmique où elle est impliquée dans la régulation du cytosquelette d'actine, la contraction de la myosine, la polarisation cellulaire et la migration (Kaibuchi *et al.*, 1999). Tout comme RAS, l'activité de RhoA est médiée par sa liaison avec le GTP et renversée par son hydrolyse en GDP. Ces processus sont régulés par des protéines GEF et GAP, dont p190B RhoGAP (Bustos *et al.*, 2008). La protéine p190B RhoGAP se localise à la membrane plasmique seulement lorsqu'elle est phosphorylée sur tyrosine. Ainsi, sa déphosphorylation par Shp-2 engendre un changement de sa localisation subcellulaire et elle n'est plus en mesure d'inactiver RhoA (Kontaridis *et al.*, 2004). Shp-2 peut aussi réguler l'organisation du cytosquelette en stimulant l'activité des SFKs. Un peu comme pour RhoA, Shp-2 contrôle la localisation subcellulaire des régulateurs négatifs des SFKs, les kinases CSK (C-terminal Src kinase). Ces dernières vont se lier à la paxilline et à Gab1 phosphorylées incluses dans les points focaux d'adhésion, puis elles phosphorylent la queue C-terminale des SFKs pour les inactiver (Zhang *et al.*, 2004). Shp-2 peut déphosphoryler à la fois la paxilline et Gab1 pour empêcher le recrutement de CSK et déphosphoryler la queue cytoplasmique de Src (Y527), induisant alors son activation (Peng et Cartwright, 1995; Tiganis et Bennett, 2007).

4.2.3 Inhibition de la voie JAK/STAT par SHP-2

La phosphorylation sur tyrosine joue un rôle central dans le contrôle de la voie JAK (Janus-associated kinase)/STAT médiée par les cytokines. En effet, lorsqu'une cytokine est engagée à son récepteur transmembranaire, cela résulte en son oligomérisation et à l'activation des kinases JAK (Shuai et Liu, 2003). Ces kinases phosphorylent des résidus tyrosines dans la queue cytoplasmique du récepteur, ce qui crée des sites de liaison pour le recrutement des facteurs de transcription de la famille STAT (Darnell, 1997). Le rapprochement entre JAK et STAT induit la phosphorylation sur tyrosine de ces dernières, ce qui entraîne leur dimérisation. Selon la nature des STATs dimérisés, ceux-ci peuvent transloquer au noyau pour promouvoir la transcription (Shuai et Liu, 2003). Puisque la cascade de signalisation JAK/STAT est associée à une série de phosphorylation sur tyrosine, de nombreuses PTP sont responsables de son inactivation (Böhmer et Friedrich, 2014).

Il a été démontré que SHP-2 régule négativement l'activation de plusieurs STATs en réponses à diverses cytokines (Xu et Qu, 2008). Par exemple, dans les fibroblastes murins invalidés pour Shp-2, la phosphorylation Y701 de Stat1 est augmentée et prolongée en réponse à l'IFN- α , ce qui altère la viabilité cellulaire (Shuai et Liu, 2003; You *et al.*, 1999). SHP-2 interagit également avec STAT5 de façon phospho-tyrosine dépendante. Des études *in vitro* ont montré que la déphosphorylation des tyrosines de STAT5 est directement effectuée par SHP-2 et que les cellules qui surexpriment SHP-2 présentent des niveaux d'activation de STAT5 atténués en réponse à l'IL-3 (Jing Chen *et al.*, 2004; You *et al.*, 1999). Finalement, de nombreuses évidences démontrent que SHP-2 régule négativement l'activité de STAT3. Dans les cellules hématopoïétiques et les cellules neuronales, l'inactivation de SHP-2 entraîne une activité accrue de STAT3 et des défauts dans la différenciation cellulaire (Chan *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2015). SHP-2 régule également la voie JAK2/STAT3 de plusieurs manières en réponse à l'IL-6. D'abord, la déphosphorylation de la protéine gp130 sur la Y759 est essentielle pour la régulation négative de STAT3 par SHP-2 (Ohtani *et al.*, 2000). SHP-2 peut aussi déphosphoryler directement STAT3 sur la Y705, ce qui entraîne son exclusion nucléaire (Kim *et al.*, 2010). Ainsi, la phosphatase SHP-2 est un régulateur clé de la signalisation des cytokines en modulant négativement la phosphorylation et donc l'activation des STATs.

4.3 Les mutations du gène encodant SHP-2 et le syndrome de Noonan

Des mutations de type gain-de-fonction de SHP-2 ont été associées à diverses maladies, tel que le syndrome de Noonan (Bentires-Alj *et al.*, 2004). Cette maladie autosomale dominante touche près de 1/1500 enfants dans le monde et les patients qui en sont atteints ont des traits faciaux anormaux, des retards développementaux et présentent une incidence élevée pour les cardiopathies et les leucémies (Allanson et Roberts, 1993). Le syndrome de Noonan est une pathologie causée par une activation aberrante de la voie RAS/MAPK. Ce sont près de 50% des enfants souffrant de cette maladie qui sont porteurs d'une mutation activatrice de SHP-2, les autres ayant des mutations dans les protéines SOS1, RAF1 et KRAS (Binder, 2009). Les mutations de type gain-de-fonction de SHP-2 sont majoritairement retrouvées dans les acides aminés responsables de l'auto-inhibition de la protéine en condition basale. Ainsi mutées, SHP-2 ne peut plus se refermer sur elle-même et son domaine PTP se retrouve

disponible en tout temps pour la déphosphorylation de ses substrats. De plus, certaines de ces mutations, notamment les mutations E76K et D61G, augmentent l'activité catalytique de SHP-2 en comparaison à la forme sauvage, tandis que d'autres, T507K, confèrent des propriétés différentes à la protéine, avec un changement de sa localisation subcellulaire et de sa spécificité de substrats (Li *et al.*, 2017; Miyamoto *et al.*, 2008).

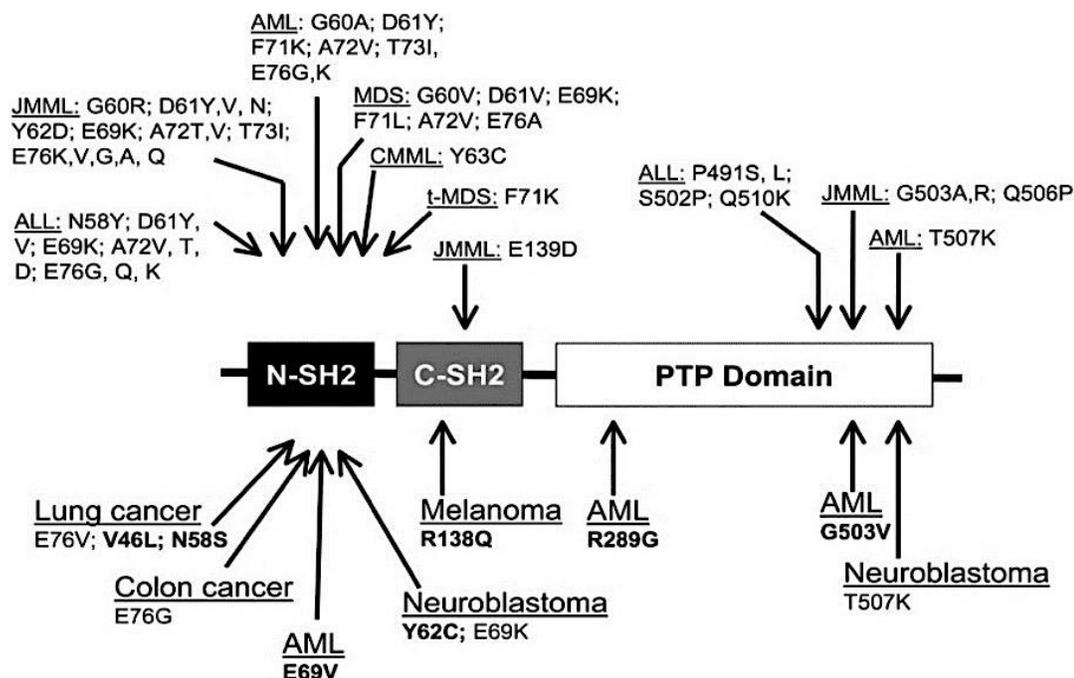


Figure 10. Mutations de SHP-2 dans les cancers solides et les leucémies

De nombreuses mutations gain-de-fonction ont été répertoriées chez des patients atteints de différentes formes de leucémie, de syndrome myélodysplasique ou de tumeurs solides, tels que le cancer du poumon, les mélanomes, les neuroblastomes et le cancer colorectal. Figure tirée de Bentires-Alj *et al.* 2004 (#4343791176152).

4.4 Le proto-oncogène SHP-2

De manière intéressante, des études ont identifié *PTPN11* comme le premier proto-oncogène codant pour une PTP (Chan et Feng, 2007). Parmi les mutations oncogéniques de SHP-2, la mutation E76K figure parmi les plus communes et les plus activatrices, répertoriée à la fois dans les leucémies et les tumeurs solides (Figure 10). Des études réalisées chez la souris ont montré que l'expression de cette forme oncogénique de Shp-2 est suffisante à induire des désordres myéloprolifératifs de façon sporadique (Xu *et al.*, 2011). Les souris développent

une leucémie très peu de temps après l'induction de l'expression du mutant E76K dans les cellules hématopoïétiques et ce, probablement due à de l'hyperplasie et à de l'instabilité génomique (Liu *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2011). En plus de stimuler la prolifération, les mutations gain-de-fonction de Shp-2 stimulent l'adhésion cellulaire. Des études réalisées *in vitro* sur les Ba/F3, des cellules lymphoïdes dépendantes de l'IL-3 pour leur survie et leur prolifération, ont démontré qu'une surexpression de la forme mutante E76K de Shp-2 augmente drastiquement la signalisation *outside-in* médiée par l'intégrine $\beta 1$ (Wang *et al.*, 2009). De son côté, lorsque qu'une forme D61G de SHP-2 est introduite dans des macrophages murins ou des cellules humaines du cancer mammaire, elle entraîne une augmentation de la migration, de l'adhésion et de l'invasion cellulaire, suggérant un réel impact de l'activité catalytique de SHP-2 dans ces processus cellulaires (Hu *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2009).

La forme sauvage de SHP-2 peut également participer aux processus menant à la tumorigenèse. Par exemple, SHP-2 est un effecteur important du cancer du sein bien que les mutations gain-de-fonction n'y soient pas associées. Chez l'humain, des études ont démontré que *PTPN11* est surexprimé chez 10% des patientes et qu'il participe à l'expression des récepteurs HER2, un marqueur important du cancer du sein (Zhou et Agazie, 2008). De façon surprenante, la délétion de Shp-2 dans des tumeurs mammaires déjà établies bloque leur croissance et réduit la formation de métastases hépatiques et pulmonaires chez la souris. *In vitro*, la délétion de SHP-2 mène à une diminution de l'invasion par les cellules du cancer du sein en diminuant leur motilité cellulaire (Aceto *et al.*, 2012). Un phénotype très semblable a été observé dans le cancer de la bouche, où SHP-2 est surexprimée dans les stades avancés de la maladie et participe à la viabilité, à l'invasion et à l'inhibition de l'apoptose (Wang *et al.*, 2014; Xie *et al.*, 2014). Finalement, SHP-2 semble favoriser l'EMT, puisque son inhibition dans les cellules des cancers du sein, du poumon et de la bouche entraîne une expression accrue de la E-cadhérine et une diminution de l'expression des marqueurs mésenchymateux, tels que la Vimentine, SNAIL et MMP2 (Métalloprotéinase 2) et ce, via une réduction de l'activation des ERK1/2 (Buonato *et al.*, 2015; Xie *et al.*, 2014; Zhou et Agazie, 2008).

4.5 SHP-2 : une dualité de rôle dans le cancer hépatique

Tout comme pour les leucémies et le cancer du sein, SHP-2 pourrait jouer un rôle favorable dans le développement du cancer hépatique (HCC). Dans un premier temps, l'expression de SHP-2 est significativement plus élevée dans les HCC chez l'humain (T. Han *et al.*, 2015; Xiang *et al.*, 2017). Cette surexpression a été corrélée avec des stades avancés de la maladie, à la présence de métastases et à un mauvais pronostic (Han *et al.*, 2015). Dans le foie, SHP-2 semble favoriser la prolifération des cellules souches et la dédifférenciation des hépatocytes en stimulant l'accumulation nucléaire de la β -caténine. Des études ont démontré que SHP-2 déphosphoryle CDC73 (Cell division cycle 73) dans le cytoplasme qui, lorsque déphosphorylée, se lie à la β -caténine et facilite son transport vers le noyau. De plus, SHP-2 inhibe la kinase GSK3 β dans les hépatocytes favorisant l'accumulation de la β -caténine (Xiang *et al.*, 2017). Un second groupe a démontré que Shp-2 promeut les voies RAS/MAPK et PI3K/AKT impliquées dans la croissance tumorale et la formation de métastases dans les modèles de HCC chez la souris. De plus, l'inhibition de l'expression de SHP-2 dans les cellules HCC en culture atténue leur potentiel d'adhésion, de migration et de prolifération, ce qui inhibe la formation de tumeur en xénogreffes et la formation de métastases (Han *et al.*, 2015). Finalement, l'inhibition de SHP-2 augmente la sensibilité des cellules du HCC au sorafénib, une molécule anticancéreuse ciblant certaines protéines kinases et récepteurs dont RAF-1, VEGF-R1 et PDGFR-b (Nishida *et al.*, 2015), tandis que les patients qui surexpriment cette phosphatase sont résistants à ce traitement (Han *et al.*, 2015; Xiang *et al.*, 2017).

De façon paradoxale, des études effectuées chez la souris ont plutôt suggéré que Shp-2 agirait comme un gène suppresseur de tumeur dans le cancer du foie (Bard-Chapeau *et al.*, 2011). Chez la souris, la délétion de Shp-2 dans les hépatocytes (*Shp-2^{hep-/-}*) mène au développement de zones nécrotiques et à la présence de cellules immunitaires infiltrantes dans le foie. Les souris *Shp-2^{hep-/-}* ont également une augmentation de l'expression de l'IL-6 et du Tnfa, impliqués dans l'apparition de l'inflammation et de l'activation de Stat3. À long terme, les souris *Shp-2^{hep-/-}* développent de l'hyperplasie régénérative et des adénomes (Bard-Chapeau *et al.*, 2011). Ainsi, l'invalidation de Shp-2 dans les cellules hépatiques induit une

inflammation chronique du foie et le développement de lésions néoplasiques, ce qui met en lumière un double rôle pour cette phosphatase dans le HCC.

4.6 SHP-2 dans les maladies inflammatoires intestinales

Certaines évidences de la littérature portent à croire que la délétion de SHP-2 est associée au développement de l'inflammation dans l'intestin et qu'elle pourrait y jouer un rôle de suppresseur de tumeur tout comme dans le foie. D'abord, des polymorphismes dans le gène *PTPN11* ont été associés à une susceptibilité accrue de développer une CU chez des patients Japonais (Narumi *et al.*, 2009). Bien que l'impact de ces polymorphismes n'ait pas été approfondi, une diminution de l'expression de SHP-2 a été observée dans des biopsies de patients atteints de MII (Coulombe *et al.*, 2013). Chez la souris, les travaux de notre laboratoire (Coulombe *et al.*, 2013) ainsi que de deux autres équipes (Heuberger *et al.*, 2014; Yamashita *et al.*, 2014) ont montré que la délétion de Shp-2 dans les CEI (*Shp-2^{CEI-KO}*) mène au développement spontané d'inflammation dans le côlon, mais pas dans l'intestin grêle. De manière intéressante, notre équipe a observé une augmentation de la perméabilité intestinale et du niveau d'activation de Stat3 et de NFκB ainsi qu'une diminution marquée du nombre de cellules caliciformes associée à une accumulation des cellules intermédiaires dans le côlon des souris *Shp-2^{CEI-KO}* (Coulombe *et al.*, 2013, 2016). Dans l'intestin grêle, l'inactivation de Shp-2 chez la souris engendre une baisse du nombre de cellules caliciformes et une augmentation du nombre de cellules de Paneth (Heuberger *et al.*, 2014).

L'augmentation des cellules de Paneth dans l'intestin grêle des souris *Shp-2^{CEI-KO}* et l'accumulation de leurs précurseurs dans le côlon rappellent le phénomène de métaplasie souvent observée chez des patients souffrant de MII (Simmonds *et al.*, 2014; Tanaka *et al.*, 2001). Nos travaux suggèrent donc qu'en absence de Shp-2, la différenciation du précurseur commun « Paneth/caliciforme » en cellules de Paneth est favorisée au détriment de la différenciation en cellules caliciformes (Figure 2). Dans les souris *Shp-2^{CEI-KO}*, une diminution de la phosphorylation des kinases ERK a été mesurée, ce qui pourrait influencer la différenciation cellulaire (Coulombe *et al.*, 2013). D'ailleurs, l'expression d'une forme mutante active de MEK1 chez les souris *Shp-2^{CEI-KO}* permet de restaurer le nombre de

cellules caliciformes et de Paneth au même niveau que celui observé dans l'intestin grêle des souris contrôles (Heuberger *et al.*, 2014). L'équipe de Heuberger a aussi suggéré que la voie MAPK contrôlerait la différenciation des cellules de Paneth en inhibant l'activité transcriptionnelle du complexe β -caténine/TCF4 (Heuberger *et al.*, 2014). Ainsi, la régulation négative de la voie Wnt/ β -caténine par la signalisation SHP-2/RAS/MAPK pourrait être à l'origine des problèmes de différenciation cellulaire retrouvés chez les souris *Shp-2^{CEI-KO}*.

Le phénotype inflammatoire observé chez les souris *Shp-2^{CEI-KO}* est similaire à celui des souris *Muc2^{-/-}* (Velcich *et al.*, 2002). Comme pour ces dernières, un traitement aux antibiotiques atténue fortement la sévérité de la colite chez la souris *Shp-2^{CEI-KO}*, ce qui démontre l'implication du microbiote dans le développement de l'inflammation (Coulombe *et al.*, 2013). Étonnamment, des changements dans la composition de la flore ont aussi été mis en évidence chez la souris *Shp-2^{CEI-KO}*, avec une augmentation des *Enterobacteriaceae* et une diminution des *Firmicutes*, ce qui rappelle les modulations de la flore répertoriées chez des patients atteints de MII (Coulombe *et al.*, 2016; Tannock, 2008). Ces changements dans la composition du microbiote pourraient donc être associés au développement de l'inflammation dans le côlon des souris *Shp-2^{CEI-KO}*. Afin de vérifier cette hypothèse, notre équipe a invalidé de manière concomitante l'expression de *Myd88* et de *Shp-2* dans les CEI chez les souris. Comme suggéré, la délétion de *Myd88* atténue grandement l'inflammation colique chez la souris *Shp-2^{CEI-KO}*, démontrant une réelle contribution de la microflore et de la signalisation TLR épithéliale dans l'apparition de la colite dans ce modèle (Akira et Takeda, 2004; Coulombe *et al.*, 2016).

4.7 SHP-2 dans le cancer colorectal

Une mutation gain-de-fonction sur le résidu E76 a déjà été répertoriée chez certains patients atteints du CRC (Figure 10) (Bentires-Alj *et al.*, 2004). Des mutations sur ce résidu sont aussi fréquemment observées chez les patients leucémiques. De manière intéressante, l'expression de la forme mutante E76K de *Shp-2* dans les cellules hématopoïétiques chez la souris est suffisante pour induire l'hyperprolifération des cellules myéloïdes et avec le temps,

la leucémie (Xu *et al.*, 2011). Dans le côlon, aucune étude n'a été effectuée pour comprendre le rôle de SHP-2 dans le développement du cancer, mais la découverte de la mutation E76G chez certains patients suggère que SHP-2 puisse aussi y avoir des fonctions pro-tumorales.

CHAPITRE 5. LE PROJET DE RECHERCHE

En fonction des données de la littérature sur le rôle de SHP-2 dans la carcinogenèse et du phénotype de nos souris invalidées pour *Shp-2* dans les CEI, l'hypothèse générale de mon projet de thèse est donc que *l'activation de SHP-2 protège la muqueuse colique de l'inflammation mais promeut sa tumorigenèse*. Mon projet de thèse se divise en plusieurs objectifs afin de répondre à cette hypothèse générale.

Objectif 1. Déterminer la contribution de SHP-2 dans la carcinogénèse colorectale

En fonction des rôles connus de SHP-2 dans les leucémies et les cancers mammaires et dû à la présence d'une mutation gain-de-fonction chez certains patients atteints de CRC, nous avons émis l'hypothèse que SHP-2 jouerait un rôle positif dans la carcinogénèse intestinale. Dans cet objectif :

- Nous avons analysé l'expression et la localisation de SHP-2 dans des tumeurs colorectales paires humaines de différents stades.
- Nous avons analysé l'impact de la baisse de son expression sur l'effet oncogénique de KRAS et sur les propriétés tumorales des cellules cancéreuses colorectales humaines en culture.
- Nous avons finalement laissé vieillir les souris *Shp-2^{CEI-KO}*, déjà générées au laboratoire (Coulombe *et al.*, 2013), et vérifier s'il y avait développement de colite chronique et de cancer associé à la colite avec l'âge. Finalement, ces souris ont été croisées avec le modèle d'initiation tumorale, les souris *Apc^{Min/+}*.

Objectif 2. Vérifier si SHP-2 est un oncogène pour l'épithélium intestinal

Une mutation gain-de-fonction de SHP-2 a été répertoriée chez certains patients atteints de CRC. De plus, SHP-2 est un activateur de la signalisation RAS/MAPK, qui est fortement associée au développement du cancer colorectal issu de la voie classique de carcinogénèse

et de la voie des lésions festonnées. Nous avons donc spéculé que l'activation soutenue de SHP-2 dans les cellules épithéliales intestinales pouvait être suffisante à induire leur transformation tumorale. Dans cet objectif :

- Nous avons analysé l'impact de l'expression des formes mutantes constitutives actives de SHP-2 (E76G et E76K) dans les CEI en culture.
- Nous avons généré un modèle murin qui exprime la forme E76K de Shp-2 dans les CEI spécifiquement (*Shp-2^{CEI-E76K}*). Nous avons laissé vieillir les souris jusqu'à 15 mois pour vérifier l'apparition ou non de tumeurs. Finalement, ces souris ont été croisées avec le modèle d'initiation tumorale, les souris *Apc^{Min/+}*.

Objectif 3. Évaluer le potentiel anti-inflammatoire de SHP-2 dans le côlon.

Nos résultats ont montré que les patients atteints de MII ont une diminution des niveaux d'expression de SHP-2 dans l'intestin. De plus, l'inactivation de Shp-2 induit des défauts dans la différenciation des cellules caliciformes et des cellules de Paneth chez la souris, engendrant une dysbiose et de l'inflammation dans le côlon (Coulombe *et al.*, 2016). Nous avons donc émis l'hypothèse que l'activation soutenue de SHP-2 pourrait prévenir le développement de l'inflammation colique. Dans cet objectif :

- Nous avons caractérisé en détail l'impact de l'activation soutenue de Shp-2 (souris *Shp-2^{CEI-E76K}*) sur l'homéostasie colique, notamment sur la prolifération et la différenciation des CEI.
- Nous avons testé la sensibilité de ces souris à des stress pro-inflammatoires, tels que l'ingestion de Dextran de Sulfate de Sodium et l'infection avec la bactérie *Citrobacter rodentium*.

II. RÉSULTATS PUBLIÉS

MANUSCRIT 1: SHP-2 PHOSPHATASE CONTRIBUTES TO KRAS-DRIVEN INTESTINAL ONCOGENESIS BUT PREVENTS COLITIS-ASSOCIATED CANCER DEVELOPMENT

Jessica Gagné-Sansfaçon¹, Geneviève Coulombe¹, Marie-Josée Langlois¹, Ariane Langlois¹, Marilène Paquet², Julie Carrier³, Gen-Sheng Feng⁴, Cheng-Kui Qu⁵, Nathalie Rivard¹

¹Département d'anatomie et de biologie cellulaire, Pavillon de la recherche appliquée sur le cancer, Faculté de Médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada. ²Département de microbiologie et pathologie, Université de Montréal, St-Hyacinthe, QC, Canada. ³Département de Médecine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada. ⁴Department of Pathology and Division of Biological Sciences, University of California San Diego, La Jolla, CA, USA. ⁵Department of Pediatrics, Emory University School of Medicine, Atlanta, GA, USA

Statut de l'article : Publié - Oncotarget. 2016; 7:65676 65695. Libre accès.

(Gagné-Sansfaçon *et al.*, 2016) <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11601>

CONTRIBUTION

Pour cet article, j'ai généré les cellules IEC-6/KRas^{G12V} exprimant un shARN contre SHP-2 ainsi que leurs contrôles et réalisé les expériences d'interférence à l'ARN dans les lignées cancéreuses colorectales. J'ai aussi généré les souris *Shp-2*^{IEC-E76K} ainsi que les souris *Apc*^{Min/+}; *Shp-2*^{IEC-E76K}. J'ai également euthanasié les animaux en plus de récolter les tissus appropriés. Pour ce qui est des analyses de tumorigenèse, j'ai fait tous les tests d'invasion, de croissance en indépendance d'ancrage et l'injection des cellules dans les souris immunodéficientes, en plus du suivi de la taille des tumeurs. Finalement, j'ai effectué toutes les analyses d'immunohistochimie, d'immunofluorescence et d'immunobuvardage présentées dans cet article, en plus de faire les extractions protéiques et les expériences de transcription inverse. Pour l'analyse des gènes en PCR quantitatif, nous avons fait affaire avec la plateforme de RNomique de l'Université de Sherbrooke et la plateforme d'histologie

a inclus les tissus dans la paraffine, effectué les coupes histologiques ainsi que les colorations à l'hématoxyline et à l'éosine. Les lentivirus exprimant un shARN dirigé contre Shp-2 ont été produits par Geneviève Coulombe. Geneviève a aussi généré les souris *Shp-2^{IEC-KO}* et effectué les premières analyses de décompte de tumeurs chez les souris *Apc^{Min/+}; Shp-2^{IEC-KO}*, avec l'aide d'Ariane Langlois. La pathologiste Marilène Paquet de l'Université de Montréal a effectué les analyses histopathologiques chez les souris âgées tandis que Marie-Josée Langlois a fait les décomptes du nombre de tumeurs. J'ai écrit la première version du manuscrit, préparé les figures et, avec l'aide de Marie-Josée Langlois, j'ai effectué les corrections demandées par les évaluateurs suite à la soumission initiale. Cet article n'aurait pas été possible sans la contribution de la gastroentérologue Julie Carrier qui nous a gentiment fourni les échantillons de la biobanque de patients atteints de cancer colorectal. Nous tenons aussi à remercier nos collaborateurs, les Drs Gen-Sheng Feng et Cheng-Kui Qu qui nous ont donné les souris *Shp-2^{fx/fx}* et *PTPN11^{E76KNeo/+}* pour générer nos souris expérimentales. La professeure Nathalie Rivard a coordonné l'ensemble de la recherche en plus de rédiger la version finale du manuscrit.

RÉSUMÉ EN FRANÇAIS

Un facteur de risque important pour le développement du cancer colorectal (CRC) est la présence d'une inflammation chronique dans le côlon. Des travaux précédents de notre laboratoire ont démontré que l'expression de SHP-2 dans la muqueuse colique était diminuée significativement chez les patients atteints de colite ulcéreuse (CU). De plus, l'inactivation conditionnelle du gène encodant Shp-2 dans l'épithélium intestinal de souris (souris *Shp-2^{CEI-KO}*) mène au développement spontané d'une inflammation colique. Les analyses que nous avons effectuées ont démontré une diminution du nombre de cellules caliciformes chez les souris *Shp-2^{CEI-KO}* ainsi qu'une dysbiose et des niveaux d'activation élevés des facteurs de transcription Stat3 et NFκB avant l'apparition de l'inflammation dans ce modèle. Ces altérations phénotypiques sont très similaires à celles observées chez les patients atteints de CU et qui sont à risque de développer un cancer associé à la colite (CAC). Cependant, une mutation gain-de-fonction de SHP-2 (E76) a été répertoriée chez certains patients atteints du CRC, suggérant plutôt un rôle pro-tumoral de cette phosphatase dans le côlon. Cet article avait donc comme objectif de mettre en évidence le rôle de SHP-2 dans le CRC. Les résultats de cet article montrent d'abord que SHP-2 est surexprimée dans les stades précoces du CRC chez l'humain. De manière intéressante, sa baisse d'expression dans les cellules cancéreuses en culture réduit leur capacité de croître en indépendance d'ancrage et à envahir une matrice. De plus, la transformation oncogénique des cellules épithéliales intestinales normales IEC-6 par l'oncogène KRAS^{G12V} est inhibée lorsqu'on diminue l'expression de SHP-2. À l'inverse, l'expression d'une forme active de Shp-2 dans les CEI chez la souris (*Shp-2^{CEI-E76K}*) engendre de l'hyperplasie et potentialise la formation de tumeur dans le modèle *Apc^{Min/+}*. De façon opposée, la délétion de Shp-2 mène au développement du CAC chez les souris âgées, associé avec une activation des voies Wnt/β-caténine, Stat3 et NFκB, ainsi que la présence de stress oxydatif et de dommages à l'ADN. Finalement, la délétion de Shp-2 chez les souris *Apc^{Min/+}* augmente le nombre et la taille des tumeurs formées dans le côlon. En résumé, les résultats de cet article révèlent que SHP-2 peut exercer des fonctions opposées dans le côlon, puisqu'elle promeut le CRC mais inhibe la tumorigenèse associée à l'inflammation chronique.

ABSTRACT

A major risk factor of developing colorectal cancer (CRC) is the presence of chronic inflammation in the colon. To understand how inflammation contributes to CRC development, the present study focused on SHP-2, a tyrosine phosphatase encoded by *PTPN11* gene in which polymorphisms have been shown to be markers of colitis susceptibility. Conversely, gain-of-function mutations in *PTPN11* gene (E76 residue) have been found in certain sporadic CRC. Results shown herein demonstrate that SHP-2 expression was markedly increased in sporadic human adenomas but not in advanced colorectal tumors. SHP-2 silencing inhibited proliferative, invasive and tumoral properties of both intestinal epithelial cells (IECs) transformed by oncogenic KRAS and of human CRC cells. IEC-specific expression of a SHP-2^{E76K} activated mutant in mice was not sufficient to induce tumorigenesis but markedly promoted tumor growth under the *Apc*^{Min/+} background. Conversely, mice with a conditional deletion of SHP-2 in IECs developed colitis-associated adenocarcinomas with age, associated with sustained activation of Wnt/ β -catenin, NF κ B and STAT3 signalings in the colonic mucosae. Moreover, SHP-2 epithelial deficiency considerably increased tumor load in *Apc*^{Min/+} mice, shifting tumor incidence toward the colon. Overall, these results reveal that SHP-2 can exert opposing functions in the large intestine: it can promote or inhibit tumorigenesis depending on the inflammatory context.

Keywords: SHP-2, colorectal cancer, colitis-associated cancer, oncogene, mitogen-activated protein kinase.

INTRODUCTION

The pathogenic mechanisms driving colorectal cancer (CRC) development are complex and heterogeneous. A major component increasing the risk of CRC is the presence of inflammatory bowel diseases (IBD), particularly ulcerative colitis (UC) [1-2]. For both UC-associated CRCs and sporadic CRCs, many mutations occur during the carcinogenic process. The development of sporadic CRC generally involves alterations in the oncogene *KRAS* and the tumor suppressor genes *APC*, *SMAD4* and *TP53* [3-5]. The pathogenesis of UC-associated CRC appears to differ, involving an orderly progression from inflamed and hyperplastic epithelia to flat dysplasia and lastly to adenocarcinoma. The increased risk to of developing CRC in UC patients is presumably attributable to the long-term harmful effects of sustained inflammation in the colon of these patients [1]. One deleterious effect of chronic inflammation is the increased production of reactive oxygen species (ROS) causing oxidative DNA damage [5]. Loss of expression or mutation of the tumor-suppressor gene *TP53* is probably a key early event in UC-associated carcinogenesis [1-5]. Nevertheless, our knowledge of the underlying cellular mechanisms involved in this process remains incomplete.

Notably, polymorphisms in the *PTPN11* gene were previously associated with increased susceptibility to develop UC [6]. *PTPN11* gene codes for the Src homology 2-domain containing tyrosine phosphatase (SHP-2) which is ubiquitously expressed and which closely regulates several cell processes including proliferation, differentiation, chemotaxis and survival [7]. Genetic and biochemical evidence demonstrate that SHP-2 positively regulates the RAS/Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) pathway activation by most receptors [7-10]. SHP-2 binds directly to selected tyrosine kinase receptors or, more often, to scaffolds and becomes activated. Actions of SHP-2 on JAK/STATs (1,3,5) [11], NF κ B [9], PI3K/AKT [12] and RhoA [13] pathways were also reported in various cellular contexts.

To characterize the functional role of SHP-2 in intestinal homeostasis, we have recently generated mice with a deletion of *Shp-2* expression specifically in intestinal epithelial cells (IECs). Importantly, these mice (*Shp-2*^{IEC-KO}) spontaneously develop inflammation in their colon [14]. Chemokine and cytokine secretion profiles indicate that the immunophenotype

of *Shp-2*^{IEC-KO} mice is similar to patients suffering from UC as opposed to Crohn's disease. Additionally, *SHP-2* gene transcripts are reduced in intestinal biopsies from patients with active UC, indicating an inverse relationship between SHP-2 expression and intestinal inflammatory phenotype [14]. Of note, the activity of pro-inflammatory transcription factors STAT3 and NFκB are markedly enhanced in SHP-2-deficient colonocytes [14]. Likewise, mice with hepatocyte-specific deletion of *Shp-2* exhibited excessive STAT3 activation and developed severe liver inflammation and tumors with age [15]. Importantly, sustained activation of STAT3 and NFκB are critical for the development of colitis-associated cancer [1,16-17]. Whether loss of epithelial SHP-2 represents an initiating event in colorectal tumorigenesis in the context of chronic inflammation remains however to be determined.

Paradoxically, in humans, gain-of-function mutations of *PTPN11* gene have been associated with pediatric leukemias and certain solid carcinomas including hepatocellular carcinoma and CRC [18-19]. These specific mutations increase SHP-2 phosphatase activity and enhance its binding to signaling partners resulting in sustained activation of downstream effectors, particularly the RAS/MAPK pathway [19-20]. Importantly, dysregulation of this pathway is also a common event in sporadic colorectal carcinogenesis. Indeed, activating mutations in *KRAS*, *NRAS* and *BRAF* genes are found in up to 60% of CRCs and are acquired at an early premalignant stage consistent with a role in tumor initiation and/or progression [21-22].

Based on these results, we speculate that SHP-2 can function as an oncoprotein (through the overactivation of the RAS/MAPK pathway) but that under an inflammatory context, it can also act as a tumor suppressor. The present study was therefore designed to elucidate the significance of epithelial SHP-2 in colorectal tumorigenesis.

RESULTS

SHP-2 expression is increased in early stage colorectal tumors

SHP-2 mRNA levels were first examined in sporadic human colorectal advanced adenomas and adenocarcinomas at various stages. As illustrated in Figure 1A, transcript levels of *SHP-2* were significantly enhanced in colorectal adenomas and stage 1 tumors but not in more advanced stages. SHP-2 protein expression was further analyzed by Western blot to verify if the increased SHP-2 mRNA levels observed in adenomas could be correlated with enhanced protein levels. As shown in Figure 1B, SHP-2 protein levels were also increased in all analyzed human colorectal adenomas compared to normal adjacent tissues. Furthermore, immunohistochemistry analyses demonstrated that the increased expression of SHP-2 was primarily observed in the hyperplastic epithelium and not in the lamina propria (Figure 1C). Thus, these results suggest that increased transcription may contribute to a greater expression of SHP-2 protein in early stages of sporadic CRC.

SHP-2 silencing inhibits proliferative, invasive and tumoral properties of IECs transformed by oncogenic KRAS and human CRC cells

Approximately 35-40% of colorectal tumors exhibit mutations in *KRAS* gene. These mutations occur relatively early in the process of colorectal carcinogenesis [21-22]. Considering the pivotal role of SHP-2 in the activation of the RAS/RAF/MEK/ERK pathway, we examined whether SHP-2 is involved in intestinal epithelial transformation induced by oncogenic KRAS signaling [23-24]. We therefore developed recombinant lentiviruses encoding anti-*Shp-2* short hairpin RNA (shRNA) to stably suppress SHP-2 expression in rodent IECs transformed by oncogenic KRAS (IEC-6/*KRAS*^{G12V} cells) [23]. As demonstrated in Figure 2A, levels of SHP-2 protein were markedly diminished in both untransformed and KRAS-transformed IEC-6 cells, in contrast to a control shRNA which had no effect. SHP-2 knock-down significantly reduced the proliferation rate of IEC-6/*KRAS* cells without severely affecting proliferation of control cells (Figure 2B). In addition, SHP-2 silencing partially restored an epithelial morphology in KRAS-transformed cells (Figure 2C). Inhibition of SHP-2 expression also decreased the capability of KRAS cells to grow under anchorage-independent conditions (Figure 2D) and to invade Matrigel (Figure 2E). The ability of these cell populations to form tumor *in vivo* was subsequently

assessed in immunodeficient mice. As illustrated in Figure 2F, KRAS cells induced palpable tumors rapidly, 8 days after injection. Of note, SHP-2 silencing clearly attenuated their tumorigenic potential.

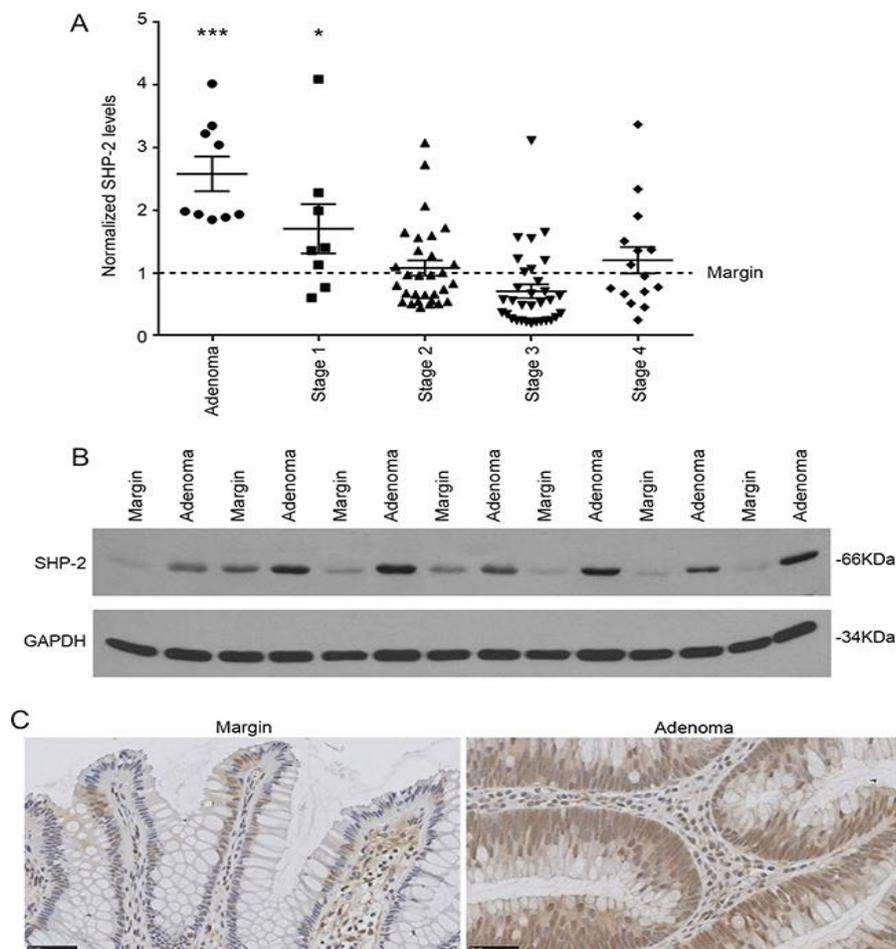


Figure 1 manuscript: SHP-2 expression in sporadic human colorectal tumors. A. Relative *SHP-2* mRNA levels were determined by q-PCR in human advanced adenomas and adenocarcinomas compared to the paired adjacent healthy tissue (Adenoma N=9; Stage 1 N=8; Stage 2 N=30; Stage 3 N=32; Stage 4 N=15; paired Student's *t*-test). Relative expression was normalized with the housekeeping genes *MRPL19*, *SDHA* and *YWHAZ*. B. Representative immunoblot analysis of SHP-2 protein performed on protein extracts from paired resection margins and adenoma specimens. GAPDH expression is shown as a protein loading control. C. Representative SHP-2 immunohistochemistry performed on human adenomas compared to paired adjacent healthy tissue. Scale bars: 50µM. Data are expressed as mean ± SEM. * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$.

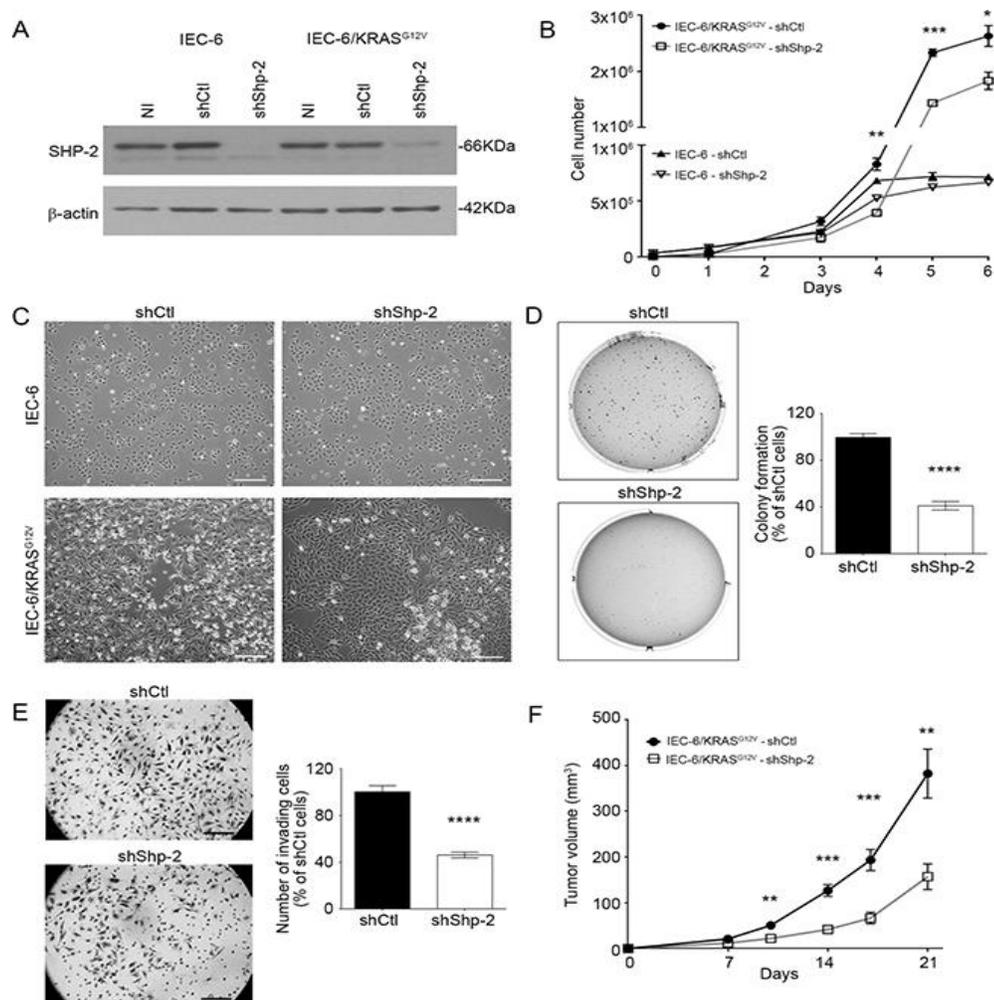


Figure 2 manuscript: SHP-2 is required for oncogenic activity of KRAS^{G12V} in intestinal epithelial cells. A. Control IEC-6 and KRAS^{G12V}-expressing cells were stably infected with lentiviruses encoding for a control shRNA (scrambled sequence, shCtl) or encoding Shp-2-specific shRNA (shShp-2). After selection, stable cell populations were lysed and protein lysates were analyzed by Western blot for SHP-2 and β-actin protein expression. NI: *Non-infected. B. Cells were seeded in a 6-well plate, harvested and counted after different time intervals. Growth curves were compared between shCtl and shShp-2 for both control IEC-6 cells and transformed KRAS^{G12V} cells. C. Representative phase-contrast microscopy images of control IEC-6 and KRAS^{G12V} cells expressing shShp-2 or shCtl. Bars: 50 μm. D. IEC-6 KRAS^{G12V} cells stably expressing shShp-2 or shCtl were cultured in soft agarose for 10 days before 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) staining. E. Invasion capacity of IEC-6 KRAS^{G12V} cells stably expressing shShp-2 or shCtl was studied using Matrigel-coated Transwells after 48h. The number of cells was determined in 10 fields and the experiments performed in duplicate. F. Tumor growth over time was measured after subcutaneous injection of 5×10⁵ IEC-6 KRAS^{G12V} cells stably expressing shShp-2 or shCtl. Results represent mean tumor volume obtained from at least 13 mice injected for each cell line. (A-E) All experiments were conducted on at least three different cell populations (different infections). Data are expressed as mean ± SEM. *p≤0.05, **p≤0.01, ***p≤0.001, ****p≤0.0001.

SHP-2 contribution was next analyzed in established human CRC cell lines, namely DLD-1 and SW480 which exhibit an activating mutation in the *KRAS* gene, and in HT-29 cells which have an activating *BRAF* mutation (Figure 3A). As shown in Figure 3B, cells transfected with siRNA against SHP-2 exhibited reduced capacity to form colonies in soft agarose and to migrate through Matrigel when compared to cells transfected with a control siRNA (Figure 3C).

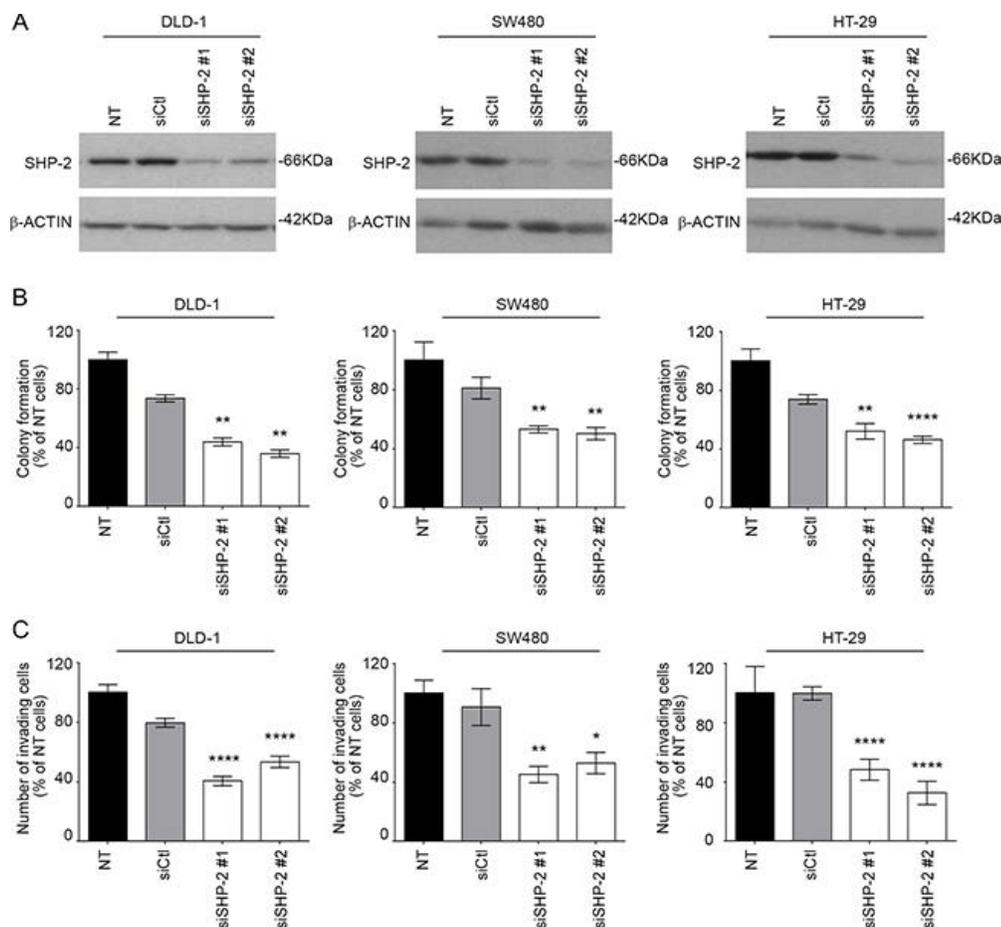


Figure 3 manuscript: SHP-2 silencing in human CRC cells inhibits growth in soft agar and invasion capacity. A. CRC cells were transfected or not (NT) with a control siRNA (siCtl) or encoding SHP-2-specific siRNAs (siSHP-2#1 and siSHP-2#2). Cell populations were lysed after 48h and protein lysates were analyzed by Western blotting for SHP-2 and β -actin expression. B. The capacity of cancer cells to grow in soft agar was assessed following SHP-2 silencing and the number of formed colonies counted after 7 to 14 days with DLD1, SW480 and HT29 cells. C. Invasion capacity was studied using Matrigel-coated Transwells after 48h post-seeding. The number of cells was determined in 10 fields and the experiments performed in duplicate. All experiments were conducted on at least three different cell populations. Data are expressed as mean \pm SEM. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.0001$.

SHP-2 is required for full activation of MEK/ERK signaling in cells expressing oncogenic KRAS

To determine the mechanisms by which SHP-2 silencing interferes with the tumoral properties of cells expressing oncogenic KRAS, transduction pathways known to be associated with these oncogenes were examined, including the MAPK and PI3K/AKT effector pathways [25-26]. As shown in Figure 4A, activation of MEK1/2 and ERK1/2 by EGF was severely impaired in IEC-6/KRAS and DLD-1 cells knocked-down for SHP-2. By contrast, EGF-induced AKT activation was not significantly affected by SHP-2 silencing (Figure 4B).

Such reduced MEK phosphorylation observed in SHP-2-depleted cells suggests that SHP-2 silencing may interfere with activation of RAS or RAF. Interaction of RAF-1 with RAS has been shown to relieve RAF-1 auto-inhibition and is correlated with dephosphorylation of Ser259 and release of 14-3-3 inhibitory proteins [27]. Additionally, Ser338 and Tyr341 phosphorylation in the SSYY submotif is required for full activity of RAF-1 [27]. As seen in Figure 4C, increased phosphorylation of Ser259 was found in SHP-2 deficient cells. Of note, decreased phosphorylation of Ser338 was noticed in SHP-2-depleted cells while phosphorylation of Tyr340/341 was enhanced (Figure 4C). Since tyrosine phosphorylation of RAF proteins alone is not sufficient to activate the RAF kinase [28], our data strongly suggest that RAF-1 activation is likely impaired in SHP-2 deficient cells.

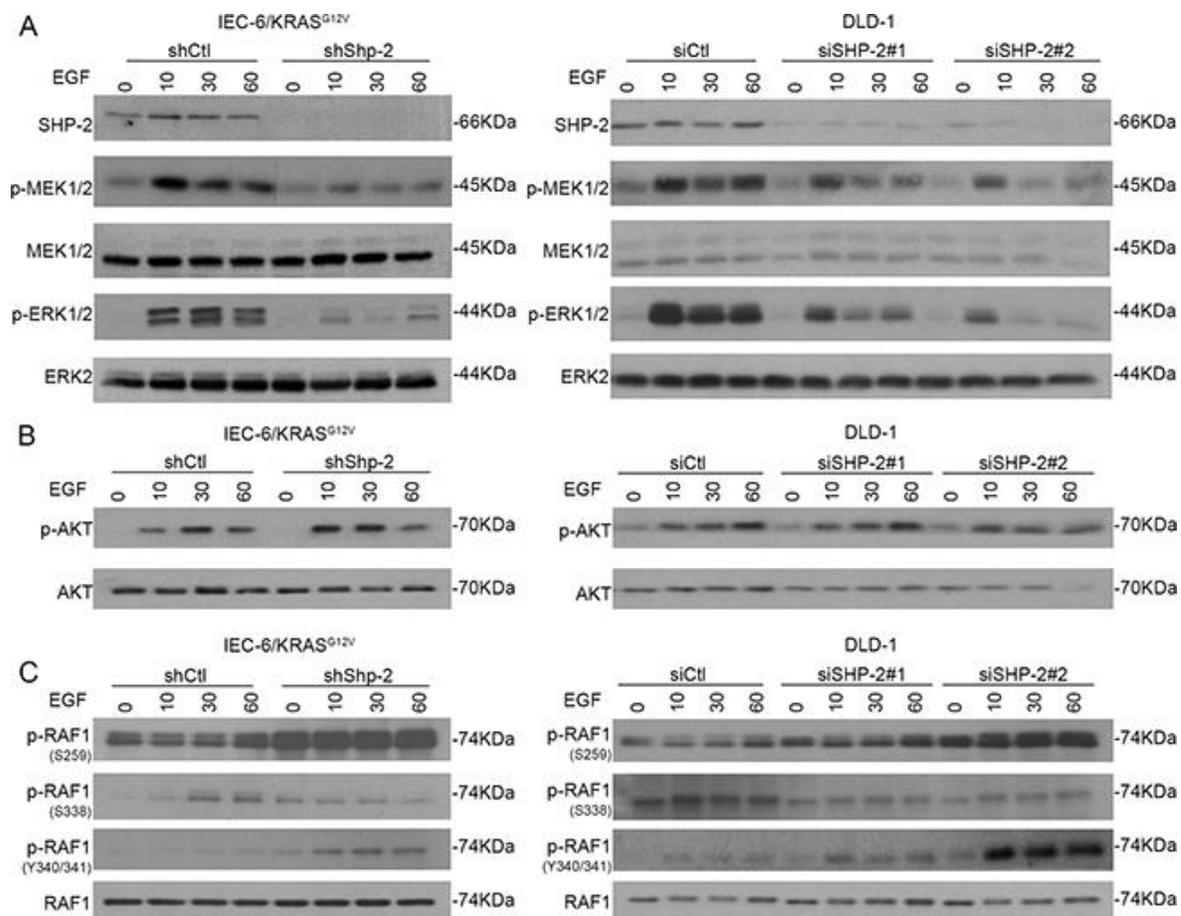


Figure 4 manuscript: SHP-2 is required for full activation of MEK/ERK signaling in cells expressing oncogenic KRAS. KRAS^{G12V} IEC-6 cells and DLD-1 CRC cells in which SHP-2 was downregulated or not by RNA silencing were serum-starved during 24h and thereafter stimulated with 100 ng/ml EGF for 10, 30 and 60 min. Cells were harvested and phosphorylation levels of (A) MEK1/2 (S217/S221), ERK1/2 (T202/Y204), (B) AKT (S473) and (C) RAF-1 (S259/S338/Y340/Y341) were determined by Western blotting. All experiments were conducted on at least three different cell populations and representative immunoblots are shown.

SHP-2^{E76K} mutant does not act as a classical oncogene but is a novel modifier of intestinal adenoma formation

Activating mutation in *PTPN11* gene (E76G) has been observed in certain CRCs [18, 29]. To investigate the impact of somatic mutation on E76 residue *in vivo*, *Ptpn11*^{E76Kneo/+}/*Villin-Cre*⁺ mice (*Shp-2*^{IEC-E76K} mice) were generated by crossing *Ptpn11*^{E76Kneo/+} mice with *Villin-Cre* mice that express Cre in IECs. Neo deletion efficiency in IECs of these mice was almost complete and SHP-2^{E76K} expression was similar to that of wild-type SHP-2 in *Ptpn11*^{+/+}/*Villin-Cre*⁺ mice (data not shown). As illustrated in Figure 5A, IEC-specific

expression of SHP-2^{E76K} mutant did not severely alter colonic architecture, except for a significant increase in crypt depth and proliferation (Figure 5A). Importantly, no change in colon phenotype of these mice was observed after 1 year, indicating that expression of activating SHP-2 mutation in IECs is not sufficient to induce their oncogenic transformation (Figure 5A). *Shp-2*^{IEC-E76K} mutant mice were then subsequently crossed with *Apc*^{Min/+} mice, heterozygous for an *Apc* truncation mutation frequently found in human sporadic CRC, which spontaneously develop adenomas in the intestine [30]. Of note, *Apc*^{Min/+} mice in C57BL/6 background have been shown to die before they reach four months due to anemia and intestinal obstruction resulting from polyposis [30]. Therefore, we sacrificed the mice at three months of age. Of note, the survival rate was similar between *Apc*^{Min/+}; *Shp-2*^{IEC-E76K} and *Apc*^{Min/+} mice at this age. As shown in Figure 5B, we observed that SHP-2^{E76K} expression in *Apc*^{Min/+} mice significantly increased tumor multiplicity in the small and large intestines (Figure 5B). Histologically, both *Apc*^{Min/+} and *Apc*^{Min/+}; *Shp-2*^{IEC-E76K} mice developed typical intestinal intraepithelial neoplasia (GIN) and adenomas (Figure 5C). As expected, polyps from *Apc*^{Min/+} mice exhibited increased accumulation of β -catenin protein confirming the deregulation of APC signaling in these tumors (Figure 5D). Accordingly, levels of active (non-phosphorylated) β -catenin were significantly enhanced in polyps of *Apc*^{Min/+} mice in comparison to normal tissues. Reduced levels of total and active β -catenin were however found in colonic epithelium and polyps from *Apc*^{Min/+}; *Shp-2*^{IEC-E76K} mice suggesting an attenuation of the Wnt/ β -catenin signaling in these double mutant mice. Hence, pathways distinct from Wnt/ β -catenin signaling most likely triggered these changes in colon tumor multiplicity. Since MEK/ERK signaling activation has been deemed fundamental for intestinal tumor development in *Apc*^{Min/+} mice [31], immunoblot analyses were performed to elucidate whether changes in ERK phosphorylation status can be observed in colon epithelial samples and polyps after expression of the activated SHP-2^{E76K} mutant. Analyses revealed that levels of p-ERK1/2 were indeed higher in colon epithelium and polyps of *Apc*^{Min/+}; *Shp-2*^{IEC-E76K} mice than in epithelium and polyps of control *Apc*^{Min/+} mice.

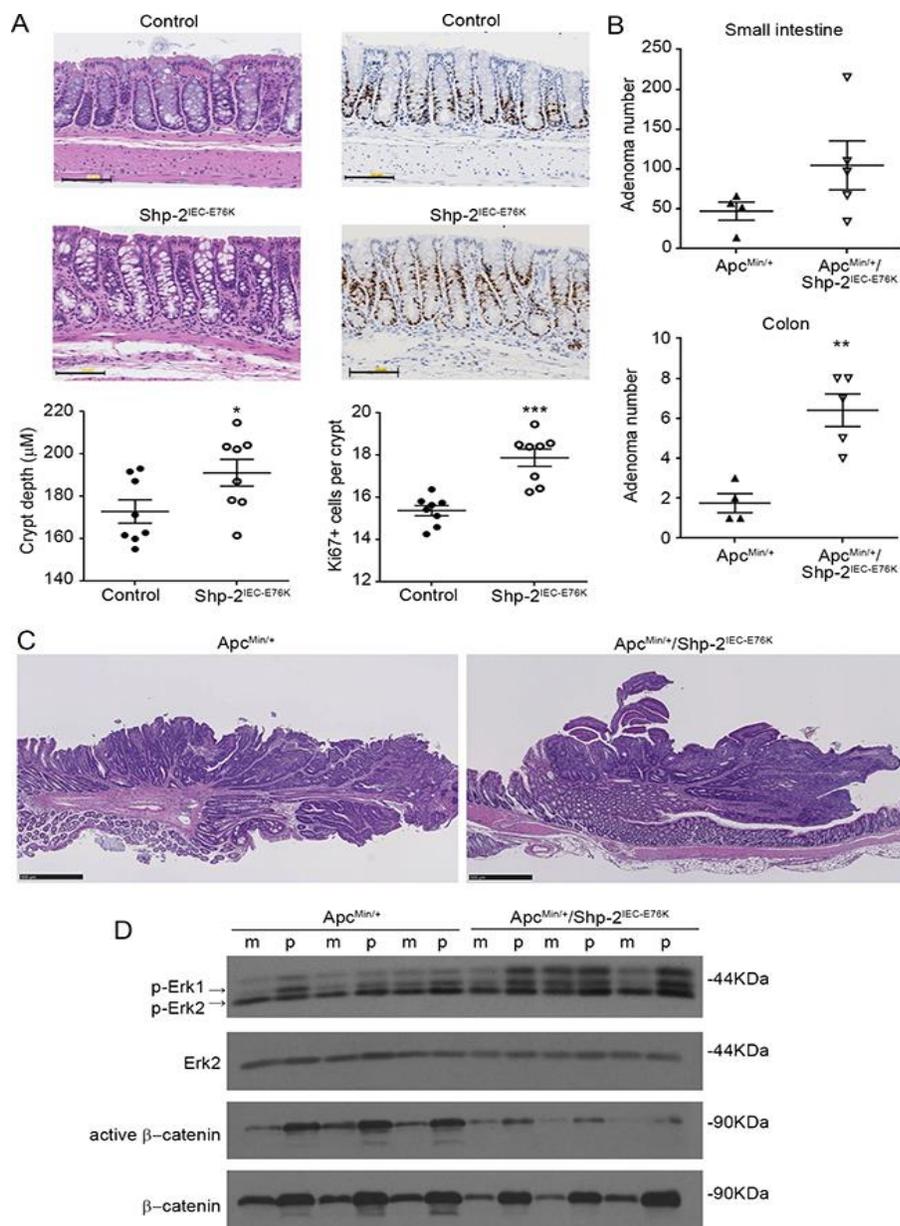


Figure 5 manuscript: Expression of activated SHP-2^{E76K} mutant in intestinal epithelium deregulates crypt proliferation and increases tumor multiplicity in *Apc^{Min/+}* mice. A. Colonic sections obtained from 15-month-old control and *Shp-2^{IEC-E76K}* mice were stained with H&E for histological analysis and KI67 for proliferation determination (N=8). Scale bars: 100 μm. B. The number of polyps formed in the small and large intestines was determined at 3 months of age in both *Apc^{Min/+}* and *Apc^{Min/+}* mice expressing activated SHP-2 mutant (*Apc^{Min/+}; Shp-2^{IEC-E76K}* mice) (N=4-5). C. Representative H&E staining of 3-month-old *Apc^{Min/+}* and *Apc^{Min/+}; Shp-2^{IEC-E76K}* murine colonic polyps. Scale bars: 500μm. D. Western blot analyses were performed on paired specimens of margins (m) and polyps (p) extracted from *Apc^{Min/+}* and *Apc^{Min/+}; Shp-2^{IEC-E76K}* mice. Levels of total and phosphorylated ERK1/2 (T202/Y204) and total and non-phospho (active) β-catenin were specifically analyzed. Representative immunoblots are shown. Data are expressed as mean ± SEM. *p≤0.05, **p≤0.01, ***p≤0.001.

***Shp-2^{IEC-KO}* mice develop colorectal adenocarcinomas with age**

Persistent inflammation in the colon predisposes patients to CRC. Importantly, we previously reported that SHP-2 deletion in murine IECs (*Shp-2^{IEC-KO}* mice) spontaneously leads to chronic inflammation in the colon, four weeks after birth [14]. Herein, *Shp-2^{IEC-KO}* mice were followed longitudinally to evaluate their phenotype 15 months after birth. As shown in Figure 6, *Shp-2^{IEC-KO}* mice still exhibited chronic colitis as visualized by the sustained elevated DAI (Figure 6A) and fibrosis (Figure 6B). This persistent inflammation further prompted to investigate whether *Shp-2^{IEC-KO}* mice had developed colorectal tumors with age. As shown in Figure 6C, 15 months after birth, *Shp-2^{IEC-KO}* mice had developed severe dysplasia and infiltrating adenocarcinomas in their distal colon. Some of these mice also developed invasive carcinomas as witnessed by invasion of tumor cells through the lamina propria (Figure 6C, panels 4 and 8, arrows).

To understand the molecular mechanisms involved in tumor development in aged *Shp-2^{IEC-KO}* mice, we analyzed the activation levels of signaling effectors known to be regulated by SHP-2 and to be involved in chronic intestinal inflammation. As illustrated in Figure 7A, the downstream transcription factors STAT3 and p65NF κ B, both of which are tumor-promoting factors, were clearly phosphorylated and activated in the colons of *Shp-2^{IEC-KO}* mice. Immunofluorescence confirmed increased STAT3 phosphorylation in the colon from these mice, especially in epithelial cells (Figure 7B, see arrows). Interestingly, while the expression of acetylated p53 was barely detectable, levels of mutant p53 (R273H) were clearly increased in *Shp-2*-deficient colons (Figure 7A), indicating that *Tp53* gene was targeted during colitis-induced carcinogenesis. Moreover, phosphorylation levels of ERK1/2 MAPK were reduced in aged *Shp-2 KO* mice (Figure 7A) as previously observed in younger mice [14]. By contrast, expression levels of β -catenin protein (Figure 7A) as well as *Cd44*, *CyclinD1* and *C-Myc* transcripts (Figure 7C) were enhanced in the colon of mutant mice suggesting the activation of Wnt/ β -catenin signaling. Lastly, we analyzed the expression of proinflammatory cytokines IL-6, IL-17 and IL-23 recently shown to influence the development and growth of colitis-associated cancer (CAC) [32-35]. As shown in Figure 7D, levels of these cytokines were indeed significantly increased in aged *Shp-2^{IEC-KO}* mice.

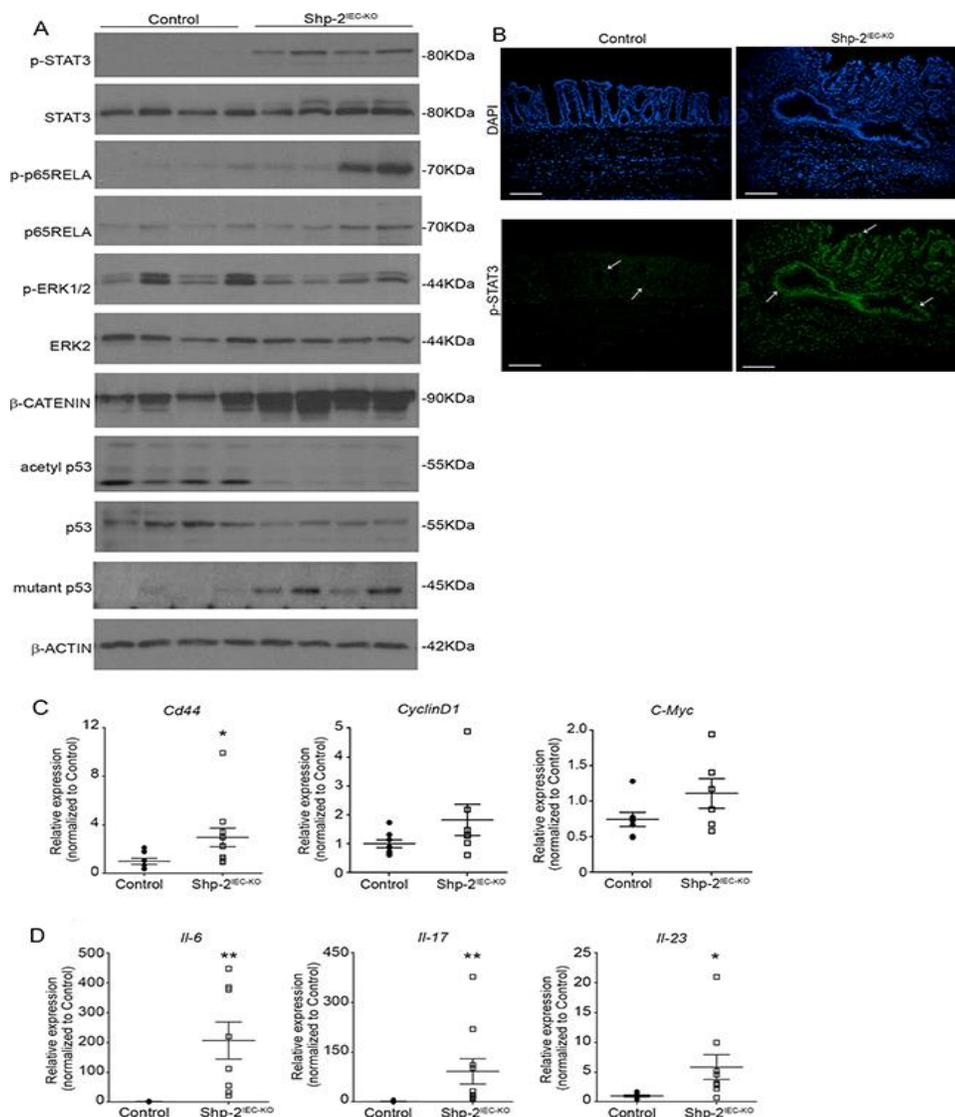


Figure 7 manuscript: Aged *Shp-2*^{IEC-KO} mice exhibit several typical features of colitis-associated cancer. A. Mucosal enrichments from 15-month-old *Shp-2*^{IEC-KO} and control murine colons (N=8) were analyzed by Western blotting for the expression of selected proteins including total and phosphorylated ERK1/2 (T202/Y204), STAT3 (Y705) and p65NFκB (S536) as well as total β-catenin, total p53, mutant-p53 (R273H) and acetylated p53 (K379). β-actin served as loading control. Representative immunoblots are shown. B. Immunofluorescence against phosphorylated STAT3 (Y705) was performed on colonic tissue from 15-month-old control and *Shp-2*^{IEC-KO} mice. White arrows indicate epithelial cells. Scale bars: 100μm. C. Quantitative PCR of *Cd44*, *Cyclin D1* (p=0.1385) and *C-Myc* (p=0.1254) mRNAs in enriched colonic mucosal extracts from 15-month-old control and *Shp-2*^{IEC-KO} mice were performed. Relative expression was normalized with the housekeeping genes *Psmc4*, *Pum1* and *Tbp* (N≥6). D. Quantitative PCR of interleukin-6 (*Il6*), interleukin-17 (*Il17*) and interleukin-23 (*Il23*) mRNAs in enriched colonic mucosal extracts from 15-month-old control and *Shp-2*^{IEC-KO} mice were performed. Relative expression was normalized with the housekeeping genes *Psmc4*, *Pum1* and *Tbp* (N≥8). Data are expressed as mean ± SEM. *p≤0.05, **p≤0.01.

Immunohistochemistry analysis furthermore demonstrated increased KI67 staining, a marker of proliferation, especially in the nucleus of most epithelial and mesenchymal cells in dysplastic regions of aged *Shp-2^{IEC-KO}* mice while its expression was restricted to the nucleus of proliferative progenitor cells along the colonic crypt in control mice (Figure 8A). Increased phospho-H2AX staining (Figure 8B) as well as *Nox1*, *Ho-1*, *iNos* and *Cox2* expression (Figure 8C) were moreover observed in the colon of 15 month-old *Shp-2^{IEC-KO}* mice indicating the presence of DNA damage and oxidative stress, two typical features of CAC [36-37]. Overall, these results suggest that SHP-2 protects the colonic epithelium against inflammation-induced cell proliferation and DNA damage.

IEC-specific Shp-2 ablation exacerbates tumorigenesis in *Apc^{Min/+}* mice

To further analyze the suppressive function of SHP-2 in inflammation-induced intestinal tumorigenesis, the effect of SHP-2 removal was assessed in *Apc^{Min/+}* mice. As illustrated in Figure 9A, the multiplicity of polyps after SHP-2 epithelial loss was much more dramatic in the colon than in the small intestine of *Apc^{Min/+};Shp-2^{IEC-KO}* mice comparatively to control *Apc^{Min/+}* mice at three months of age. Importantly, 38% of *Apc^{Min/+};Shp-2^{IEC-KO}* mice died before three months, probably because of malnutrition caused by severe diarrhea and rectal bleeding. Indeed, at this age, *Shp-2^{IEC-KO}* and *Apc^{Min/+};Shp-2^{IEC-KO}* mice have clearly developed chronic colitis as demonstrated by higher DAI in comparison to control littermates (Figure 9B). Histological analysis confirmed the increased immune cell infiltration, the reduction in goblet cells and the presence of crypt abscesses in *Shp-2*-deficient colons (Figure 9C). Importantly, these signs of inflammation were also manifest in the colon of *Apc^{Min/+};Shp-2^{IEC-KO}* mice (Figure 9C), correlating with elevated DAI similar to *Shp-2^{IEC-KO}* mice (Figure 9B).

In comparison to their corresponding benign epithelium, polyps from *Apc^{Min/+}* mice displayed consistently higher phosphorylation levels of ERK1/2, STAT3 and p65RELA (Figure 9D). Importantly, upon deletion of SHP-2 in *Apc^{Min/+}* mice, phosphorylated levels of ERK1/2 were found to be diminished both in the polyps and margins in comparison to *Apc^{Min/+}* mice. By contrast, total and active levels of β -catenin, STAT3 and p65RELA

were further increased in the colon of *Apc^{Min/+}; Shp-2^{IEC-KO}* mice. These observations suggest that SHP-2 may exert a tumor suppressive function under an inflammatory setting.

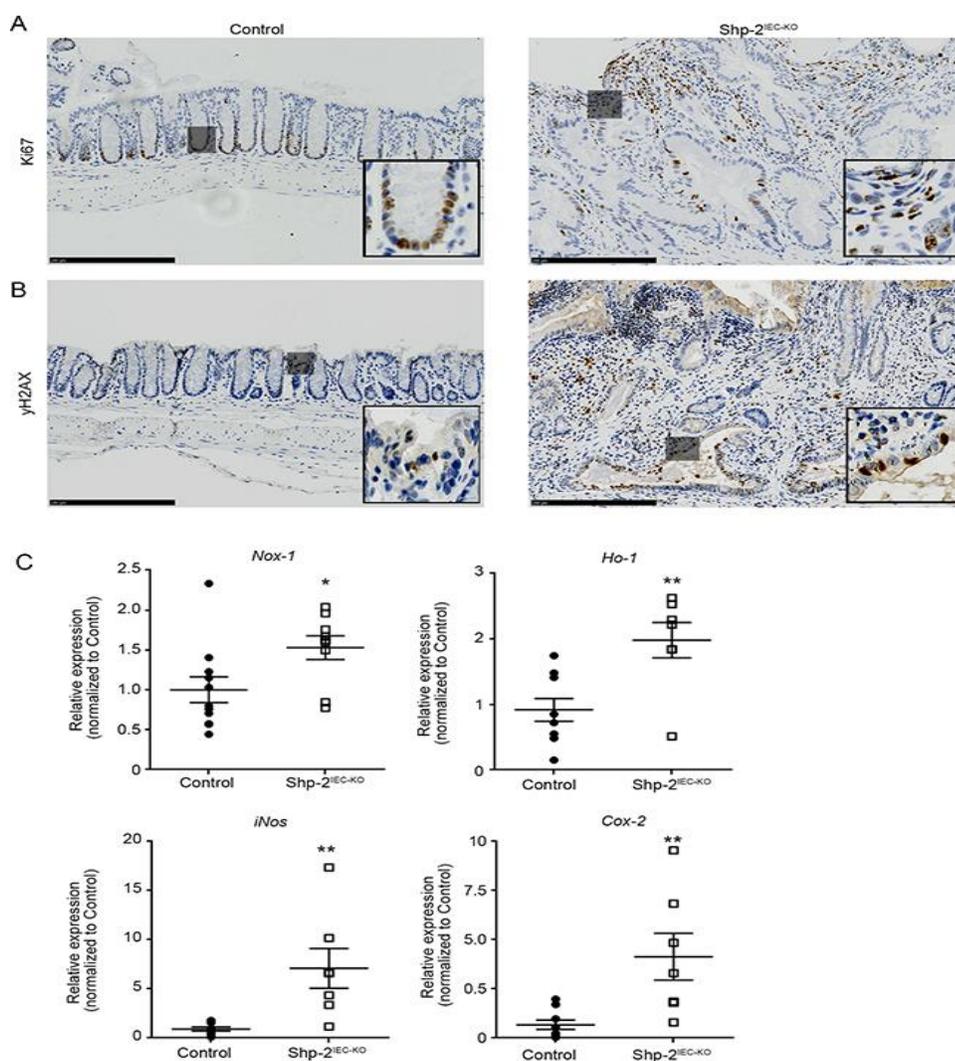


Figure 8 manuscript: Aged *Shp-2^{IEC-KO}* mice exhibit increased epithelial proliferation and signs of oxidative stress in their colon. (A-B) Representative images of 15-month-old control and *Shp-2^{IEC-KO}* murine colons stained for KI67 (A) and phospho-H2AX (B) are shown (representative of N=6). Scale bars: 250 μ m. C. Quantitative PCR of *Nox1*, *Ho-1*, *iNos* and *Cox-2* mRNAs in enriched colonic mucosal extracts from 15-month-old control and *Shp-2^{IEC-KO}* mice were performed. Relative expression was normalized with the housekeeping genes *Psmc4*, *Pum1* and *Tbp* (N=9). Data are represented as mean \pm SEM. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

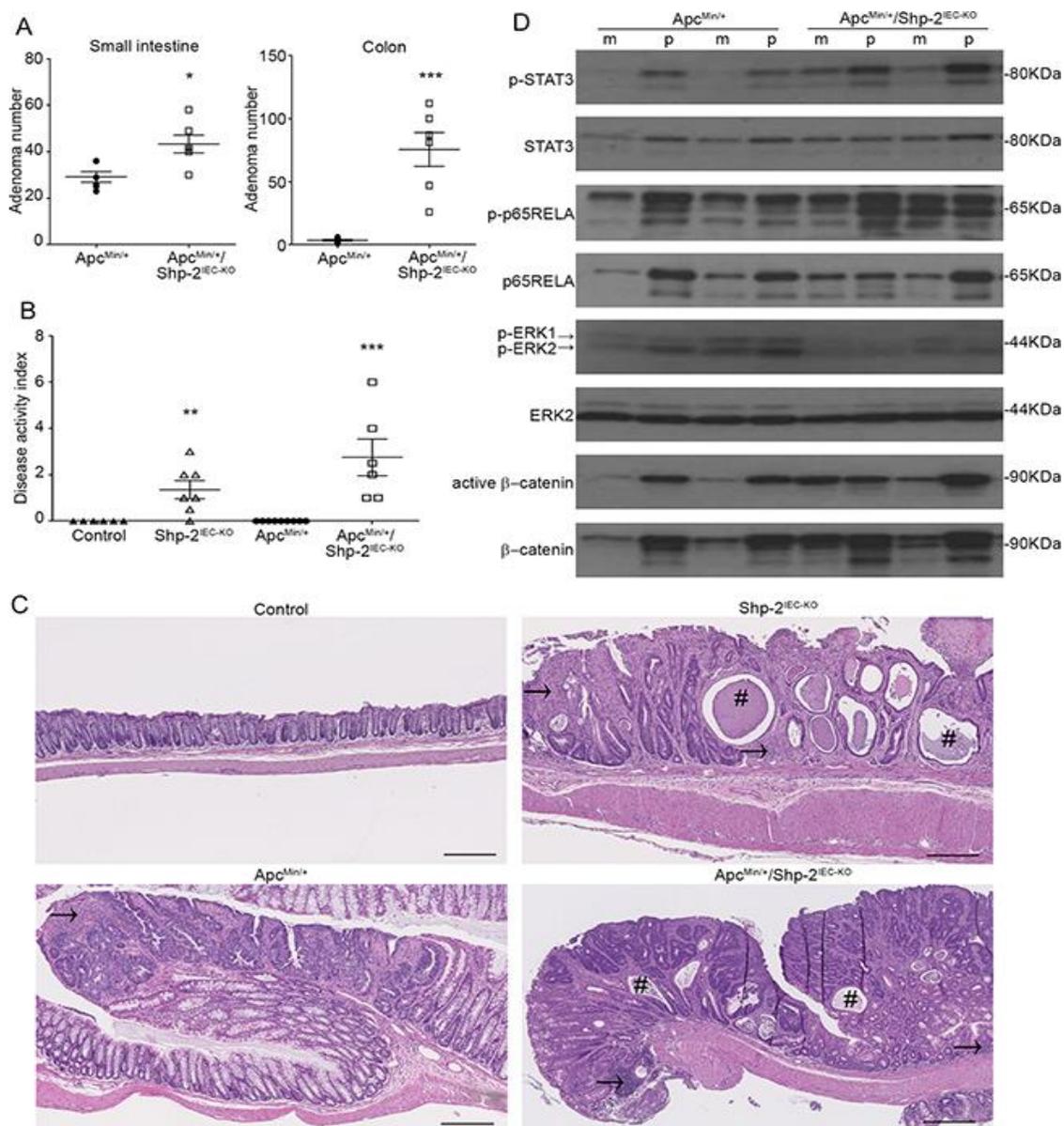


Figure 9 manuscript: IEC-specific Shp-2 ablation exacerbates tumorigenesis in *Apc*^{Min/+} mice. A. The number of polyps formed in the small intestine and colon was determined at 3 months of age in both *Apc*^{Min/+} and *Apc*^{Min/+} mice lacking Shp-2 expression (*Apc*^{Min/+}; *Shp-2*^{IEC-KO} mice) (N=6). B. Disease activity index of 3-month-old mice was calculated by scoring stool softness, occult fecal blood, rectal bleeding and colon rigidity (N=6). C. Representative images of 3-month-old control *Shp-2*^{IEC-KO}, *Apc*^{Min/+} and *Apc*^{Min/+}; *Shp-2*^{IEC-KO} murine colons. # indicates crypt abscesses and arrow shows immune cell infiltration. Scale bars: 100μm. D. Western blot analyses were performed on paired specimens of margins (m) and polyps (p) extracted from *Apc*^{Min/+} and *Apc*^{Min/+}; *Shp-2*^{IEC-KO} mice. Levels of total and phosphorylated ERK1/2 (T202/Y204), STAT3 (Y705) and p65NFκB (S536) as well as total and non-phospho (active) β-catenin were specifically analyzed. Representative immunoblot are shown. Data are expressed as mean ± SEM. *p≤0.05, **p≤0.01, ***p≤0.001.

DISCUSSION

Genetic and biochemical evidence strongly demonstrates that SHP-2 is essential for full activation of RAS/ERK MAPK pathway by most receptors [38-39]. Furthermore, activating mutations of *PTPN11* gene have also been described in the developmental disorder Noonan syndrome and in pediatric leukemias [40]. Likewise, somatic *PTPN11* mutations were found in certain solid tumors such as lung, liver and CRCs [18]. These studies therefore suggest that SHP-2 may be a bona fide oncoprotein [19].

Consistent with the above, SHP-2 was found to be overexpressed in gastric cancer, breast cancer and non-small cell lung cancer (NSCLC) [40-42]. However, there have been sparse reports regarding SHP-2 expression in CRC [43]. Recently, Cai *et al.* (2014) analyzed SHP-2 levels in 232 unpaired tumor specimens from patients with CRC. They found that low SHP-2 expression correlated with poor tumor differentiation, late TNM stage and lymph node metastasis. Herein, we found significant increase in SHP-2 mRNA and protein levels in colorectal adenomas and stage 1 tumors. Notably, the increased expression of SHP-2 was primarily detected in the hyperplastic epithelium and not in the lamina propria, indicating that SHP-2 may be involved early in the development of sporadic colorectal tumors. However, in more advanced CRCs, SHP-2 mRNA levels were not significantly modulated in comparison to their corresponding margins. We verified *PTPN11* gene promoter methylation in human colon specimens from the TCGA database (TCGA Research Network: <http://cancergenome.nih.gov>), interrogated and plotted using the TCGA Wanderer interface [44]. Overall, we did not find significant difference in *PTPN11* gene promoter methylation suggesting that it is not the mechanism by which *SHP-2* gene expression is regulated in advanced CRCs (data not shown). Since the epithelium to stroma ratio varies and changes considerably during tumor progression, one might speculate that this may influence protein/RNA quantification. It would be pertinent in the future to perform immunohistochemistry analyses in advanced tumors to verify SHP-2 expression in epithelial cells versus the surrounding stromal tissue.

Up to 60% of colorectal tumors exhibit gain-of-function mutations in *KRAS*, *NRAS* and *BRAF* genes [21-22]. These mutations generally occur early in the adenoma-carcinoma

sequence [21], triggering cell transformation, hyperproliferation and anoikis resistance [45-46]. Accordingly, most of colorectal adenomas analyzed herein exhibited *KRAS* (G12D, G13D, Q61H) or *BRAF* (V600E) activating mutations, in combination with *APC* inactivating mutations (exon 15) [24]. Considering the significance of SHP-2 in the control of RAS pathway, we speculated that this phosphatase likely plays an important role in colorectal carcinogenesis. Indeed, we found that SHP-2 silencing in *KRAS*-transformed IECs severely impaired both their proliferation rate and invasive capabilities. Moreover, cells displaying knocked-down SHP-2 exhibited reduced tumor formation capacity. Similarly, targeting SHP-2 by RNAi in human *KRAS* or *BRAF*-mutated established CRC cells limited their ability to grow in soft agar and to invade Matrigel. Interestingly, these inhibitory effects of SHP-2 silencing were associated with reduced phosphorylation of RAF, MEK and ERK proteins in cells expressing oncogenic *KRAS*. At first glance, these data are in agreement with those demonstrating that the phosphatase activity of SHP-2 is indeed necessary for full RAS activation. Accordingly, cells expressing dominant-negative SHP-2 [38] or *Ptpn11* gene exon 3-deleted mouse embryonic fibroblasts [39] exhibit defective RAS activation. Furthermore, SHP-2 may also function either downstream and/or in parallel to RAS since other data have shown that SHP-2 inhibition can impair the activation of downstream effectors even in the presence of oncogenic RAS [47]. Recent results have further demonstrated that SHP-2 binds and dephosphorylates both wild-type and oncogenic HRAS on Tyr32 in astrocytes and glioma cells, an event that increases RAS association with RAF-1 and downstream MEK/ERK activation [48]. Herein, dysregulated phosphorylation of RAF-1 was observed in SHP-2 deficient cells expressing oncogenic *KRAS*. Since Tyr32 is conserved in human and mouse *KRAS* proteins, our data suggest that SHP-2 may also target *KRAS* in IECs, enhancing the stimulation of downstream proliferative RAS/MEK/ERK kinases.

The somatic E76G mutation specifically found in colorectal cancer specimens disrupts the inhibitory intramolecular interaction within the PTP domain and leads to the hyperactivation of SHP-2 [40]. Given the latter, we speculated that by inducing the RAS/ERK signaling pathway, expression of the SHP-2 E76 mutant in IECs would be sufficient to trigger intestinal neoplasia. However, *Ptpn11* E76K knock-in mice failed to develop any intestinal

tumors after 1 year. These findings hence indicate that SHP-2 does not function as a classical oncogene in intestinal epithelium. SHP-2 may need to cooperate with additional oncogenic events such as the loss of the *Apc* gene to initiate intestinal neoplasia. Our findings hence support the model in which constitutive activation of SHP-2 drives the development of adenoma in the intestine of *Apc*^{Min/+} mice. SHP-2 expression appears to be required for full activation of ERK1/2 both in normal intestinal epithelium [14] and *Apc*-mutated epithelium (Figure 9D). An important role of the ERK pathway in the establishment of the Min phenotype has moreover been previously described [31]. Therefore, in addition to the inactivation of *Apc*, activation of ERK signaling, either by the activation of SHP-2 as demonstrated herein or by mutation of KRAS [49], appears to act synergistically resulting in increased tumor multiplicity in the intestine.

In addition, we further demonstrate that mice with conditional deletion of *Shp-2* in IECs developed colorectal adenocarcinomas with age. These adenocarcinomas exhibited several features that distinguish colitis-associated cancer including mucosal ulcerations, regenerative proliferation and persistent histological inflammation [50]. Likewise, signs of oxidative stress (increased *Nox1*, *Ho-1*, *iNos* and *Cox-2*) and DNA damage (phospho-H2AX) were also observed in the colon of aged *Shp-2*^{IEC-KO} mice. A major mechanism that links inflammation to proneoplastic genetic alterations involved in the pathogenesis of CAC is oxidative stress [50]. Oxidative stress is mainly produced by cells of the innate immune system such as macrophages and granulocytes which generate various reactive oxygen and nitrogen species (ROS, NOS) which impose a persistent mutational pressure to IECs, resulting in DNA breaks and adducts. In this regard, base transversions in *TP53* gene were often observed in UC patients who develop CAC, and oxidative DNA damage may presumably be responsible for these errors [36,51]. Accordingly, increased levels of the mutant form of p53 (R273H), a hot spot residue in CRC [52], were detected in inflamed mucosae from aged *Shp-2*^{IEC-KO} mice. Moreover, in recent years, major pro-inflammatory pathways have been implicated in inflammation-associated tumor development. Among these, the transcription factors NFκB and STAT3 have taken center stage [16-17]. Indeed, Greten *et al.* showed that deletion of *IKKβ* in IECs resulted in decreased numbers of tumors and increased apoptosis in the azoxymethane (AOM)-dextran sodium sulfate (DSS) model

[53]. Besides, specific STAT3 ablation in IECs interfered with tumor formation and tumor growth in the AOM-DSS model [33]. Conversely, IEC-specific *Socs3* ablation or expression of the SOCS3-binding deficient *gp130^{Y757F}* mutation both inducing STAT3 activation, promoted colonic tumor growth and incidence [33, 54]. Thus, tumor cell-specific NFκB and STAT3 signalings appear to be required for inflammation-associated tumor initiation in the colon [2], likely by inducing the expression of pro-proliferative, anti-apoptotic and immune response genes [33]. Furthermore, activated NFκB can suppress p53 acetylation and transactivation through sequestration of CBP or p300 [55], inhibiting p53 tumor suppressor function [56]. Interestingly, NFκB and STAT3 have both been shown to be hyperphosphorylated in the colonic epithelium of 1-month [14] and 15-month-old *Shp-2^{IEC-KO}* mice. Furthermore, levels of acetylated p53 were markedly downregulated in the colon of these mice, thereby creating permissive conditions for oncogenic transformation. The exact mechanism by which *Shp-2* ablation in IECs induces NFκB and STAT3 activation is not totally clear. However, we can speculate that this is an IEC-intrinsic consequence of *Shp-2* inactivation since SHP-2 silencing in cultured IECs increases the levels of phosphorylated STAT3 and p65RELA [14]. Furthermore, SHP-2 can closely regulate phosphorylation and activation of both of these transcription factors in several cell types [9].

Paradoxically, activation of NFκB and STAT3 in IECs specifically has been demonstrated to protect the gut against inflammation. Indeed, conditional IEC-specific deletion of NEMO (essential for NFκB activation) spontaneously caused colon inflammation [57]. Likewise, mice with deletion of STAT3 in IECs showed increased susceptibility to DSS [58] and to *Citrobacter rodentium* infection [59]. Hence, both NFκB and STAT3 expressed in IECs exert a protective, homeostatic function under physiological conditions [57]. Therefore, this indicates that *Shp-2^{IEC-KO}* mice develop colitis despite the rapid and persistent activation of STAT3 and NFκB in IECs. We cannot exclude however that excessive activation of STAT3 and/or NFκB might also contribute to the pathogenesis of the inflammatory phenotype in *Shp-2^{IEC-KO}* mice [60-61]. Nevertheless, by inducing chronic inflammation as well as STAT3 and NFκB activation, IEC-specific deletion of *Shp-2* results in the formation and growth of pre-malignant and malignant lesions typical of colitis-associated carcinogenesis.

Our data also reveal that SHP-2 inactivation in IECs considerably exacerbated mutant *Apc*-initiated transformation, notably shifting tumor incidence toward the colon. Similarly, 1-week treatment of *Apc*^{Min/+} mice with Dextran Sulfate Sodium (DSS), which causes acute colonic inflammation, was found to markedly increase the multiplicity and incidence of colonic neoplasms in these mice [62]. These findings thus reinforce the notion that SHP-2 exerts a tumor suppressive action in the colon by inhibiting the development of inflammation [14], probably through the maintenance of appropriate colonic barrier function [63]. Such anti-oncogenic action of SHP-2 was also recently described in a mouse model of liver cancer [15] in which mice with hepatocyte-specific deletion of *Shp-2* developed severe inflammation in the liver leading to tumor development.

Our study thus demonstrated that both activation and inactivation of Shp-2 in mouse colonic epithelium promotes tumor development. Such dual role for Shp-2 in cancer development was also previously proposed in the liver [64-65]. However, it is important to emphasize that inactivation of Shp-2 in the colon epithelium was much more detrimental for the mice than the activation of Shp-2. Indeed, *Shp-2*^{IEC-KO} mice showed severe diarrhea and rectal bleeding with higher mortality in comparison to controls. By contrast, no difference on survival rate was noticed between *Shp-2*^{IEC-E76K} mice and their control littermates. Furthermore, all *Shp-2*^{IEC-KO} mice developed colorectal adenocarcinomas with age; however, no *Shp-2*^{IEC-E76K} have developed intestinal neoplasia after 15 months of age. Lastly, colonic tumor multiplicity in *Apc*^{Min/+} mice was much more increased by *Shp-2* deletion (35-fold) than by *Shp-2* activation (3-fold).

Although the molecular mechanisms underlying the opposing actions of SHP-2 in IECs remain to be clarified, they may predominantly rely on the ability of SHP-2 to activate ERK signaling. Indeed, the ERK pathway, which is consistently stimulated upon activation of SHP-2 [8-10, 14], is commonly associated with intestinal crypt cell proliferation and tumorigenesis [31, 66]. Conversely, activation of ERK in secretory progenitors has been recently shown to direct Goblet cell differentiation [63,67] and these cells are crucial for the maintenance of barrier function and the prevention of intestinal inflammation [68]. More specifically, Heuberger *et al.* also found that ERK signaling controls secretory cell fate in

the small intestine by negatively regulating Wnt/ β -catenin activity. Unfortunately, they did not analyze β -catenin protein expression but they showed, in intestinal organoids and cultured cells, that ERK inhibition changed the relative abundance of Tcf4 isoforms [67]. How exactly SHP-2 regulates β -catenin protein levels remains therefore to be examined. Intriguingly, we previously reported that ectopic expression of SHP-1, a SHP-2 paralog, stimulates β -catenin proteasomal degradation, decreasing its transcriptional activity [69]. Current experiments are in progress to verify if SHP-2 can similarly regulate β -catenin stability and activity in cultured IECs.

In conclusion, the present study reveals that SHP-2 exerts opposing functions, pro-oncogenic versus anti-oncogenic (by inhibiting inflammation), in the colon epithelium. These opposing functions for SHP-2 may depend on cellular context (transit-amplifying cells, secretory progenitor cells). Further studies are required to identify the binding partner proteins of SHP-2 that may direct these opposing cellular responses under physiological and pathological conditions.

MATERIALS AND METHODS

Antibodies. Primary antibodies were obtained from the following sources: SHP-2, MEK1/2, ERK2, phospho-RAF1 (Y340/Y341), RAF1, KI67 and γ H2AX from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), phospho-ERK1/2 (T202/Y204) from Sigma-Aldrich (Mississauga, ON, Canada), β -actin from Chemicon International (Billerica, MA, USA), GAPDH (HRP conjugate), phospho-RELA (S536), RELA, phospho-STAT3 (Y705), STAT3, phospho-RAF-1 (S259), phospho-RAF-1 (S338), non-phospho (active) β -catenin, phospho-AKT (S473), AKT, acetylated-p53 (K379) and phospho-MEK1/2 (S218/S222) from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA), total p53 and mutant-p53 (R273H) from Abcam (Toronto, ON, Canada) and β -catenin from BD Pharmingen (Mississauga, ON, Canada). Mouse and rabbit horseradish peroxidase antibodies were purchased from Amersham Biosciences (Pittsburg, PA, USA). All other materials were from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada) unless stated otherwise.

Human colorectal tissues. Ninety four specimens of colon tumors and paired normal tissues (at least 10 cm from the tumor) were obtained from patients undergoing surgical resection and were processed as previously described [70]. Patients did not receive neoadjuvant therapy. Tissues were collected after obtaining the patient's written informed consent, according to the protocol approved by the Institutional Human Subject Review Board of the Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke. Pathological and clinical data were obtained from medical records and are provided in Supplementary Table S1.

Cell culture. The rat intestinal epithelial crypt cells IEC-6 stably overexpressing empty vector (pBabepuro) or KRAS^{G12V} mutant were generated after retroviral infection and were previously characterized and cultured as described [23]. The colon carcinoma cell lines SW480, HT29 and DLD-1 were cultured as described [70-71]. HT-29 and SW480 cell lines were purchased from ATCC (Manassas, VA, USA) in October 2014 and DLD-1 were authenticated using Cell authentication service from ATCC in October 2014.

Generation of shRNA, production of lentiviruses production and cell infection or transfection. The lentiviral shRNA expression vector (pLenti6-U6) was constructed as described [60]. Sequences of rat shRNA oligonucleotides are available upon request [14]. Irrelevant pLenti-shRNA with the scrambled rat shShp-2 sequence was used as negative control (shControl). Lentiviruses produced in 293T cells were used for infection of IEC-6 cells according to Invitrogen recommendations. To knock down SHP-2 in human colorectal cancer cells, cells were transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Waltham, MA, USA) with 50nMol SHP-2 siRNA corresponding to fw5'-UAAAUCGGUACUGUGCUUCUGUCUG-3' and rev5'-CAGACAGAAGCACAGACC GAUUUA-3' for siRNA#1 or to fwd5'-AAUAUUUGUAUAUUCGUGCCCUUUC3' and rev5'GAAAGGGCACGAAUAUACAAAUAUU-3' for siRNA#2 (IDT, Coralville, IA, USA) as described by Wang HC *et al.* [72]. A scrambled siRNA was also used as a control (siCTL-Invitrogen Stealth™ RNAi Negative Control LOGC).

Western blot analysis. Protein extractions and Western blot analyses were performed as described [14, 24].

Cell proliferation, soft agarose and migration/invasion assays. Experiments were started 7 days post-selection (for pLenti-shRNA infection) or 48 hours post transfection (for RNAi). For growth assays, cells were seeded in 6-well plates (3.5×10^4 cells/well). The number of cells was calculated daily for 7 days using a Cell particle counter (Invitrogen). Soft agarose and migration/invasion assays (Biocoat Matrigel, Becton Dickinson, Bedford, MA, USA) were performed as reported [70]. Cells were visualized by inverted light microscopy (Zeiss apparatus) and crystal violet stained inserts were visualized by light microscopy (Leica apparatus). Cell count was obtained with ImageJ software. For all experiments, three different cell populations originating from three different infections (shRNA) or transfections (siRNA) were analyzed.

Immunocompromised mice. CD1 nu/nu mice were purchased from Charles River Laboratory (Wilmington, MA, USA). Mice were housed in individually-ventilated cages.

Food, water, bedding and cages were sterilized. Experiments were approved by the Animal Research Committee of the Faculty of Medicine and Health Sciences of the Université de Sherbrooke. A total of 5×10^5 cells suspended in 0.1 ml DMEM were injected into the dorsal subcutaneous tissue of 7-week-old female mice. Tumor volume was determined every 3 days by external measurement according to the formula $(d^2 \times D)/2$. Three different cell populations originating from three different viral infections and different virus productions were assessed in minimally four different mice per population, for a total of 13 mice.

Conditional KO and KI mice. *Shp-2* floxed allele mice [14] were previously crossed with *Villin-Cre* mice (Jackson Laboratory) to specifically delete *Shp-2* in the intestinal epithelium (referred as *Shp-2^{IEC-KO}*) [14]. Knock-in *Ptpn11^{E76K/+}* mice [29] (on C57BL6/J background) were crossed with *Villin-Cre* mice to specifically express heterozygote *Shp-2^{E76K/+}* mutant in the intestinal epithelium (referred as *Shp-2^{IEC-E76K}*). Only homozygote *Shp-2^{+/+}* mice were used as control littermates. C57BL6/J-*Apc^{Min/+}* mice were obtained from Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). These mice were mated to generate *Apc^{Min/+}; Shp-2^{IEC-KO}* and *Apc^{Min/+}; Shp-2^{IEC-E76K}* models. The first cross was between the *Villin-Cre* and *Apc^{Min/+}* mice. The double heterozygous mice were then bred with *Shp2^{fllox/fllox}* mice one time and the triple heterozygous mice were finally bred with *Shp2^{fllox/fllox}* mice to generate the experimental mice (*Apc^{Min/+}; Shp-2^{IEC-KO}*) and control littermates. The double heterozygous *Apc^{Min/+}; Villin-Cre* mice were also bred with *Ptpn11^{E76K/+}* mice to generate the triple heterozygous experimental mice and their control littermates. Genomic DNA was isolated using the Spin Doctor genomic DNA kit from Gerard Biotech following the manufacturer's protocol. For the knock-in *Shp-2^{IEC-E76K}* mice, loss of *Neo* cassette was measured by PCR analysis to validate the *Shp-2^{E76K}* expression in intestinal tissue [29]. PCR conditions and primer sequences used for genotyping are available upon request. All experiments in mice were approved by the Animal Research Ethics Committee of the Faculty of Medicine and Health Sciences of the Université de Sherbrooke.

Histological staining, immunohistochemistry and macroadenoma counts. Colons were fixed, sectioned and stained as described previously [73]. Fibrosis was visualized using Trichrome Stain (Masson) Kit (Sigma-Aldrich). Polyps were counted and measured in the gastrointestinal tract from stomach to rectum of control and mutant *Apc*^{Min/+} littermates as previously described [73-74].

RNA extraction and quantitative RT-PCR analysis. RNA was isolated from the scraped colonic mucosa of mice using the RNeasy minikit (Qiagen). RT-PCR was performed using AMV-RT (Roche Diagnostics) according to the manufacturer's instructions and quantitative PCR was performed by the RNomics Platform at the Université de Sherbrooke (Sherbrooke, QC, Canada). All primer sequences and cycling conditions are available upon request.

Statistical analysis and figure editing. All assays were minimally performed in triplicate. Typical results shown are representative of 3 independent experiments and data are expressed as mean \pm SEM. Densitometric analysis was performed using ImageJ software. Results were analyzed using the Student's *t*-test and were considered statistically significant at $p \leq 0.05$. Graphs and statistics were generated with Graphpad Prism (Graphpad Software Inc., LaJolla, CA) and figures were constructed using Photoshop software.

Abbreviations. AOM, azoxymethane; APC, adenomatous polyposis coli; CAC, colitis-associated cancer; Cox-2, cyclooxygenase-2; CRC, colorectal cancer; DSS, dextran sulfate sodium; EGF, epidermal growth factor; ERK, extracellular signal regulated kinase; IBD, inflammatory bowel diseases; IEC, intestinal epithelial cell; IKK β , I κ B kinase; iNOS, JAK, Janus-associated kinase; JNK, c-jun N-terminal kinase; MAPK, mitogen-activated protein kinase; NF κ B, nuclear factor kappa B; NOS, nitrogen oxygen species; NSCLC, non-small cell lung cancer; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; RELA, v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A; ROS, reactive oxygen species; Ser, serine; SHP-2, Src homology 2-domain-containing phosphatase; shRNA: short hairpin RNA; SOCS3, suppressor of cytokine signaling 3; STAT, signal transducer and activator of transcription; Tyr, tyrosine; UC, Ulcerative colitis.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Claire Hamel and Gérald Bernatchez for technical assistance. We thank the Electron Microscopy & Histology Research Core of the FMSS at the Université de Sherbrooke for histology, electron microscopy, and phenotyping services.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that they have no competing interests.

GRANT SUPPORT

The biobank of colorectal cancer specimens was supported by a Team grant on digestive epithelium from the Canadian Institutes of Health Research. Jessica Gagné-Sansfaçon is student scholar from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). Nathalie Rivard and Julie C Carrier are members of the FRSQ-Funded Centre de Recherche du CHUS. Nathalie Rivard is a recipient of a Canadian Research Chair in colorectal cancer and inflammatory cell signaling. This research was supported by grants from the Cancer Research Society and Canadian Institutes of Health Research to NR.

REFERENCES

1. Grivennikov SI. Inflammation and colorectal cancer: colitis-associated neoplasia. *Semin Immunopathol.* 2013; 35: 229-244.
2. Foersch S, Waldner MJ and Neurath MF. Colitis and colorectal cancer. *Dig Dis.* 2012; 30: 469-476.
3. Smith G, Carey FA, Beattie J, Wilkie MJ, Lightfoot TJ, Coxhead J, Garner RC, Steele RJ and Wolf CR. Mutations in APC, Kirsten-ras and p53--alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99: 9433-9438.
4. George B and Kopetz S. Predictive and prognostic markers in colorectal cancer. *Curr Oncol Rep.* 2011; 13: 206-215.
5. Thorsteinsdottir S, Gudjonsson T, Nielsen Ole H, Vainer B and Seidelin JB. Pathogenesis and biomarkers of carcinogenesis in ulcerative colitis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2011; 8: 395-404.
6. Narumi Y, Isomoto H, Shiota M, Sato K, Kondo S, Machida H, Yanagihara K, Mizuta Y, Kohno S and Tsukamoto K. Polymorphisms of PTPN11 coding SHP-2 as biomarkers for ulcerative colitis susceptibility in the Japanese population. *J Clin Immunol.* 2009; 29: 303-310
7. Grossmann KS, Rosário M, Birchmeier C and Birchmeier W. The tyrosine phosphatase Shp2 in development and cancer, *Adv Cancer Res.* 2010; 106: 53-89
8. Qu CK, Yu WM, Azzarelli B and Feng GS. Genetic evidence that Shp-2 tyrosine phosphatase is a signal enhancer of the epidermal growth factor receptor in mammals. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96: 8528-8533.
9. Neel BG, Gu H and Pao L. The 'Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. *Trends Biochem Sci.* 2003; 28: 284-293.
10. Rivard N, McKenzie FR, Brondello JM and Pouyssegur J. The phosphotyrosine phosphatase PTP1D, but not PTP1C, is an essential mediator of fibroblast proliferation induced by tyrosine kinase and G protein-coupled receptors. *J Biol Chem.* 1995; 270: 11017-11024.
11. Xu D and Qu CK. Protein tyrosine phosphatases in the JAK/STAT pathway. *Front Biosci.* 2008; 13: 4925-4932.
12. Ivins ZC, Kontaridis MI, Fornaro M, Feng GS and Bennett AM. SHP-2 regulates the phosphatidylinositide 3'-kinase/Akt pathway and suppresses caspase 3-mediated apoptosis. *J Cell Physiol.* 2004; 199: 227-236.
13. Kontaridis MI, Eminaga S, Fornaro M, Zito CI, Sordella R, Settleman J and Bennett AM. SHP-2 positively regulates myogenesis by coupling to the Rho GTPase signaling pathway. *Mol Cell Biol.* 2004; 24: 5340-5352.

14. Coulombe G, Leblanc C, Cagnol S, Maloum F, Lemieux E, Perreault N, Feng GS, Boudreau F and Rivard N. Epithelial tyrosine phosphatase SHP-2 protects against intestinal inflammation in mice. *Mol Cell Biol.* 2013; 33: 2275-2284.
15. Bard-Chapeau EA, Li S, Ding J, Zhang SS, Zhu HH, Princen F, Fang DD, Han T, Bailly-Maitre B, Poli V, Varki NM, Wang H and Feng GS. Ptpn11/Shp2 acts as a tumor suppressor in hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Cell.* 2011; 19: 629-639.
16. Waldner MJ and Neurath MF. Mechanisms of immune signaling in colitis-associated cancer. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2014; 1: 6-16.
17. Viennois E, Chen F and Merlin D. NF- κ B pathway in colitis-associated cancers. *Transl Gastrointest Cancer.* 2013; 1: 21-29.
18. Bentires-Alj M, Paez JG, David FS, Keilhack H, Halmos B, Naoki K, Maris JM, Richardson A, Bardelli A, Sugarbaker DJ, Richards WG, Du J, Girard L *et al.* Activating mutations of the Noonan syndrome-associated SHP2/PTPN11 gene in human solid tumors and adult acute myelogenous leukemia. *Cancer Res.* 2004; 64: 8816-8820.
19. Miyamoto D, Miyamoto M, Takahashi A, Yomogita Y, Higashi H, Kondo S and Hatakeyama M. Isolation of a distinct class of gain-of-function SHP-2 mutants with oncogenic RAS-like transforming activity from solid tumors. *Oncogene.* 2008; 27: 3508-3515.
20. Zheng H, Li S, Hsu P and Qu CK. Induction of a tumor-associated activating mutation in protein tyrosine phosphatase Ptpn11 (Shp2) enhances mitochondrial metabolism, leading to oxidative stress and senescence. *J Biol Chem.* 2013; 288: 25727-25738.
21. Malumbres M and Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3: 459-465.
22. Pretlow TP and Pretlow TG. Mutant KRAS in aberrant crypt foci (ACF): initiation of colorectal cancer? *Biochim Biophys Acta.* 2005; 1756: 83-96.
23. Cagnol S and Rivard N. Oncogenic KRAS and BRAF activation of the MEK/ERK signaling pathway promotes expression of dual-specificity phosphatase 4 (DUSP4/MKP2) resulting in nuclear ERK1/2 inhibition. *Oncogene.* 2013; 32: 564-576.
24. Lemieux E, Cagnol S, Beaudry K, Carrier J and Rivard N. Oncogenic KRAS signalling promotes the Wnt/ β -catenin pathway through LRP6 in colorectal cancer. *Oncogene.* 2015; 34: 4914-4927.
25. Ikenoue T, Kanai F, Hikiba Y, Obata T, Tanaka Y, Imamura J, Ohta M, Jazag A, Guleng B, Tateishi K, Asaoka Y, Matsumura M, Kawabe T *et al.* Functional analysis of PIK3CA gene mutations in human colorectal cancer. *Cancer Res.* 2005; 65: 4562-4567.
26. Li WQ, Kawakami K, Ruszkiewicz A, Bennett G, Moore J and Lacopetta B. BRAF mutations are associated with distinctive clinical, pathological and molecular features of colorectal cancer independently of microsatellite instability status. *Mol Cancer.* 2006; 5: 2.

27. Lavoie H and Therrien M. Regulation of RAF protein kinases in ERK signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015; 16: 281-298.
28. Jelinek T, Dent P Sturgill TW and Weber MJ. Ras-induced activation of Raf-1 is dependent on tyrosine phosphorylation. *Mol Cell Biol.* 1996; 3: 1027-1034.
29. Xu D, Liu X, Yu WM, Meyerson HJ, Guo C, Gerson SL and Qu CK. Non-lineage/stage-restricted effects of a gain-of-function mutation in tyrosine phosphatase Ptpn11 (Shp2) on malignant transformation of hematopoietic cells. *J Exp Med.* 2011; 208: 1977-1988.
30. Moser AR, Pitot HC and Dove WF. A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science.* 1990; 247: 322-324.
31. Lee SH, Hu LL, Gonzalez-Navajas J, Seo GS, Shen C, Brick J, Herdman S, Varki N, Corr M, Lee J and Raz E. ERK activation drives intestinal tumorigenesis in *Apc(Min/+)* mice. *Nat Med.* 2010; 16: 665-670.
32. Fantini MC and Pallone F. Cytokines: from gut inflammation to colorectal cancer. *Curr Drug Targets.* 2008; 5: 375-380.
33. Grivennikov S, Karin E, Terzic J, Mucida D, Yu GY, Vallabhapurapu S, Scheller J, Rose-John S, Cheroutre H, Eckmann L and Karin M. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell.* 2009; 15: 103-113.
34. Atreya R and Neurath MF. Involvement of IL-6 in the pathogenesis of inflammatory bowel disease and colon cancer. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2005; 3: 187-196.
35. Francescone R, Hou V and Grivennikov SI. Cytokines, IBD, and colitis-associated cancer. *Inflamm Bowel Dis.* 2015; 21: 409-418.
36. Seril DN, Liao J, Yang GY and Yang CS. Oxidative stress and ulcerative colitis-associated carcinogenesis: studies in humans and animal models. *Carcinogenesis.* 2003; 24: 353-362.
37. Hussain SP, Amstad P, Raja K, Ambs S, Nagashima M, Bennett WP, Shields PG, Ham AJ, Swenberg JA, Marrogi AJ and Harris CC. Increased p53 mutation load in noncancerous colon tissue from ulcerative colitis: a cancer-prone chronic inflammatory disease. *Cancer Res.* 2000; 60: 3333-3337.
38. Noguchi T, Matozaki T, Horita K, Fujioka Y and Kasuga M. Role of SH-PTP2, a protein-tyrosine phosphatase with Src homology 2 domains, in insulin-stimulated Ras activation. *Mol Cell Biol.* 1994; 14: 6674-6682.
39. Shi ZQ, Yu DH, Park M, Marshall M and Feng GS. Molecular mechanism for the Shp-2 tyrosine phosphatase function in promoting growth factor stimulation of Erk activity. *Mol Cell Biol.* 2000; 20:1526-1536.
40. Zheng H, Alter S and Qu CK. SHP-2 tyrosine phosphatase in human diseases. *Int J Clin Exp Med.* 2009; 2: 17-25.

41. Coulombe G and Rivard N. New and unexpected biological functions for the Src-Homology 2 Domain-Containing Phosphatase SHP-2 in the gastrointestinal tract. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2015; 2: 11-21.
42. Huang WQ, Lin Q, Zhuang X, Cai LL, Ruan RS, Lu ZX and Tzeng CM. Structure, function, and pathogenesis of SHP2 in developmental disorders and tumorigenesis. *Curr Cancer Drug Targets*. 2014; 14: 567-588.
43. Cai P, Guo W, Yuan H, Li Q, Wang W, Sun Y, Li X and Gu Y. Expression and clinical significance of tyrosine phosphatase SHP-2 in colon cancer. *Biomed Pharmacother*. 2014; 68: 285-290.
44. Villanueva DA, Mallona I and Peinado MA. Wanderer, an interactive viewer to explore DNA methylation and gene expression data in human cancer. *Epigenetics Chromatin*. 2015; 8:22.
45. Smakman N, Veenendaal LM, van Diest P, Bos R, Offringa R, Borel Rinkes IH and Kranenburg O. Dual effect of Kras (D12) knockdown on tumorigenesis: increased immune-mediated tumor clearance and abrogation of tumor malignancy. *Oncogene*. 2005; 24: 8338-8342.
46. Langlois MJ, Bergeron S, Bernatchez G, Boudreau F, Saucier C, Perreault N, Carrier JC and Rivard N. The PTEN phosphatase controls intestinal epithelial cell polarity and barrier function: role in colorectal cancer progression. *PLoS One*. 2010; 5:e15742
47. Yamauchi K, Milarski KL, Saltiel AR and Pessin JE. Protein-tyrosine-phosphatase SHPTP2 is a required positive effector for insulin downstream signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92: 664-668.
48. Bunda S, Burrell K, Heir P, Zeng L, Alamsahebpour A, Kano Y, Raught B, Zhang ZY, Zadeh G and Ohh M. Inhibition of SHP2-mediated dephosphorylation of Ras suppresses oncogenesis. *Nat Commun*. 2015; 6: 8859.
49. Janssen KP, Alberici P, Fsihi H, Gaspar C, Breukel C, Franken P, Rosty C, Abal M, El Marjou F, Smits R, Louvard D, Fodde R and Robine S. APC and oncogenic KRAS are synergistic in enhancing Wnt signaling in intestinal tumor formation and progression. *Gastroenterology*. 2006; 131: 1096-1109.
50. Rogler G. Chronic ulcerative colitis and colorectal cancer. *Cancer Lett*. 2014; 345: 235-241.
51. Martinez CA, Bartocci PC, do Carmo CV, Pereira JA, Miranda DD, Ribeiro ML. The effects of oxidative DNA damage and mutations in the p53 protein on cells of the colonic mucosa with and without the fecal stream: an experimental study in rats. *Scand J Gastroenterol*. 2010; 45:714-24.
52. Liu Y and Bodmer FW. Analysis of P53 mutations and their expression in 56 colorectal cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103:976-81.
53. Greten FR, Eckmann L, Greten TF, Park JM, Li ZW, Egan LJ, Kagnoff MF and Karin M. IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell*. 2004; 3: 285-296.

54. Bollrath J, Phesse TJ, von Burstin VA, Putoczki T, Bennecke M, Bateman T, Nebelsiek T, Lundgren-May T, Canli O, Schwitalla S, Matthews V, Schmid RM, Kirchner T *et al.* gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis. *Cancer Cell.* 2009; 15: 91-102.
55. Webster GA and Perkins ND. Transcriptional cross talk between NF-kappaB and p53. *Mol Cell Biol.* 1999; 19: 3485-3495.
56. Gudkov AV, Gurova KV and Komarova EA. Inflammation and p53: A Tale of Two Stresses. *Genes Cancer.* 2011; 2: 503-516. doi: 10.1177/1947601911409747.
57. Nenci A, Becker C, Wullaert A, Gareus R, van Loo G, Danese S, Huth M, Nikolaev A, Neufert C, Madison B, Gumucio D, Neurath MF and Pasparakis M. Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation. *Nature.* 2007; 446:557-61.
58. Pickert G, Neufert C, Leppkes M, Zheng Y, Wittkopf N, Warntjen M, Lehr HA, Hirth S, Weigmann B, Ouyang W, Neurath MF and Becker C.. STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing. *J Exp Med.* 2009; 206:1465-72.
59. Wittkopf N, Pickert G, Billmeier U, Mahapatro M, Wirtz S, Martini E, Leppkes M, Neurath MF and Becker C. Activation of intestinal epithelial Stat3 orchestrates tissue defense during gastrointestinal infection. *PLoS One.* 2015;10:e0118401.
60. Hutchins AP, Diez D and Miranda-Saavedra D. The IL-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response: recent developments and future challenges. *Brief Funct Genomics.* 2013;12:489-98.
61. Martínez-Augustin O, Rivero-Gutiérrez B, Mascaraque C and Sánchez de Medina F. Food derived bioactive peptides and intestinal barrier function. *Int J Mol Sci.* 2014; 15:22857-73.
62. Tanaka T, Kohno H, Suzuki R, Hata K, Sugie S, Niho N, Sakano K, Takahashi M and Wakabayashi K. Dextran sodium sulfate strongly promotes colorectal carcinogenesis in *Apc(Min/+)* mice: inflammatory stimuli by dextran sodium sulfate results in development of multiple colonic neoplasms. *Int J Cancer.* 2006; 118: 25-34.
63. Coulombe G, Langlois A, De Palma G, Langlois MJ, McCarville JL, Gagné-Sanfaçon J, Perreault N, Feng GS, Bercik P, Boudreau F, Verdu EF, Rivard N. SHP-2 Phosphatase Prevents Colonic Inflammation by Controlling Secretory Cell Differentiation and Maintaining Host-Microbiota Homeostasis. *J Cell Physiol.* 2016; 231:2529-40.
64. Li S, Hsu DDF, Wang H and Feng GS. Dual faces of SH2-containing protein-tyrosine phosphatase Shp2/PTPN11 in tumorigenesis. *Front Med.* 2012; 6: 275-279.
65. Feng GS. Conflicting roles of molecules in hepatocarcinogenesis: paradigm or paradox. *Cancer Cell.* 2012; 21: 150-154.
66. Fang JY and Richardson BC. The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. *Lancet Oncol.* 2005; 6:322-7.

67. Heuberger J, Kosel F, Qi J, Grossmann KS, Rajewsky K and Birchmeier W. Shp2/MAPK signaling controls goblet/paneth cell fate decisions in the intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014; 111:3472-7.
68. Van der Sluis M, De Koning BA, De Bruijn AC, Velcich A, Meijerink JP, Van Goudoever JB, Büller HA, Dekker J, Van Seuningen I, Renes IB and Einerhand AW. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology*. 2006; 131:117-29.
69. Simoneau M, Coulombe G, Vandal G, Vézina A and Rivard N. SHP-1 inhibits β -catenin function by inducing its degradation and interfering with its association with TATA-binding protein. *Cell Signal*. 2011; 23:269-79.
70. Bian B, Mongrain S, Cagnol S, Langlois MJ, Boulanger J, Bernatchez G, Carrier JC, Boudreau F and Rivard N. Cathepsin B promotes colorectal tumorigenesis, cell invasion, and metastasis. *Mol Carcinog*. 2016; 55:671-87.
71. Garneau H, Paquin MC, Carrier JC and Rivard N. E2F4 expression is required for cell cycle progression of normal intestinal crypt cells and colorectal cancer cells. *J Cell Physiol*. 2009; 221: 350-358.
72. Wang HC, Chiang WF, Huang HH, Shen YY and Chiang HC. Src-homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase 2 promotes oral cancer invasion and metastasis. *BMC Cancer*. 2014; 14: 442.
73. Langlois MJ, Roy SA, Auclair BA, Jones C, Boudreau F, Carrier JC, Rivard N and Perreault N. Epithelial phosphatase and tensin homolog regulates intestinal architecture and secretory cell commitment and acts as a modifier gene in neoplasia. *FASEB J*. 2009; 23: 1835-1844.
74. Perreault N, Sackett SD, Katz JP, Furth EE, Kaestner KH. Foxl1 is a mesenchymal Modifier of Min in carcinogenesis of stomach and colon. *Genes Dev*. 2005; 19:311-5.

III. RÉSULTATS NON PUBLIÉS

Mise en contexte

L'hypothèse générale de mon projet de thèse est que *l'activation de SHP-2 protège la muqueuse colique de l'inflammation mais promeut sa tumorigénèse*. Mon projet de thèse se divisait en trois objectifs principaux. Mon premier objectif était de déterminer la contribution de SHP-2 dans la carcinogénèse colorectale et les résultats qui en découlent ont été publiés précédemment (voir section précédente). Cette section traite plutôt des résultats découlant des seconds et derniers objectifs de mon projet, soit de vérifier si SHP-2 est un oncogène pour l'épithélium intestinal et d'évaluer le potentiel anti-inflammatoire de SHP-2 dans le côlon chez la souris.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

6.1 Anticorps

Les anticorps contre ERK2, Ki67, Muc2 et SHP-2 proviennent de chez Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA, USA). Les anticorps contre phospho-ERK (T202/Y204 #9101), HES1 et NOTCH clivé (Val1744) proviennent de chez Cell signaling (Danver, MA, USA), l'anticorps contre le lysozyme vient de chez DAKO (Copenhagen, Danemark) alors que l'anti-AGR2 vient de chez Abcam (ab22208; Toronto, ON, Canada), la lectine UEA (Ulex europaeus-I agglutinin) pré-couplée au FITC (isothiocyanate de fluorescéine) et anti-Flag de chez Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada), l'anti- β -caténine de chez BD Transduction Laboratories (310154; Mississauga, ON, Canada), l'anti-BrdU provient de la compagnie BD Bioscience (Mississauga, ON, Canada) et l'anticorps contre la β -actine de chez EMD millipore (clone 4, MAB1501R; Etobicoke, ON, Canada).

6.2 Génération et géotypage des souris expérimentales

Nous avons obtenu les souris *Ptpn11^{E76K^{Neo/+}}* suite à une collaboration avec Dr Cheng-Kui Qu de l'Université Emory d'Atlanta aux États-Unis. Ces souris ont été modifiées génétiquement afin de remplacer un allèle endogène de *Shp-2* par le gène codant pour le

mutant E76K de Shp-2 (Xu *et al.*, 2011). L'expression de cet allèle mutant est conditionnelle à l'ajout d'une recombinaison Cre qui permet de cibler à la fois le tissu désiré pour l'étude, mais également la fenêtre de temps pour son expression. Les souris *Ptpn11^{E76KNeo/+}* sont maintenues hétérozygotes puisque l'introduction de deux allèles mutants engendrerait une inhibition complète de Shp-2 dans l'organisme, ce qui est létal en soi (Xu *et al.*, 2011). Pour reproduire les souris *Ptpn11^{E76KNeo/+}*, celles-ci sont croisées avec des souris C57BL6/J (Charles River) tout simplement. Pour nos études, nous sommes intéressés aux rôles de Shp-2 dans les CEI. Les souris expérimentales, exprimant à la fois le mutant E76K de Shp-2 et la Cre (*Shp-2^{CEI-E76K}*), de même que les souris de type sauvage (*Shp-2^{+/+}*) qui ont servi comme contrôle, ont été générées à partir d'un même croisement entre les souris *Ptpn11^{E76KNeo/+}* et les souris *Villine-Cre^{+/-}* (P^{re} Deborah Gumucio, University of Michigan, MI, USA). Pour vérifier le rôle de Stat3 dans l'inflammation chez les souris *Shp2^{CEI-KO}* (Coulombe *et al.*, 2013), les souris *Stat3^{fx/fx}* ont été achetées chez Jackson Laboratory (B6.129S1-Stat3tm1Xyfu/J; Bar Harbor, ME, USA). Ces souris ont été croisées avec les souris *Shp-2^{fx/fx}* afin de produire des souris hétérozygotes *Shp-2^{fx/+};Stat3^{fx/+}*. Ces souris hétérozygotes ont ensuite été recroisées entre elles afin d'obtenir des souris homozygotes *Shp-2^{fx/fx};Stat3^{fx/fx}*. Ce sont ces dernières qui ont été croisées avec les souris *Villine-Cre* pour obtenir un intermédiaire pour la production des souris expérimentales. Afin d'obtenir à la fois les souris contrôles de type sauvage, les souris invalidées pour Shp-2 ou pour Stat3 et les doubles mutantes, les souris *Shp-2^{fx/+};Stat3^{fx/+};Villine-Cre^{+/-}* ont été accouplées avec les souris *Shp-2^{fx/+};Stat3^{fx/+}*. Toutes les souris ont été hébergées à l'Unité de Souris Transgéniques (UST) du Pavillon de la Recherche Appliquée sur le Cancer (PRAC) de l'Université de Sherbrooke et ont eu accès à de l'eau et à de la nourriture à volonté, sauf sous indications contraires. Toutes les expériences effectuées sur les animaux ont été approuvées par le Comité de l'Éthique de la Recherche Animale de la Faculté de médecine et des sciences de la santé (FMSS) de l'Université de Sherbrooke.

Tableau 1. Identification génétique des souris expérimentales

Génotype ciblé	Amorces utilisées*	Temp. (°C)	Nb cycles	Amplicon (pbs)
<i>Villine-Cre</i> ^{+/-}	5'-TGC CAC GAC CAA GTG ACA GCA ATG-3' 5'-ACC AGA GAC GGA AAT CCA TCG CTC-3'	55	35	340
<i>Shp-2</i> ^{E76K/+}	5'- TGG GAA GAC AAT AGC AGG CA-3' 5'- GGG AAT TGA ACT CAG GAC CT-3' 5'- CCC ACT CAC CTT GTC ATG TA-3'	55	35	280 (wt) 380 (E76K)
<i>Stat3</i> ^{fx/fx} <i>Stat3</i> ^{fx/+}	5'-TTG ACC TGT GCT CCT ACA AAA A -3' 5'-CCC TAG ATT AGG CCA GCA CA -3'	55	35	180 (wt) 100 (fx)
<i>Neo</i>	5'- CTT GGG TGG AGA GGC TAT TC -3' 5'- AGG TGA GAT GAC AGG AGA TC-3'	59	30	200
<i>Pbgd</i>	5'- TGC ACG ATC CTG AAA CTC TG- 3' 5'- TGC ATG CTA TCT GAG CCA TC-3'	59	30	162

* les amorces proviennent d'Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, IA, USA).

L'ADN génomique des souris a été isolé grâce à une incubation d'une heure à 95°C dans une solution de 25 mM NaOH/0.2 mM EDTA (Fisher Scientific; ON, Canada), suivie par une neutralisation avec un volume équivalent de 40 mM Tris-HCl (pH 5.5) (Sigma-Aldrich). La délétion de la cassette Stop/Neo qui est représentative de l'expression du mutant E76K de *Shp-2* a été validée par PCR sur des enrichissements de muqueuse intestinale prélevés lors du sacrifice. La séquence de chacune des amorces utilisées pour le génotypage des souris ainsi que les conditions pour l'amplification PCR (Bio-Rad; Hercules, CA, USA) sont présentées dans le tableau 1. Les souris *Shp-CE1-E76K* ont déjà fait l'objet d'une publication, dont le manuscrit est présenté dans la section précédente de ce document.

6.3 Induction de la colite chimique au *Dextran sulfate de sodium*

Le *Dextran sulfate de sodium* (DSS) de grade colite est un détergent de haut poids moléculaire spécifiquement conçu pour créer une colite dans les modèles animaux (36-50KDa, colitis grade; MP Biomedical; Solon-Ohio, CA, USA). Il provoque l'inflammation de la partie distale du côlon en solubilisant la barrière de mucus, en augmentant la perméabilité et en induisant l'apoptose des CEI, ce qui engendre le recrutement de cellules

immunitaires dans la muqueuse (Whittem *et al.*, 2010). Pour induire une colite aigue, 2.5%p/v de DSS est dissout dans l'eau de boisson des souris âgées de 12 à 14 semaines. Le traitement est d'une durée de 7 jours et le DSS est remplacé au milieu du traitement. À tous les matins, les souris sont pesées et la présence de diarrhée et de saignements est notée. À la fin du traitement de 7 jours, les souris sont sacrifiées, les signes de la colique sont mesurés et des extraits sont prélevés. Les signes cliniques de la colite sont évalués selon la charte de l'index de la maladie (DAI) établie par Cooper *et al.* en 1993. Cette charte mesure la présence de saignements rectaux, la consistance et le sang dans les fèces ainsi que la dureté du côlon. Chacun de ces critères est évalué sur une échelle de 0 à 4, puis additionné pour un score maximal de 16. Le rétrécissement de la longueur du côlon est également représentatif d'une inflammation active du côlon et la mesure est prise lors du sacrifice des animaux (Cooper *et al.*, 1993). L'inflammation de la muqueuse est mesurée selon l'échelle du score histologique sur les coupes histologiques obtenues suite à la fixation des côlons des souris et à une coloration hématoxyline/éosine. Cette échelle permet de quantifier la présence de l'érosion de la muqueuse, l'infiltration de cellules immunitaires, l'épaississement de la musculature, la diminution du nombre de cellules caliciformes et la présence d'abcès de cryptes (Erben *et al.*, 2014). Tous les scores ont été établis à l'aveugle pour ne pas influencer les résultats obtenus.

6.4 Induction de la colite infectieuse avec *Citrobacter rodentium*

Des souris *Shp-2^{CEI-E76K}* ainsi que des souris contrôles de type sauvage âgées entre 10 et 14 semaines ont été gavées avec $\sim 2.5 \times 10^8$ unité formatrice de colonie (CFU) de *Citrobacter rodentium* DBS100 streptomycine-résistantes (Tremblay *et al.*, 2017). Les souris ont été pesées et leurs fèces prélevées à tous les jours pendant 10 jours. L'homogénéisation des fèces a été effectuée avec des billes de Stainless de 3 mm dans 1.0mL de PBS 1X stérile avec le Mixer Mill MM400 (Retsch GmbH) pendant 5 minutes à une fréquence de 25/seconde. Par la suite les homogénats obtenus pour chacune des souris ont été dilués en série avant d'être ensemencés sur des plaques de LB agar contenant 100 µg/mL de Streptomycine (Sigma-Aldrich). Suite à une incubation sur la nuit à 37°C dans un incubateur, le nombre de CFU a été dénombré pour chacune des souris et reporté sur le poids des fèces. Les expériences de culture et la manipulation des fèces contaminées avec *C. rodentium* ont été effectuées dans

le laboratoire de confinement 2 du Pr Alfredo Menendez de l'Université de Sherbrooke. L'infection, la manipulation et l'euthanasie des souris contaminées avec *C. rodentium* ont été effectuées sous une hotte chimique dans un laboratoire de confinement 2, à la quarantaine de l'animalerie du PRAC de l'Université de Sherbrooke. L'index de la maladie (DAI) et le score histologique ont été mesurés tel que décrit précédemment.

6.5 Euthanasie et coupes histologiques

Avant le sacrifice des souris par dislocation cervicale, celles-ci sont injectées avec 1 µL par gramme de poids corporel de chlorhydrate de kétamine (Bioniche, Belleville, ON, Canada). Ensuite, l'intestin est prélevé et rincé avec du PBS 1X froid. Une observation sous un microscope peut être nécessaire pour évaluer la présence de tumeurs. Des segments de l'intestin grêle et du côlon sont fixés avec de la paraformaldéhyde 4%p/v (Sigma-Aldrich) pendant 12 heures à 4°C avant d'être rincés avec de l'éthanol 70%. Des segments de l'intestin grêle et du côlon sont également broyés et aliquotés pour l'extraction des acides nucléiques ou des protéines. L'inclusion en paraffine, les coupes histologiques et les colorations à l'hématoxyline/éosine ont été réalisées par la Plateforme d'histologie de la FMSS. Ces coupes histologiques ont été scannées grâce au Nanozoomer 2.0 RS (Hamamatsu Apparatus; Japon) et elles ont été analysées avec le logiciel NDP.view2. En ce qui concerne les souris *Shp-2^{CEI-E76K}* âgées de 15 mois, les coupes ont été envoyées au pathologiste Dr Sameh Geha du Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke (CHUS) pour une évaluation clinico-pathologique.

6.6 Migration *in vivo*

Afin de déterminer la vitesse de migration des CEI *in vivo*, des souris *Shp-2^{CEI-E76K}* ainsi que des souris contrôles ont été injectées dans le péritoine avec une solution de Bromodéoxyuridine (BrdU; 10 mg/kg) (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA). Les souris ont été euthanasiées et les tissus collectés 18 heures après l'injection. Les tissus ont été fixés avec 4%p/v PFA (Sigma-Aldrich) pendant 12 heures, puis placés dans de l'éthanol 70%. L'inclusion en paraffine et les coupes histologiques ont été réalisées par la Plateforme d'histologie de la FMSS. Une immunohistochimie (IHC) a été réalisée afin de visualiser les

cellules ayant incorporé le BrdU. La distance de migration a été mesurée à partir du fond de la crypte et en se basant sur la cellule marquée la plus haute. Cette mesure a été reportée sur la longueur totale de la crypte et exprimée en pourcentage.

6.7 Immunohistochimie et immunofluorescence

Une IHC a été effectuée sur des tissus de souris afin de quantifier le nombre de cellules prolifératives et de cellules de Paneth ainsi que la fucosylation des mucines chez des souris *Shp-2^{CEI-E76K}* âgées de 3 à 15 mois. Avant les IHC, les coupes histologiques ont été déparaffinées dans le xylène et réhydratées, puis placées dans une solution de 10mM d'acide citrique pH 6 (Fisher Scientific; ON, Canada) pour être bouillies au micro-onde 20 minutes. La solution utilisée pour le blocage de 30 minutes et pour la dilution des anticorps est le PBT, composé de BSA 2% (Sigma-Aldrich), de TritonX-100 0,1% (Fisher Scientific) et de PBS 1X frais. Après le blocage, l'excédent est éliminé et l'anticorps primaire est ajouté sur les tissus. Afin de limiter l'évaporation des anticorps, les lames sont conservées à plat dans une chambre humide à 4°C pour une période de 16 heures. La suite du protocole d'IHC a été réalisée selon les recommandations de la compagnie DAKO (K4011/ DAKO). Les lames ont été déshydratées dans des bains successifs d'éthanol 70%, 80%, 90%, 100% et de xylène, puis montées avec du Permount (SP15-100, Fisher Scientific). Pour l'immunofluorescence, une coloration au DAPI (Sigma-Aldrich) a permis de marquer le noyau des cellules avant de fixer les lames avec du Vectamount (H-5000, Vector Laboratories; Burlington, ON, Canada). Les photos ont été prises avec un Nanozoomer 2.0 RS (Hamamatsu Apparatus) et elles ont été analysées avec le logiciel NDP.view2.

6.8 Coloration à l'Alcian bleu

Une coloration à l'Alcian bleu a permis de marquer les mucines acides produites par les cellules caliciformes sur des coupes histologiques provenant de souris *Shp-2^{CEI-E76K}* et de souris contrôles âgées de 3 mois, ainsi que chez les souris infectées avec *C. rodentium*. De plus, une fixation du côlon pendant 4 heures avec un fixateur Carnoy (60% méthanol, 30 % chloroforme et 10% acide acétique/Fisher Scientific) a permis de conserver le mucus à la surface de la muqueuse pour mesurer son épaisseur chez les souris âgées de 3 mois. Avant

la coloration, les coupes histologiques sont déparaffinées et réhydratées, puis elles sont plongées dans une solution d'acide acétique 3%v/v durant 3 minutes. Ensuite, les lames sont colorées avec une solution d'Alcian bleu 1% diluée avec 3% d'acide acétique pH2,5 (Poly Scientific; Bay Shore, NY, USA) pour 30 minutes. Une étape de lavage à l'eau courante permet de rincer l'excédent de colorant sur les lames. Finalement, une coloration avec le Nuclear Fast Red 0,1% (Poly Scientific) pour 45 secondes permet de marquer le noyau des cellules. L'excès est rincé rapidement à l'eau courante et les lames sont déshydratées. Les lames sont montées avec du Permount (SP15-100, Fisher Scientific). Les photos ont été prises grâce au Nanozoomer 2.0 RS (Hamamatsu Apparatus) et elles ont été analysées avec le logiciel NDP.view2. Le nombre de cellules caliciformes a été compté à l'aveugle sur 15 cryptes par souris.

6.9 Microscopie électronique

Lors du sacrifice des souris, de petits morceaux de 2mm² provenant de l'intestin grêle et du côlon ont été fixés dans une solution de glutaraldéhyde 2,5%, diluée dans du tampon cacodylate de sodium 0.1M pH 7.4 (Electron microscopy sciences; Hatfield, PA, USA) au moins une nuit. Ensuite, les tissus ont été rincés dans le tampon cacodylate de sodium 0.1M et placés dans une solution de tétr oxyde d'osmium 1% (Electron microscopy sciences) pour 90 minutes. Les tissus ont été déshydratés à l'éthanol et à l'oxyde de propylène suivi d'une première étape d'infiltration avec de l'oxyde de propylène et de l'épon (1:1 X 1 heure), suivi de plusieurs étapes d'infiltration avec de l'épon seulement (Electron microscopy sciences). La polymérisation a été effectuée sur 2 jours à 65°C. Finalement, l'observation des lames en microscopie électronique à transmission a été réalisée grâce au microscope Hitachi H-7500 (Japon).

6.10 Extraction des ARN messagers, transcription inverse et PCR quantitatif

Les ARN messagers ont été extraits à partir de tissu provenant de l'intestin grêle et du côlon des souris ou à partir de lysats de culture cellulaire et d'organoïdes. Les prélèvements ont été placés dans 600µL de tampon RLT (Qiagen; ON, Canada) avant d'être broyés avec un TissueLyser LT (Qiagen). Les échantillons ont par la suite été centrifugés à 13 500 rpm à

4°C pendant 10 minutes, afin d'éliminer les débris de lyse. L'extraction des ARN a été effectuée en suivant les recommandations de la compagnie Qiagen et du produit RNeasy Mini Kit (74106, Qiagen). Les échantillons ont été traités en suivant le protocole complet de la compagnie, ce qui inclut un traitement avec de la DNase (Qiagen), puis les ARN ont été élués avec de l'eau stérile. La quantification a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA). Finalement, la réaction de transcription inverse a été réalisée en suivant les recommandations de la compagnie avec l'enzyme AMV Reverse Transcriptase (Roche; Laval, QC, Canada) en présence de Protector RNase inhibitor (Roche), d'oligonucléotides polyT et de 1mg d'ARN. Toutes les analyses de PCR quantitatif ont été réalisées par la Plateforme de RNomique de l'Université de Sherbrooke.

Tableau 2. Séquence des amorces utilisées pour l'amplification en PCR quantitative

Nom du gène	Amorces utilisées*
<i>Ang4</i>	5'-CAGGAGCACACAGCTAGACTCG-3' 5'-ATCACAACCAGACCCAGCACGA-3'
<i>Ascl2</i>	5'-GCTACTGAGCATCCCACCCC-3' 5'-AGTCAGCACTTGGCATTGGTCA-3'
<i>Axin 2 (Souris)</i>	5'-CACCCCTTCGCCAACCCAAGC-3' 5'-TGAGCCTTCAGCATCCTCCTGT-3'
<i>AXIN 2 (humain)</i>	5'-GCCACACCCTTCTCCAATCCAA-3' 5'-AGCCTTCAGCATCCTCCGGT-3'
<i>Ccnd1</i>	5'-GAGCCATGCTCAAGACGGAGGA-3' 5'-TCGCACTTCTGCTCCTCACAGA-3'
<i>Defa17</i>	5'-AGACCCAGAAGGCTCTTCTTTCA-3' 5'-TGCAGGTCCCATTTCATGCGTT-3'
<i>DLL1</i>	5'-CTCAGGGGAGGAGAAGGGGAC-3' 5'-ACGTACACCGACTGGTACTTGGT-3'
<i>DLL4</i>	5'-CCAGCAACCCCTGTGCCAAC-3' 5'-TCGCTGACGTGGAGTTCACAGT-3'
<i>HES1</i>	5'-TGCTACCCAGCCAGTGTCAA-3' 5'-AGAGCATCCAAAATCAGTGTTTTTCAGC-3'
<i>MUC2</i>	5'-GTCCACGCCCTCCAAGCCGA-3' 5'-TCCACCTTACGATCTCCACCG-3'
<i>Muc2</i>	5'-TGCACCAAGAACATCTCCATGAACT-3' 5'-CGGACACTGGTCTTCTCCTCCT-3'

<i>Muc5ac</i>	5'-CAGAGGGTCAGTGTGAGTGGCA-3' 5'-AAGATGGGGGCTGTTGGTGGG-3'
<i>NOTCH1</i>	5'-AGCTGGACCCCATGGACG-3' 5'-GGTGGCACTCTGGAAGCACT-3'
<i>NOTCH3</i>	5'-CTGCTGCTGCTAGCGGGG-3' 5'-TGGGTGCAACGACCTCCATT -3'
<i>Olfm4</i>	5'-GGCAGAAGGTGGGACTGTGTCT-3' 5'-AGCGGGAAAGGCGGTATCCG-3'
<i>INK4A</i>	5'-TGGGTGCTCTTTGTGTTCCGC-3' 5'-GGCTGAGGCCGGATTTAGCTCT-3'
<i>Tp53</i>	5'-AGTCACAGCACATGACGGAGGT-3' 5'-GTGGCGAAAAGTCTGCCTGTCT-3'
<i>PSMC4</i>	5'-CCCAGGAGGAGGTGAAGCGG-3' 5'-GGTCGATGGTACTCAGGATGCG-3'
<i>PUM1</i>	5'-TGCCAGTCTCTTCCAGCAGCA-3' 5'-TGATTTGGGGTCAAAGGACGTTGG-3'
<i>Reg3b</i>	5'-TCCGCACGCATTAGTTGCC-3' 5'-AGCACAGATACGAGGTGTCCTCC-3'
<i>Reg3g</i>	5'-GATGCCCCATCTTCACGTAGCA-3' 5'-GAGCACAGACACAAGATGTCCTGAG-3'
<i>TBP</i>	5'-GCCTTCCACCTTATGCTCAGGG -3' 5'-TGCTCTTCCAAAATAGAGAGACTGTTGG-3'
<i>Tff3</i>	5'-TGGCCTTGCTGTCCTCCAGC-3' 5'-CCCGGTTGTTGCACTCCTTGG-3'
<i>Tnfa</i>	5'-AGGCGGTGCCTATGTCTCA-3' 5'-GGGTCTGGGCCATAGAAGT -3'

* les amorces proviennent d'Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, IA, USA).

6.11 Immunobuvardage

Lors de la dissection des souris, des segments du côlon ont été placés dans un Eppendorf de 2mL contenant 500µL de tampon tandis que les segments de l'intestin grêle ont été mis dans 1mL de tampon de lyse RIPA (50mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% p/v sodium déoxycholate, 0.5mM EDTA, 0.1% SDS, 1mM DTT, 40mM β-glycérophosphate, 200µM sodium orthovanadate, 1mM fluorure de phénylméthanesulfonyle, 1µg/mL leupeptine, 1,4µg/mL pepstatine et 1µg/mL aprotinine). Les tissus ont été congelés avec de l'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'au jour de la lyse. En ce qui concerne les cellules en culture, celles-ci ont été lysées dans du LAEMMLI 1X (glycérol 10%, SDS 2%, Tris-HCl

63mM, pH 6.8/(Sigma-Aldrich)). Les cellules et les tissus ont été broyés dans leur tampon respectif avec le TissueLyser LT (Qiagen). Les échantillons ont par la suite été incubés 10 minutes sur glace et ont été centrifugés à 4°C pendant 10 minutes à 13 500rpm. Le surnageant a été transféré dans un tube propre et dosé selon le protocole de Thermo Fisher Scientific Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). Une quantité de 25µg de protéines a été séparée sur gel SDS-PAGE (système BioRad), puis transférée sur membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF) (IPVH00010, EMD Millipore; Billerica, MA, USA). Les membranes ont ensuite été colorées au rouge Ponceau, afin de s'assurer de la bonne qualité des échantillons. La solution utilisée pour le blocage de 30 minutes et pour la dilution des anticorps est le PBT composé de PBS1X, 5% Blotto et Tween 0.05%. Les anticorps primaires ont été incubés à 4°C, pendant toute la nuit. Les anticorps secondaires de souris (NA934V) et de lapin (Na931V) couplés à la horseradish peroxydase proviennent de chez GE Healthcare Life Sciences (Pittsburg, MA, USA). Le réactif permettant de révéler la HRP est fait maison avec 100µL de luminol 250mM (123072), 50µL d'acide coumarique 90mM (C9008) et 6µL de peroxyde d'hydrogène 30% (Fisher scientific) dans 20mL de Tris-HCl pH8.5 (Sigma-Aldrich). Finalement, les membranes ont été exposées avec des films autoradiographiques (Denville Scientific Inc., Saint-Laurent, QC, Canada).

6.12 Culture cellulaire et traitement des LS174T

Les cellules LS174T (ATCC[®] CL-188[™]) ont été achetées de la compagnie ATCC en Octobre 2014 et cultivées selon les recommandations du fournisseur. Le lendemain de leur ensemencement, les cellules LS174T ont été traitées pendant 72 heures avec soit du DMSO (Sigma-Aldrich) comme contrôle ou avec différents inhibiteurs. Le DBZ 1µM (Dibenzazepine; Cayman Chemical; Ann Arbor, MI, USA) est un inhibiteur de la γ -sécrétase, le CI-1040 2µM (Cayman Chemical) est un inhibiteur de MEK et le ICG-001 10µM (AbMole BioScience; Houston, TX, USA) est un inhibiteur de la voie Wnt canonique. L'ICG-001 se lie à la protéine CBP (cyclic AMP response element-binding protein) et empêche son recrutement par la β -caténine et la formation d'un complexe transcriptionnel actif (Emami *et al.*, 2004). Les cellules ont ensuite été lysées avec du LAEMMLI 1X pour l'analyse des protéines ou avec du tampon RLT (Qiagen) pour l'extraction des ARNm. Les protocoles complets ont été décrits précédemment.

6.13 Essai luciférase

Les cellules LS174T ont été transfectées grâce au système JetPrime (Polyplus-transfection® SA; Radnor, PA, USA) selon les recommandations du fournisseur, avec 300ng/uL d'une construction TOPFLASH contenant les éléments de liaison de TCF ou un contrôle négatif FOPFLASH (Addgene; Cambridge, MA, USA). Le vecteur Renilla-luciférase (4ng/μL) a été utilisé comme contrôle de transfection. Douze heures après la transfection, les cellules ont été traitées avec du DMSO (Sigma-Aldrich) ou avec 2μM CI-1040, un inhibiteur de MEK (Cayman Chemical). L'essai luciférase a été effectué après 24 heures de traitement selon les recommandations du fabricant avec le système Dual-Luciferase® Reporter Assay System de Proméga (Madison, WI, USA). La lecture de la plaque a été effectuée avec un luminomètre de façon automatisée (Berthold Technology, Oak Ridge, TN, USA). L'expérience a été effectuée en duplicata et reproduite avec 3 transfections différentes.

6.14 Stabilité de la β-caténine

Des cellules HEK293T ont été transfectées selon le protocole de la compagnie (lipofectamine 2000/Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) avec un plasmide permettant l'expression ectopique d'une protéine de fusion FLAG-β-caténine de type sauvage ou encore un mutant de β-caténine dont les tyrosines 86 et 654 ont été mutés en phénylalanine. Ces vecteurs d'expression ont été caractérisés et décrits précédemment (Simoneau *et al.*, 2011). Ces cellules ont également été co-transfectées avec des ARN interférents afin d'inhiber l'expression de SHP-2. Les siARN contre SHP-2 (SHP-2#1 fw5'-UAAAUCGGUACUGUGCUUCUGUCUG-3'/rev5'CAGACAGAAGCACAGACCGAUUUA-3') (SHP-2#2fw5'-AAUAUUUGUAUAUUCGUGCCCUUUC3'/rev5'GAAAGGGCACGAAUAUACAAUAUU-3') (IDT) et les siARN contrôles (siCTL-Invitrogen Stealth™ RNAi Negative Control LOGC; Thermo Fisher Scientific) ont été utilisés à 50nMol. Les cellules HEK293T ont été traitées avec 50μg/mL de cycloheximide (Calbiochem/EMD Millipore) afin d'inhiber la synthèse protéique 48 heures suivant leur transfection. Les cellules ont été lysées à différents temps avec du LAEMMLI 1X et des analyses en immunobuvardage ont été réalisées.

6.15 Culture d'organoïdes.

Lors du sacrifice des souris, l'intestin a été prélevé et rincé plusieurs fois avec du PBS 1X stérile. Les cryptes ont été isolées de l'intestin des souris *Shp-2^{CEL-E76K}* ainsi que des souris contrôles âgées entre 10 et 12 semaines, suite à une incubation sur glace dans une solution stérile de 30mM d'EDTA (Wisent; St-Bruno, QC, Canada) pour 20 minutes pour le jéjunum ou de 10mM d'EDTA pour 1 heure pour le côlon. Après l'incubation, la solution d'EDTA est retirée et la muqueuse est grattée dans du PBS 1X stérile froid, puis l'excédent de tissu est jeté. Les débris de muqueuse sont homogénéisés dans le PBS puis filtrés dans un Falcon de 50mL au travers un tamis moléculaire de 70µm (Corning; Cambridge, MA, USA) afin de recueillir les cryptes et d'éliminer les villosités. Finalement, les cryptes sont précipitées grâce à une centrifugation à 150g pour le jéjunum ou à 350g pour le côlon pendant 5 minutes à 4°C et resuspendues dans du Matrigel (Corning). Les entéroïdes sont cultivés dans du milieu Advanced DMEM/F-12 (Thermo Fisher Scientific) supplémenté avec 1mM N-acétylcystéine (Sigma-Aldrich), 50 ng/mL EGF murin (Life Technologies; Burlington, ON, Canada), B27 supplement 1X (Life Technologies), N2 supplement 1X (Life Technologies), 10% R-spondine et 5% Noggin. Les colonoïdes sont cultivés dans un mélange 1:1 de milieu Advanced DMEM/F-12 (Thermo Fisher Scientific) et de milieu conditionné contenant du Wnt3a, de la R-spondine et du Noggin (Miyoshi et Stappenbeck, 2013), le tout supplémenté avec 1mM N-acétylcystéine (Sigma-Aldrich), 50 ng/mL EGF murin (Life Technologies), B27 supplement 1X (Life Technologies) et N2 supplement 1X (Life Technologies). La R-spondine et le Noggin ont été produits grâce à des cellules HEK293T qui expriment de façon stable la R-spondin 1-Fc (don de Dr. C. Kuo, Stanford University, Stanford, CA, USA) et le Noggin-Fc (don de Dr. G. R. van den Brink, Hubrecht Institute, Utrecht, The Netherlands). Les organoïdes ont étéensemencés dans des plaques 48 puits (Corning) pour 12 heures avant d'être traitées avec du DMSO (Sigma-Aldrich) ou avec 8µM CI-1040, un inhibiteur de MEK (Cayman Chemical) pendant 4 jours. Les images ont été prises grâce au microscope Zeiss Axiovert 200M (Zeiss, Toronto, ON, Canada). Les organoïdes ont ensuite été repris dans du RLT (Qiagen) froid et les ARNm ont été extraits comme décrit précédemment.

6.16 Incorporation d'EdU

Des organoïdes ont été ensemencés sur des Nunc Lab-Tek Chamber Slide™ (C7182; Sigma-Aldrich) pour 12 heures avant d'être traités avec du DMSO (Sigma-Aldrich) ou avec 8µM CI-1040 (Cayman Chemical), un inhibiteur de MEK. Au quatrième jour, de l'EdU (Thermo Fisher Scientific) a été ajouté dans le milieu de culture pour 1 heure avant la fixation des organoïdes avec 4%p/v PFA pendant 20 minutes. La prolifération a été évaluée dans les organoïdes en suivant les recommandations du fabricant pour le système Click-it EdU Alexa Fluor 555 imaging kit (Thermo Fisher Scientific). Les organoïdes ont été visualisés en microscopie confocale avec le LSM Olympus FV1000 apparatus et le logiciel FV10-ASW 3.1 (Olympus; Center Valley, PA, USA). Le nombre de cellules EdU positives a été dénombré pour chacune des protrusions et rapporté au nombre total de cellules présentes dans les protrusions pour les entéroïdes, tandis que le nombre de cellules EdU positives par colonoïde a été rapporté sur le nombre total de cellules formant le colonoïde. Environ 100 organoïdes ont été quantifiés par condition et cela a été répété avec 5 souris de chaque génotype.

6.17 Analyses statistiques et figures

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 7 (GraphPad; San Diego, CA). Pour les valeurs obtenues suite à des mesures effectuées chez les souris, le test Mann-Whitney (distribution non normale) a été utilisé puisque le nombre d'individus analysés n'est pas suffisant pour conclure à une distribution normale. Pour les valeurs obtenues suite à des analyses en qPCR (en triplicata et avec 3 gènes de références) ou sur des expériences de culture cellulaire effectuées en triplicata, le t-test de Student a été employé (distribution normale). Les résultats sont considérés significatifs à $p \leq 0.05$. En général, les graphiques représentent la moyenne et les barres d'erreurs représentent l'erreur standard de la moyenne (SEM), sauf si la légende indique autrement. Les figures ont été produites à l'aide du logiciel Photoshop et les mesures morphométriques ont été calculées avec le logiciel ImageJ 1.45s (National Institutes of Health, Maryland, USA).

RÉSULTATS

7.1 L'activation de SHP-2 promeut la prolifération et la migration des cellules épithéliales intestinales chez la souris

Afin d'analyser l'impact d'une activation soutenue de SHP-2 dans l'homéostasie intestinale, nous avons généré un modèle murin qui exprime une forme constitutive active de Shp-2 dans les CEI, les souris *PTPNI^{E76K}Neo/+; Villine-Cre (Shp-2^{CEI-E76K})*. Dans les CEI, l'expression de la recombinaison Cre qui est sous le contrôle du promoteur de la *Villine* permet une recombinaison de l'ADN et la délétion de la cassette Stop/Neo, qui normalement réprime l'expression de l'allèle mutant (Figure 11A). La recombinaison permet l'expression de la forme E76K de Shp-2 sous le contrôle du promoteur endogène de Shp-2 (Xu *et al.*, 2011). Les souris *Shp-2^{CEI-E76K}* naissent selon un ratio Mendélien attendu et sont d'apparence normale. Toutefois, dès l'âge de trois mois, les souris *Shp-2^{CEI-E76K}* présentent un allongement significatif de l'intestin et du côlon en comparaison aux souris contrôles (Figure 11B). De plus, les souris qui expriment une forme active de Shp-2 dans les CEI ont un épaissement de la muqueuse, caractérisé par un allongement des cryptes (Figure 11C), une augmentation du nombre de cellules Ki67 positives (Figure 11D) et une distance de migration accrue des CEI, observée grâce à une incorporation au BrdU (Figure 11E). Finalement, les souris *Shp-2^{CEI-E76K}* montrent des niveaux plus élevés d'Erk1/2 phosphorylés en comparaison aux souris contrôles, ce qui a été mesuré dans des extraits d'enrichissement de muqueuse (Figure 11F). Ainsi, l'activation soutenue de Shp-2 dans les CEI induit de l'hyperplasie intestinale dès 3 mois chez la souris.

7.2 L'activation de Shp-2 dans les CEI altère la différenciation des cellules calciformes et des cellules de Paneth dans l'épithélium intestinal

Notre équipe a précédemment démontré que la délétion de Shp-2 dans les CEI mène à une réduction du nombre de cellules calciformes dans l'intestin, tout en favorisant la différenciation des cellules de Paneth (Coulombe *et al.*, 2013). Nous avons donc voulu voir si l'activation de Shp-2 pouvait engendrer un phénotype contraire chez la souris. De façon intéressante, les souris *Shp-2^{CEI-E76K}* démontrent une diminution du nombre de cellules de Paneth dans l'intestin grêle, dénombrés suite à un marquage avec le lysozyme et Agr2 (Anterior gradient 2) (Figure 12A-B). L'expression des peptides antimicrobiens tels que

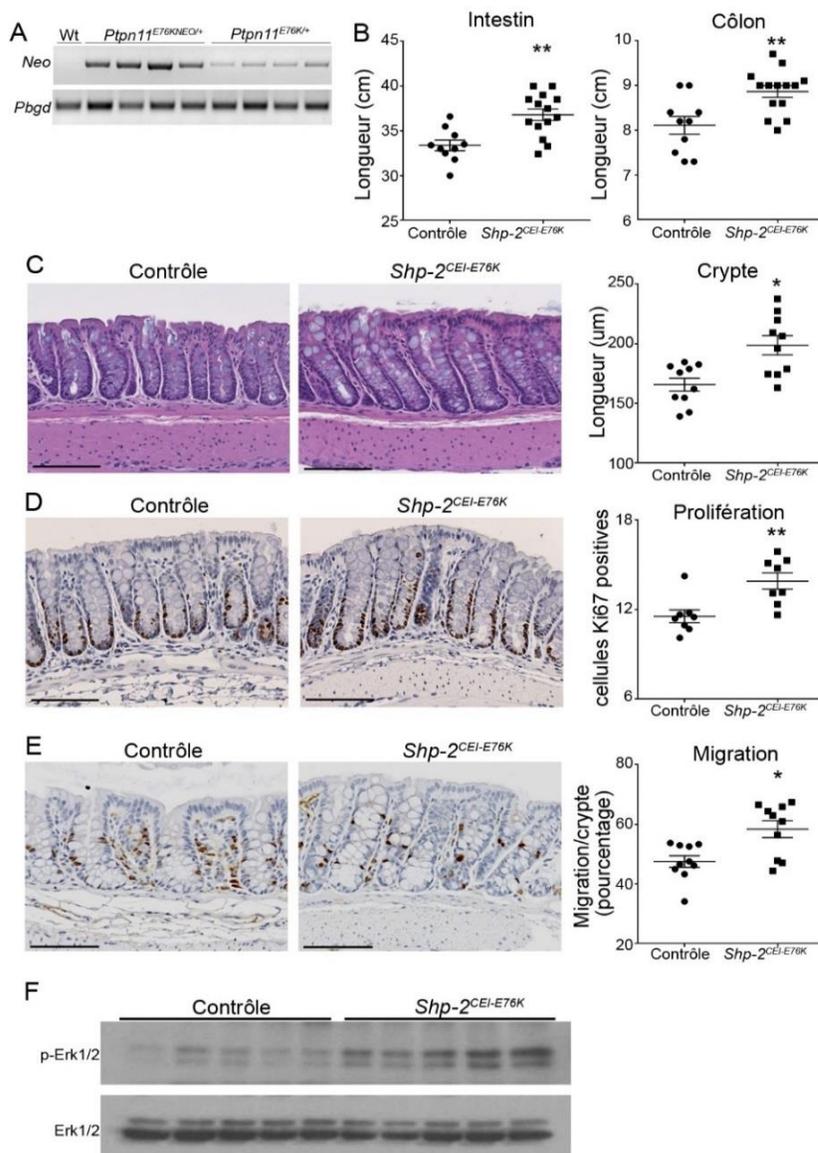


Figure 11. L'activation soutenue de Shp-2 dans les CEI chez la souris induit de l'hyperplasie. (A) L'expression du mutant E76K de Shp-2 a été validée dans des enrichissements de muqueuse en mesurant le niveau d'excision de la cassette Stop/Neo de l'ADN génomique des souris par PCR. Le gène *Pbgd* a été utilisé comme référence. (B) La longueur de l'intestin grêle et du côlon a été mesurée chez les souris *Shp-2*^{CEI-E76K} et les souris contrôles à l'âge de 3 mois. $N \geq 10$ (C) L'architecture du côlon a été visualisée grâce à une coloration hématoxyline et éosine et la longueur des cryptes a été mesurée. $N = 10$. (D) Une IHC contre Ki67 a été réalisée pour mesurer la prolifération épithéliale. Le nombre de cellules positives a été compté. $N = 15$ cryptes par souris. $N = 8$. (E) La migration a été évaluée *in vivo* suite à une injection intrapéritonéale de BrdU 18 heures avant le sacrifice, suivie par une IHC. Le front de migration a été mesuré et reporté sur la longueur totale de la crypte. $N = 15$ cryptes par souris. $N = 10$ souris. (F) La phosphorylation des kinases Erk1/2 a été mesurée par immunobuvardage. Les graphiques représentent la moyenne \pm SEM. Mann-Whitney * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$. Échelle = 100µm.

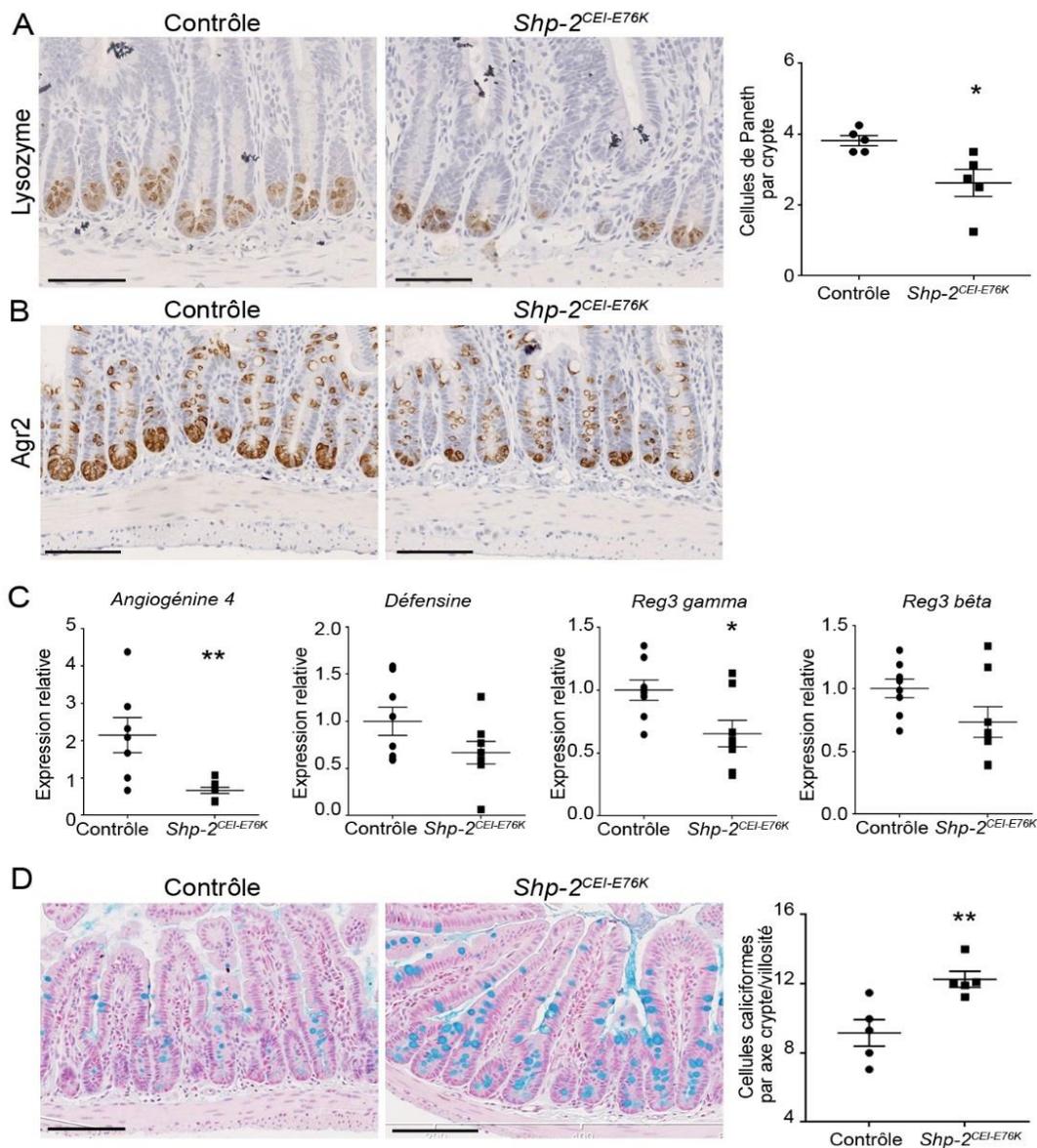


Figure 12. Shp-2 altère la différenciation des cellules sécrétrices de l'intestin grêle.

Une immunohistochimie contre le lysozyme (A) et Agr2 (B) a permis de visualiser les cellules de Paneth dans le fond des cryptes dans l'intestin grêle chez les souris *Shp-2^{CEI-E76K}* et les souris contrôles à l'âge de 3 mois. Le nombre de cellules positives pour le lysozyme a été compté. N=15 cryptes par souris X 5 souris par groupe. (C) L'expression de l'angiogénine 4, des défensines ($p=0.10$), de Reg3 γ et de Reg3 β ($p=0.08$) a été mesurée par qPCR sur des extraits d'iléon de souris âgées de 1 mois et les gènes *Psmc4*, *Pum1* et *Tbp* ont été utilisés comme références. N=8 (D) Une coloration à l'Alcian bleu a permis de visualiser les cellules caliciformes dans l'iléon des souris et un décompte a été effectué. N=15 cryptes par souris X 5 souris par groupe. Les graphiques représentent la moyenne \pm SEM. (A et D) Mann-Whitney $*p \leq 0,05$; $**p \leq 0,01$. Échelle = 100 μ m. (C) Student's t-test $*p=0,02$.

l'angiogénine 4, les défensines, Reg3 γ et Reg3 β est aussi modulée à la baisse dans l'iléon des souris *Shp-2*^{CEI-E76K} en comparaison aux contrôles âgées de 1 mois (Figure 12C). Finalement, les cellules intermédiaires de l'iléon vont préférer devenir des cellules caliciformes au détriment des cellules de Paneth suivant une activation soutenue de Shp-2, comme le démontre l'augmentation du nombre de cellules marquées à l'Alcian bleu (Figure 12D).

Les cellules caliciformes sont beaucoup plus nombreuses dans le côlon que dans l'intestin grêle et elles sont responsables de produire une bicouche de mucus qui protège la muqueuse contre la microflore et les fèces (Johansson *et al.*, 2008). L'activation de Shp-2 favorise la production des cellules caliciformes dans le côlon comme le démontre la Figure 13A. Ces cellules semblent fonctionnelles puisqu'elles sont capables de sécréter le mucus, comme le démontrent les analyses de microscopie électronique (Figure 13B). En plus de leur nombre plus élevé, les cellules caliciformes présentes dans le côlon des souris *Shp-2*^{CEI-E76K} sont beaucoup plus grosses que les cellules caliciformes des souris de type sauvage (Figure 13B). De façon concomitante, chez les souris *Shp-2*^{CEI-E76K}, l'épaisseur de la couche de mucus associée à la muqueuse est beaucoup plus prononcée que chez les souris contrôles, suggérant une protection accrue de l'épithélium (Figure 13C). Les mucines qui composent le mucus doivent subir de nombreuses modifications post-traductionnelles afin de former un réseau adéquat contre les bactéries (Gaudier et Hoebler, 2006). La fucosylation des mucines visualisée grâce à la lectine UEA-I est similaire entre les souris ayant une activation soutenue de Shp-2 et les souris contrôles, ce qui laisse suggérer que leur maturation est adéquate dans les deux cas (Figure 13D). De plus, l'expression de *Muc5ac* et de *Tff3* (p=0.058) est plus élevée dans la muqueuse des souris *Shp-2*^{CEI-E76K} en comparaison à leurs contrôles, démontrant bien une maturation adéquate des cellules caliciformes dans ce modèle (Figure 13E). Finalement, en plus des mucines, les CEI présentent à la surface de leurs microvillosités un réseau de glycocalyx pour leur protection (Okumura et Takeda, 2017). Comme le démontrent les analyses de microscopie électronique, le glycocalyx est plus important à la surface des cellules exprimant une forme active de Shp-2, ce qui pourrait également participer à la protection accrue de la muqueuse intestinale (Figure 13F).

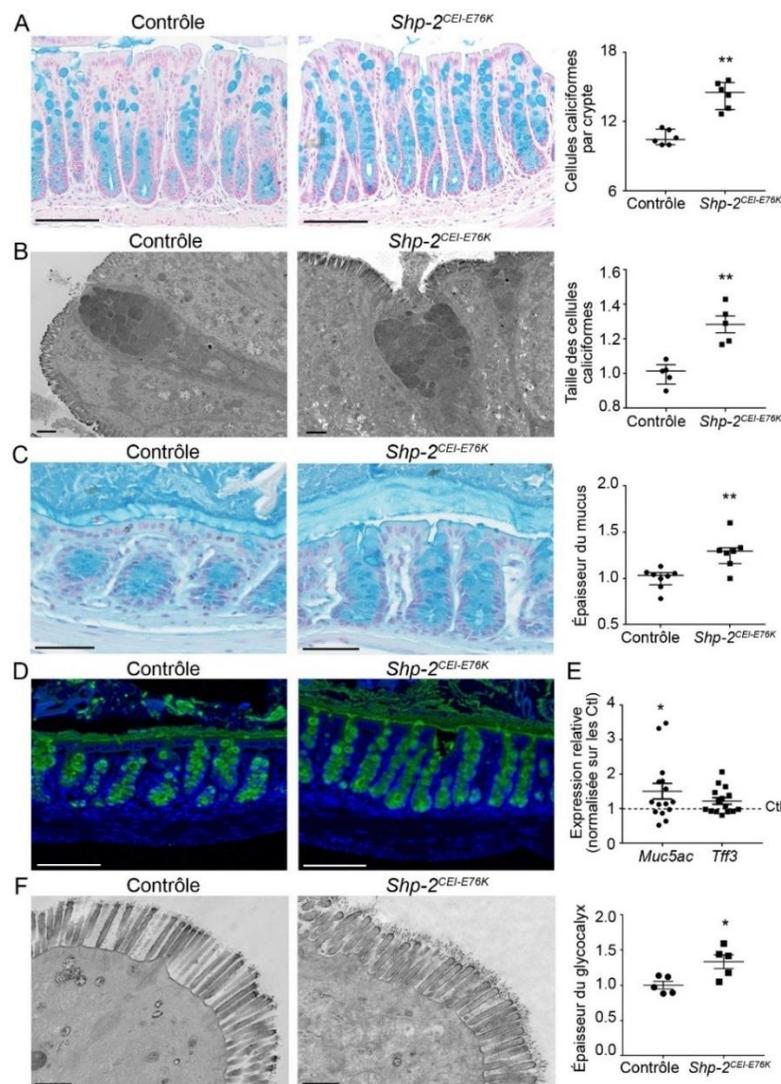


Figure 13. L'activation de Shp-2 favorise la production des cellules caliciformes et la sécrétion du mucus dans le côlon. Une coloration à l'Alcian bleu a permis de visualiser les cellules caliciformes dans le côlon des souris. Le décompte des cellules marquées par crypte a été effectué. N=15 cryptes par souris X 6 souris par groupe. (B) Les cellules caliciformes ont été visualisées grâce à des analyses de microscopie électronique. La taille des cellules a été mesurée. N=10 cellules par souris X 5 souris par groupe. (C) L'épaisseur de la couche de mucus associée à la muqueuse a été mesurée suite à une fixation de type Carnoy et une coloration à l'Alcian bleu. N≥7. (D) La fucosylation du mucus a été observée grâce à une IF avec la lectine UEA-FITC. N=6 (E) Des analyses en qPCR ont été réalisées afin de mesurer l'expression de *Muc5ac* et de *Tff3* ($p=0.058$) dans des extraits de muqueuse. Les gènes *Psmc4*, *Pum1* et *Tbp* ont été utilisés comme références. N=15 (F) Le glycocalyx à la surface des CEI a été mesuré suite à des analyses en microscopie électronique. N=5. Les graphiques représentent la moyenne \pm SEM. Mann-Whitney * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$. (A et D) Échelle = 100 μ m. (C) Échelle = 50 μ m. (B et F) Échelle = 500nm.

7.3 L'activation de Shp-2 promeut le développement des organoïdes de façon Mek-dépendante

Il est bien connu que Shp-2 participe à l'activation de la voie RAS/MAPK dans de nombreux types cellulaires (Araki *et al.*, 2003). De plus, une augmentation des niveaux de phosphorylation des Erk1/2 a été observée dans la muqueuse des souris *Shp-2^{CEI-E76K}* (Figure 11F). Afin d'évaluer l'implication de la voie MAPK dans le phénotype engendré par une activation soutenue de Shp-2, des cultures organotypiques ont été réalisées à partir des tissus prélevés chez la souris. Dans un premier temps, l'expression du mutant E76K de Shp-2 favorise le développement des entéroïdes et des colonoïdes comme le démontre la Figure 14A. Ce développement accéléré est causé par une augmentation de la prolifération dans les organoïdes obtenus à partir des cryptes isolées des souris *Shp-2^{CEI-E76K}*, comme le démontre l'augmentation du nombre de cellules positives pour l'EdU dans les entéroïdes et les colonoïdes expérimentaux (Figure 14B). En plus de leur plus grande taille, le nombre de protrusions est beaucoup plus élevé après 4 jours de culture suite à l'activation de Shp-2 dans les entéroïdes en comparaison aux entéroïdes contrôles (Figure 14C). Finalement, une augmentation de l'expression de *Muc2* a été mesurée dans des extraits d'entéroïdes expérimentaux tandis que les marqueurs de cellules souches *Olfm4* et *Ascl2* sont diminués significativement en comparaison aux contrôles (Figure 14D), ce qui corrèle avec le phénotype observé chez les souris *Shp-2^{CEI-E76K}*. De manière intéressante, l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique de MEK, le CI-1040, permet de restaurer la taille des entéroïdes, le nombre de protrusions et de cellules prolifératives ainsi que l'expression de *Muc2* à des niveaux similaires à ceux observés dans les organoïdes contrôles (Figure 14A-E), ce qui suggère que Shp-2 médie ces effets via l'activation de la signalisation MEK/ERK.

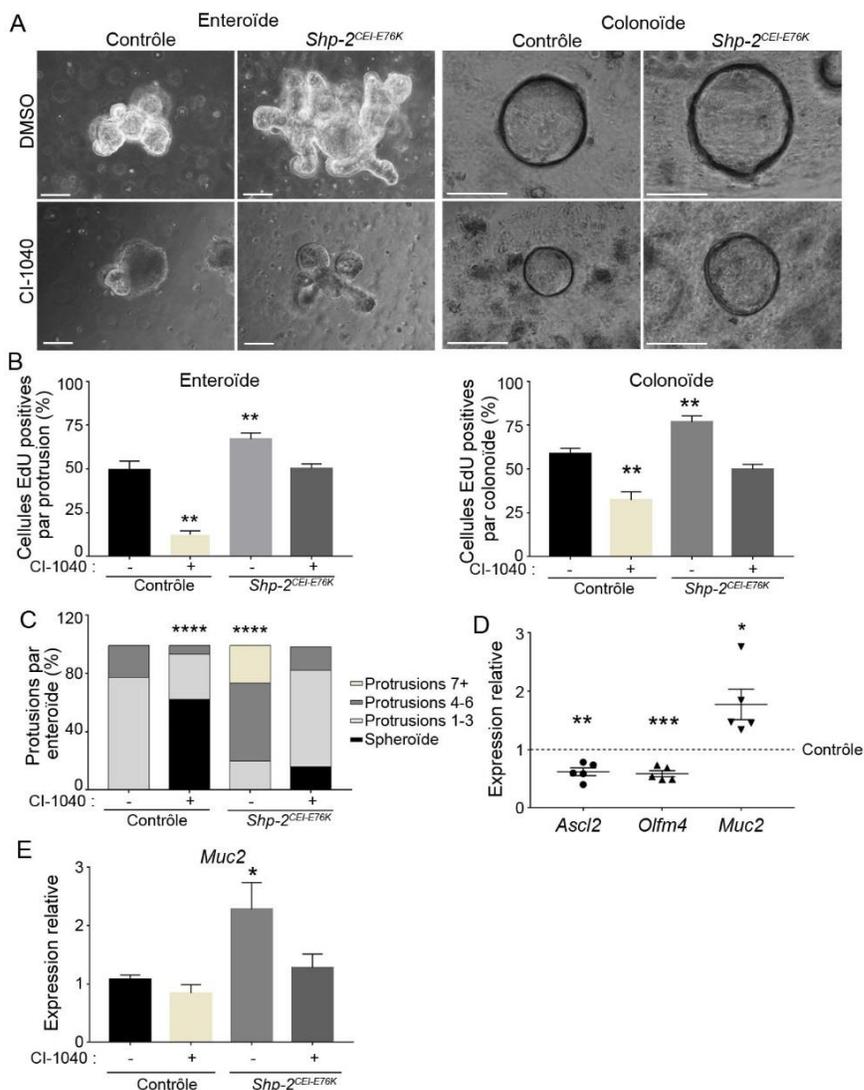


Figure 14. L'activation de Shp-2 promeut la régénération cryptale de façon Mek-dépendante. Les entéroïdes et les colonoïdes formés à partir des cryptes isolées de l'intestin grêle et du côlon des souris *Shp-2^{CEI-E76K}* et des souris contrôles ont été cultivés dans du Matrigel pendant 12 heures avant l'ajout de 8 μ M CI-1040 ou du DMSO seul. (A) Les photos représentent les entéroïdes et les colonoïdes après 4 jours de culture suivant le début du traitement. N=5. Échelle = 50 μ m. (B) De l'EdU a été ajouté dans le milieu de culture pendant une heure avant la fixation des organoïdes. Le nombre de cellules prolifératives positives pour l'EdU par protrusion ou par colonoïde a été compté. N=5. (C) Le nombre de protrusions a été compté pour 100 entéroïdes de chacune des conditions après 4 jours de traitement avec l'inhibiteur de MEK ou le DMSO. Le graphique de contingence représente une expérience représentative. N=5. (D) Les ARNm ont été isolés des entéroïdes et l'expression de *Ascl2*, *Olfm4* et *Muc2* a été mesurée par qPCR. L'expression a été normalisée sur les niveaux contrôles et les gènes *Psmc4*, *Pum1* et *Tbp* ont été utilisés comme références. N=5. (E) L'expression de *Muc2* a été mesurée dans les entéroïdes traités ou non avec l'inhibiteur de MEK pendant 4 jours. N=5. (C-E) Les graphiques représentent la moyenne \pm SEM. Student's t-test * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$.

7.4 Régulation de la voie NOTCH par les kinases MEK/ERK dans les cellules LS174T

L'activation de la voie RAS/MAPK semble favoriser la différenciation des cellules caliciformes de l'intestin, mais les mécanismes moléculaires impliqués ne sont pas connus (Feng *et al.*, 2011). Afin d'approfondir ces mécanismes, nous avons utilisé une lignée de cellules du cancer colorectal qui exprime de nombreuses mucines, les cellules LS174T. Cette lignée est un bon modèle pour étudier la différenciation des cellules caliciformes (Bu *et al.*, 2011). De manière intéressante, l'inhibition pharmacologique de MEK avec le CI-1040 réduit de façon significative l'expression de *MUC2* et le marquage à l'Alcian bleu dans ces cellules (Figure 15A-B). Puisque NOTCH gouverne la différenciation de la lignée sécrétrice dans l'intestin (Crosnier *et al.*, 2006), nous avons par la suite vérifié si la voie RAS/MAPK pouvait moduler ce sentier de signalisation dans les LS174T. Comme le démontre la Figure 15B, l'inhibition pharmacologique de MEK promeut la voie NOTCH, avec une augmentation protéique du domaine intracellulaire clivé de NOTCH (NICD) et de son gène cible HES1. Par ailleurs, l'inhibition concomitante de MEK avec le CI-1040 et de NOTCH avec le DBZ prévient l'accumulation de NICD et de HES1 (Figure 15C), ce qui suggère que le sentier MEK/ERK module NOTCH au niveau de l'activation des récepteurs. Nous avons donc mesuré l'expression des récepteurs et des ligands de NOTCH dans les cellules LS174T traitées avec le CI-1040. Bien que les récepteurs *NOTCH1* et *NOTCH3* ne soient pas modulés (Figure 15D), l'expression des ligands *DLL1* et *DLL4* est significativement augmentée suite à l'inhibition de MEK (Figure 15E). Pris ensemble, ces résultats indiquent que la voie MAPK promeut la différenciation des cellules caliciformes en inhibant l'expression des ligands NOTCH.

Puisqu'il est connu que l'expression des ligands DLL peut être régulée par la signalisation Wnt (Crosnier *et al.*, 2006), nous avons voulu vérifier si MEK influençait le potentiel transcriptionnel du complexe β -caténine/TCF dans les cellules LS174T. Comme l'illustre la Figure 15F, l'activité transcriptionnelle du complexe β -caténine/TCF4 est augmentée suite au traitement avec le CI-1040 dans les cellules LS174T, tout comme l'expression de l'*AXINE 2*, un gène cible de la voie Wnt (Figure 15G). De plus, l'ajout d'un inhibiteur de Wnt/ β -caténine/TCF4 (ICG-001) abolit l'induction de *DLL4* par le CI-1040 (Figure 15H), ce qui

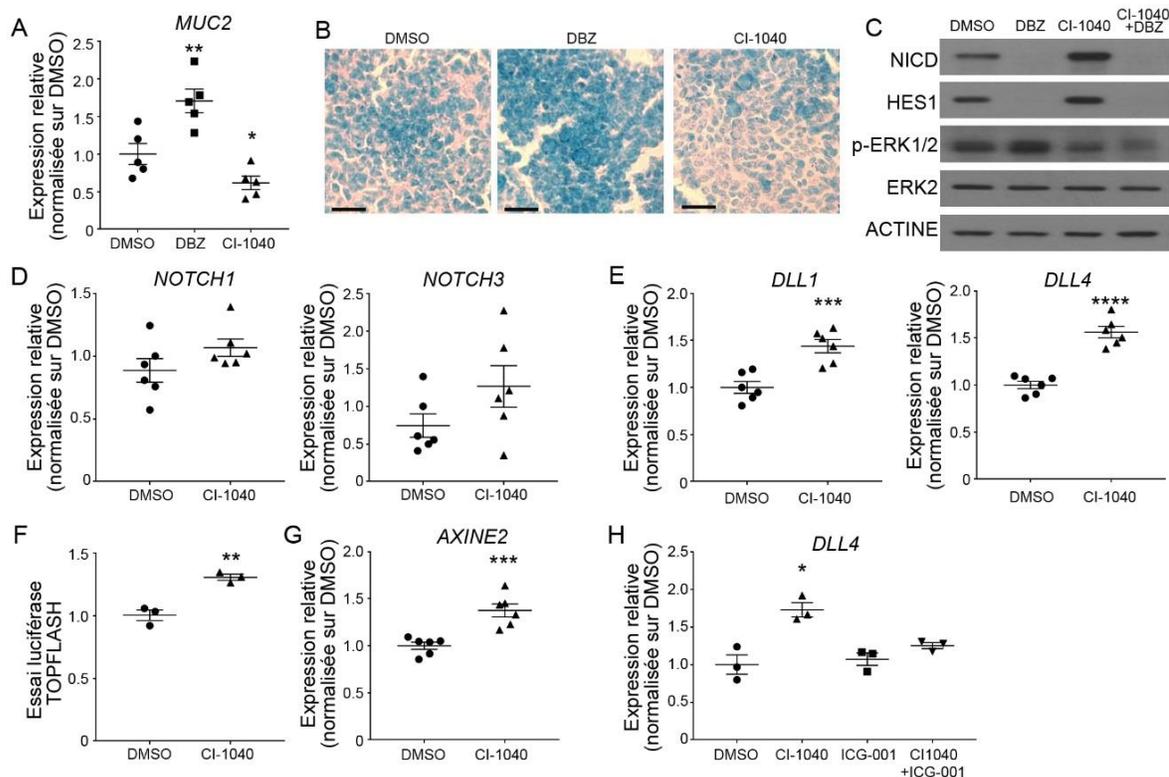


Figure 15. La voie RAS/MAPK induit la différenciation des cellules calciformes en modulant l'activation de la voie NOTCH dans les cellules déterminées LS174T. Les cellules LS174T ont été traitées avec du DMSO, 1 μ M DBZ ou 2 μ M CI-1040 pendant 72 heures. (A) L'expression de *MUC2* a été analysée par qPCR pour chaque condition. Les gènes *PSMC4*, *PUM1* et *TBP* ont été utilisés comme références. N=5 (B) Un marquage à l'Alcian bleu a permis de visualiser la production des mucines acides en fonction des différents traitements. N=3 (C) L'expression de HES1 et de NICD ainsi que les niveaux de phosphorylation des ERK1/2 (T202/Y204) ont été mesurés grâce à des analyses en immunobuvardage. N=5. (D) L'expression de *NOTCH1* et de *NOTCH3* ainsi que de (E) *DLL1* et *DLL4* ont été quantifiées par qPCR. N=6. (F) Les LS174T ont été transfectées avec le gène reporteur TOPFLASH, puis traitées avec du DMSO ou du CI-1040 pour une durée de 24 heures. L'activité luciférase a été calculée relativement au niveau d'expression de la Renilla-luciférase et la condition DMSO a été fixée à 1. L'expérience a été reproduite avec 3 populations différentes. (G) L'expression de l'*AXINE2* a été mesurée par qPCR dans les cellules traitées avec l'inhibiteur de MEK. N=6. (H) Les cellules LS174T ont été traitées avec du DMSO, 2 μ M CI-1040 ou 10 μ M ICG-007 pendant 72 heures. L'expression de *DLL4* a été mesurée dans chacune des conditions. Les gènes *PSMC4*, *PUM1* et *TBP* ont été utilisés comme références. N=3. Les graphiques représentent la moyenne \pm SEM. Student's t-test * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,0001$.

indique que l'inhibition de MEK résulte en une augmentation du potentiel transcriptionnel de β -caténine/TCF, qui à son tour induirait une synthèse accrue des ligands de NOTCH dans les cellules prédéterminées LS174T.

7.5 L'activation soutenue de Shp-2 protège contre le développement de la colite chez la souris

Les souris *Shp-2*^{CEI-E76K} ont une augmentation du nombre de cellules caliciformes et de la production de mucus nécessaire à la protection de la muqueuse contre les stress inflammatoires en provenance de la lumière intestinale. De plus, l'activation de Shp-2 induit une hausse de la prolifération et de la migration des cellules épithéliales, deux processus impliqués dans la réparation de blessures. Afin d'évaluer le rôle potentiellement protecteur de Shp-2 dans le développement de la colite, les animaux ont reçu 2.5% de DSS dans leur eau de boisson pour une durée de 7 jours. Tous les jours, les souris ont été pesées et les signes de la colite ont été évalués. Comme l'indique la Figure 16A, les souris qui expriment une forme active de Shp-2 perdent beaucoup moins de poids pendant le traitement que les souris de type sauvage. Au jour du sacrifice, les souris contrôles démontrent d'importants symptômes de la colite (Figure 16B), tels que la diarrhée, des saignements rectaux, une érosion prononcée de la muqueuse et un rétrécissement de la longueur du côlon (Figure 16C), tandis que les souris *Shp-2*^{CEI-E76K} ont peu de signes cliniques macroscopiques et une altération moins prononcée de la muqueuse (Figure 16D). Ceci résulte en un score histologique inférieur chez les souris ayant une activation soutenue de Shp-2 en comparaison aux souris de type sauvage (Figure 16E). Ces résultats démontrent que l'activation de Shp-2 dans les CEI engendre une protection contre le développement de la colite chimique chez la souris.

La colite est une maladie qui peut être causée par une infection avec un pathogène, dont font partie les souches adhérentes et invasives d'*Escherichia coli* (Wehkamp *et al.*, 2009). Chez la souris, l'inoculation avec *Citrobacter rodentium* permet de reproduire la colite infectieuse observée chez l'humain suite à une infection avec EHEC (Mundy *et al.*, 2005). Afin d'évaluer le rôle protecteur de Shp-2 dans cette pathologie, nous avons introduit *C.*

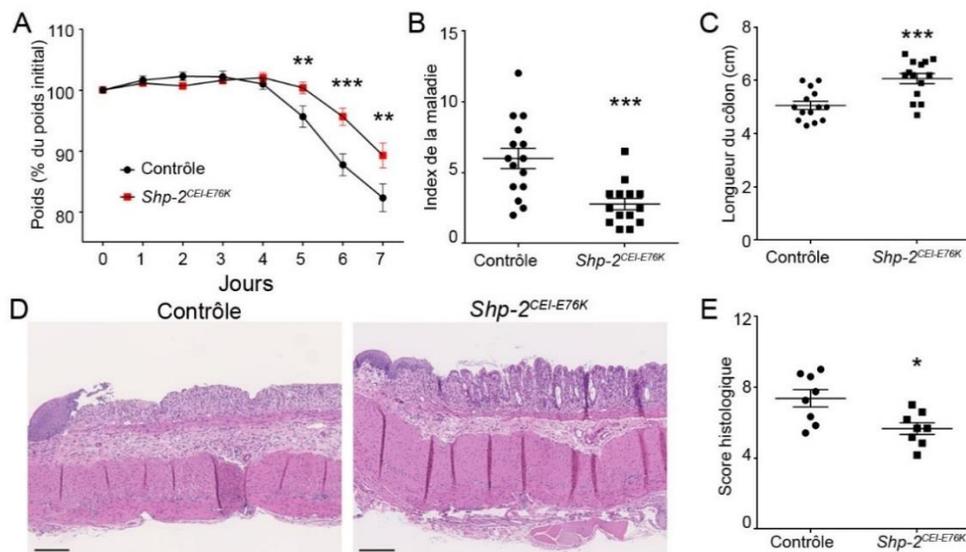


Figure 16. L'activation de Shp-2 dans les CEI protège contre la colite chimique.

Des souris *Shp-2^{CEI-E76K}* et des souris contrôles ont été traitées avec 2,5% de Dextran sulfate de sodium dans leur eau de boisson pendant 7 jours. (A) Le poids des souris a été mesuré à tous les jours du traitement et reporté sur le poids initial des individus. N=15 (B) L'index de la maladie a été évalué lors de l'euthanasie en mesurant la dureté des fèces, la présence de saignements rectaux, le sang dans les fèces et la dureté du côlon. (C) La longueur du côlon a également été mesurée. N=15 (D) Une coloration hématoxyline et éosine a été réalisée sur des coupes histologiques du côlon des animaux afin d'évaluer la présence de dommages à la muqueuse, l'infiltration de cellules immunitaires, l'épaississement de la musculature, la perte des cellules caliciformes et la présence d'abcès de crypte. Échelle = 100µm. (E) Le graphique représente le score obtenu suite à l'évaluation des dommages dû au traitement DSS. N=8. Les graphiques représentent la moyenne ± SEM. Mann-Whitney * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

rodentium dans l'estomac de 15 souris *Shp-2^{CEI-E76K}* et de 15 souris de type sauvage. De manière intéressante, la moitié des souris *Shp-2^{CEI-E76K}* (8/15) n'ont pas développé de charge bactérienne détectable dans leurs fèces au cours du suivi post-gavage tandis que toutes les souris contrôles ont développé des millions de CFU de *C. rodentium* dès 6 jours (Figure 17A). L'activation de Shp-2 inhibe aussi significativement la production de *Tnf α* (Figure 17B), l'apparition des dommages (Figure 17C) et la réduction du nombre de cellules caliciformes (Figure 17D) dans la muqueuse des souris suite au traitement avec *C. rodentium*. Ainsi, Shp-2 semble protéger la muqueuse du côlon contre le développement de la colite, qu'elle soit chimique ou infectieuse.

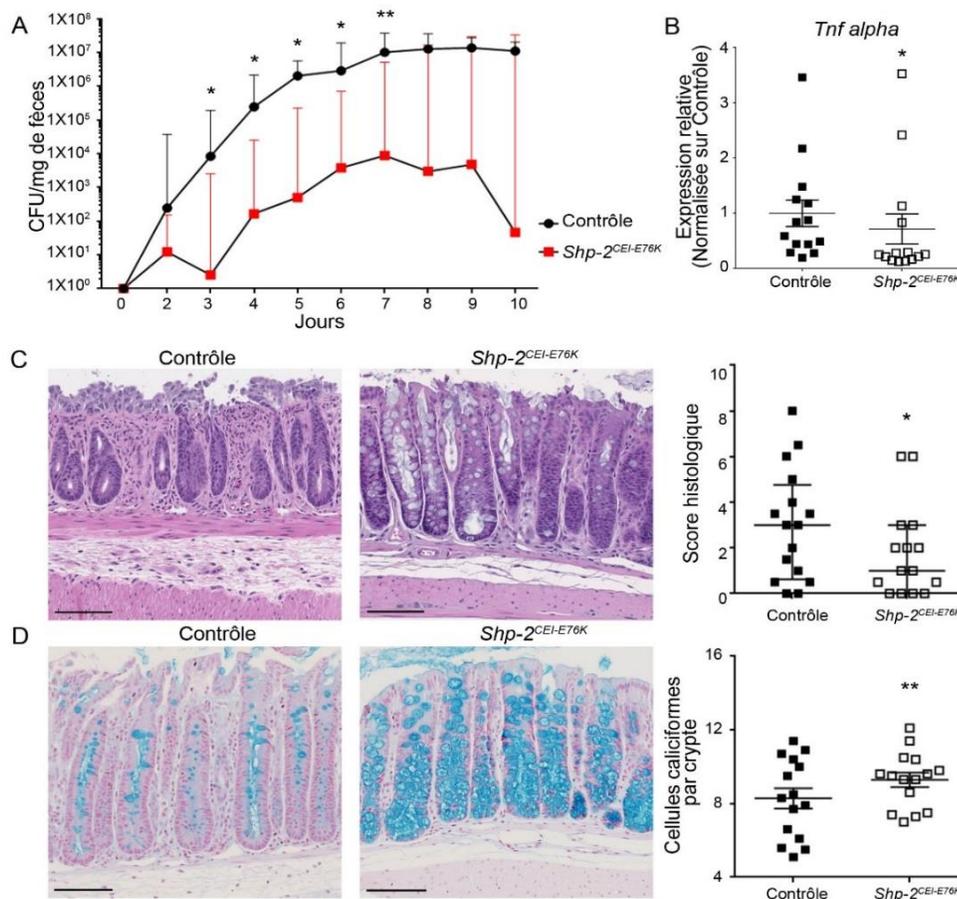


Figure 17. L'activation de Shp-2 dans les CEI protège contre la colite infectieuse.

Des souris *Shp-2*^{CEI-E76K} et des souris contrôles ont été gavées avec $2,5 \times 10^8$ *Citrobacter rodentium* et la charge bactérienne dans les fèces (CFU/mg de fèces) a été mesurée chaque jour pendant 10 jours. N=15. Le graphique représente la médiane \pm l'écart interquartile. (B) L'expression du *Tnfa* a été mesurée par qPCR dans des extraits totaux de côlon distal isolés 10 jours après le gavage. L'expression a été normalisée sur les gènes de références *Psmc4*, *Pum1* et *Tbp*. N=15. (C) Le score histologique a été calculé suite à une coloration hématoxyline et éosine sur des coupes histologiques du côlon des souris *Shp-2*^{CEI-E76K} et des souris contrôles suivant le traitement avec *C. rodentium*. N=15 (D) Une coloration à l'Alcian bleu a été réalisée et le nombre de cellules caliciformes par crypte a été compté. N=15 cryptes par souris X 15 souris par groupe. (C-D) Échelle= 100 μ m. Les graphiques représentent la moyenne \pm SEM. Mann-Whitney *p<0,05; **p<0,01.

7.6 Stat3 participe au développement de l'inflammation dans le côlon des souris *Shp-2*^{CEI-KO}.

Les études précédentes de notre laboratoire ont démontré que les souris invalidées pour Shp-2 dans les CEI développent une colite en très bas âge. De plus, l'activation des facteurs Stat3

et NFkB est augmentée dans ce modèle avant même l'apparition de l'inflammation (Coulombe *et al.* 2013). Puisque les rôles de Stat3 dans la colite sont controversés (Han et Theiss, 2014), nous avons généré un modèle invalidé à la fois pour Shp-2 et pour Stat3 dans les CEI chez la souris (*Shp-2;Stat3^{CEI-KO}*) afin d'évaluer la participation de ce facteur de transcription dans l'apparition de la maladie dans le côlon des souris *Shp-2^{CEI-KO}*. Bien que ces résultats soient préliminaires, l'invalidation de Stat3 au stade embryonnaire E15.5 diminue les symptômes de l'inflammation chez les souris *Shp-2^{CEI-KO}* âgées de 16 jours, avec une légère diminution de l'index de la maladie (Figure 18 C) et une réduction significative des dommages à la muqueuse (Figure 18 D et F). Par contre, ce ne sont pas tous les signes de la colite qui sont atténués par la délétion de Stat3 dans l'épithélium intestinal déficient pour l'expression de Shp-2, puisque la perte de poids et la longueur du côlon n'est pas rétablie chez les animaux double mutants en comparaison aux souris *Shp-2^{CEI-KO}* (Figure 18 A-B). De plus, des cellules de Paneth sont toujours anormalement présentes dans le côlon proximal des souris ayant une baisse d'expression de Shp-2 et ce, indépendamment de l'expression de Stat3 (Figure 18 E). Ainsi, l'activation soutenue de Stat3 qui est présente très tôt dans la muqueuse intestinale invalidée pour Shp-2 semble participer au développement de l'inflammation chez les souris *Shp-2^{CEI-KO}*, mais n'en est certainement pas la cause.

7.7 L'expression de Shp-2^{E76K} dans les CEI mène au développement de lésions festonnées dans l'intestin chez la souris

Les résultats présentés précédemment démontrent que les souris *Shp-2^{CEI-E76K}* démontrent une hyperactivation des kinases ERK1/2 dans l'épithélium intestinal et que cela contribue probablement au développement d'hyperplasie intestinale, caractérisée par un allongement de la longueur totale de l'intestin et un épaississement de la muqueuse. Il est connu qu'une activation des oncogènes KRAS et BRAF entraîne le développement de lésions festonnées dans le côlon chez l'humain (Park *et al.*, 2003). Afin de vérifier si une activation soutenue de Shp-2 pouvait mener à un phénotype similaire, nous avons laissé vieillir les souris *Shp-2^{CEI-E76K}* jusqu'à 15 mois. De manière intéressante, des régions d'aspect anormal et très rigides ont été repérées lors du sacrifice des souris expérimentales, avec une prédominance dans l'intestin grêle proximal en comparaison à l'intestin distal et le côlon. L'analyse

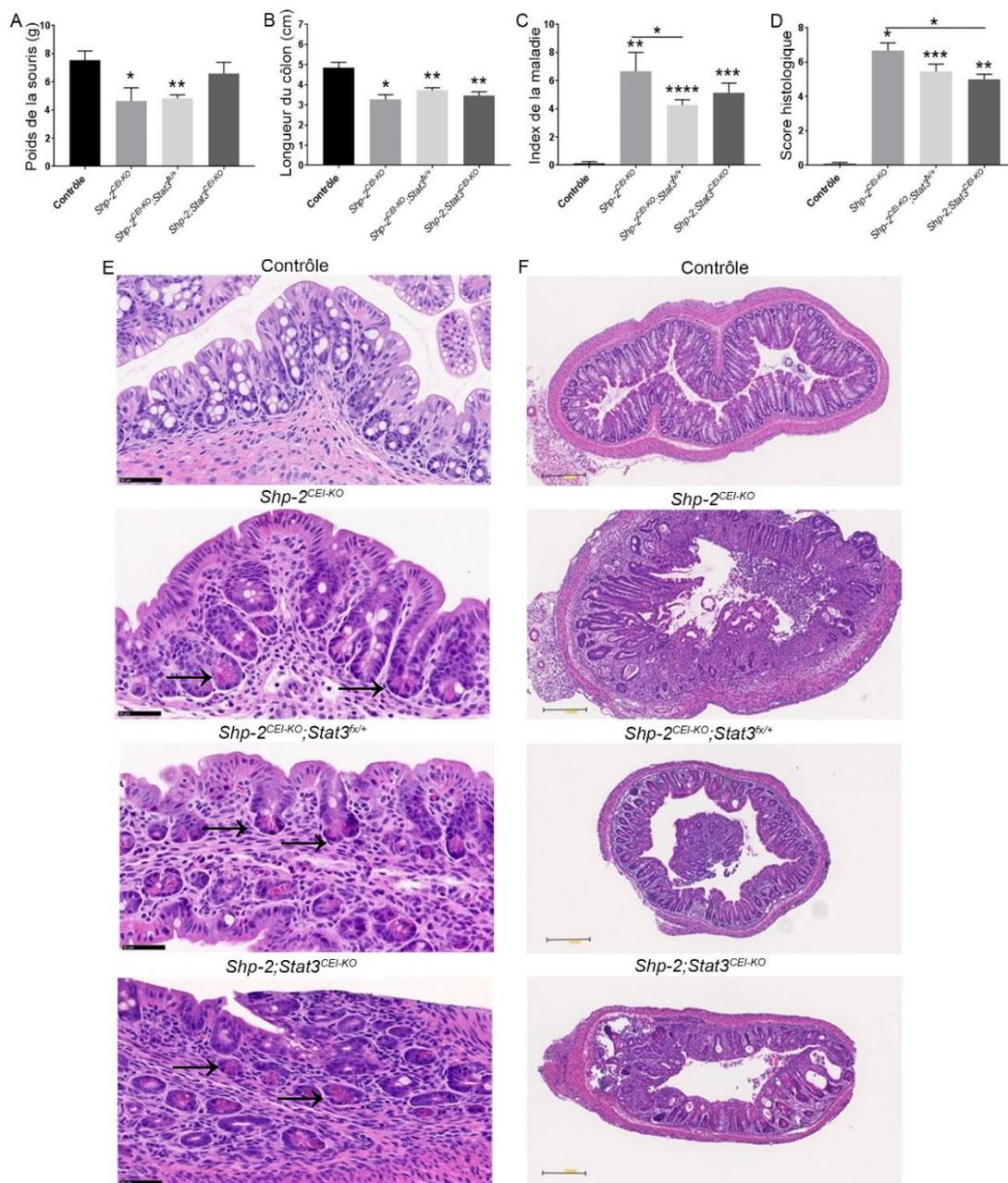


Figure 18. La délétion de Stat3 atténue le développement de l'inflammation en absence de Shp-2 dans le côlon des souris. L'inflammation colique a été évaluée chez des souris contrôles (N=6), des souris *Shp-2^{CEI-KO}* (N=3), des souris *Shp-2^{CEI-KO};Stat3^{fl/+}* (N=6) et des souris *Shp-2;Stat3^{CEI-KO}* (N=6) afin d'évaluer le rôle de Stat3 dans le développement de la pathologie. (A) Le poids des animaux, (B) la longueur du côlon et (C) l'index de la maladie ont été évalués au jour du sacrifice à l'âge de 16 jours. (D) Le score histologique a été calculé à partir des coupes histologiques colorées à l'hématoxyline et éosine provenant du côlon proximal (E) et du côlon distal (F). (E) Échelle= 50µm; (→) Cellules de Paneth. (F) Échelle= 100µm. Les graphiques représentent la moyenne ± SEM. Mann Whitney *p≤0,05; **p≤0,01; *** p≤0,001; **** p≤0,0001.

histologique du jéjunum des souris *Shp-2^{CEI-E76K}* a permis de mettre en évidence la présence de cryptes hyperplasiques chez 67% des vieilles souris (8/12) en comparaison avec les souris contrôles qui ont une muqueuse intestinale normale (Figure 19A). Ces zones anormales sont caractérisées par un allongement du compartiment prolifératif et une augmentation du nombre de cellules épithéliales Ki67 positives (Figure 19B), en plus d'une accumulation nucléaire importante des formes phosphorylées des kinases ERK1/2 (Figure 19C). Les CEI localisées à l'apex des villosités semblent également présenter une perte de polarité cellulaire avec une délocalisation de leur noyau (Figure 19A, zoom). Finalement, les cellules caliciformes sont très nombreuses et anormalement grosses chez les souris *Shp-2^{CEI-E76K}* âgées en comparaison aux cellules caliciformes des souris contrôles (Figure 19D). L'hyperplasie, la délocalisation du compartiment prolifératif ainsi que la présence de grosses cellules caliciformes sont tous des aspects des polypes hyperplasiques festonnés (Snoover, 2011), ce qui a été confirmé par des analyses pathologiques.

L'analyse pathologique a également permis de révéler la présence de lésions festonnées dans le côlon des souris *Shp-2^{CEI-E76K}*. De manière intéressante, le type d'anomalie répertorié est différent dans l'intestin grêle que dans le côlon. D'abord, la muqueuse du côlon proximal présente des protrusions ressemblant à des villosités chez les souris *Shp-2^{CEI-E76K}* en comparaison aux souris contrôles (Figure 20A). Puis, les cellules épithéliales de surface sont très éosinophiles, c'est-à-dire que la fraction cytoplasmique de la cellule est augmentée par rapport au noyau (Figure 20A). Ce phénotype est similaire à celui observé chez les patients ayant des adénomes festonnés traditionnels (Bettington *et al.*, 2013). Chez les souris *Villine-Cre;Braf^{LSL-V637E/+}* de même que dans les adénomes TSA, ces protrusions contiennent des cryptes ectopiques qui donnent cet apparence festonnée (Carragher *et al.*, 2010). Néanmoins, un marquage avec l'antigène Ki67 n'a pas permis de conclure à la présence de cellules prolifératives ectopiques chez les souris *Shp-2^{CEI-E76K}* (Figure 20B). Finalement, les cellules caliciformes ne sont pas nombreuses dans les protrusions mais plutôt localisées dans les cryptes, tout comme pour les TSA retrouvés chez l'humain (Figure 20A). Bien que des polypes hyperplasiques et des lésions TSA aient été observées chez les souris *Shp-2^{CEI-E76K}* dans l'intestin grêle et le côlon respectivement, aucune d'entre elles ne présentaient de carcinome à l'âge de 15 mois.

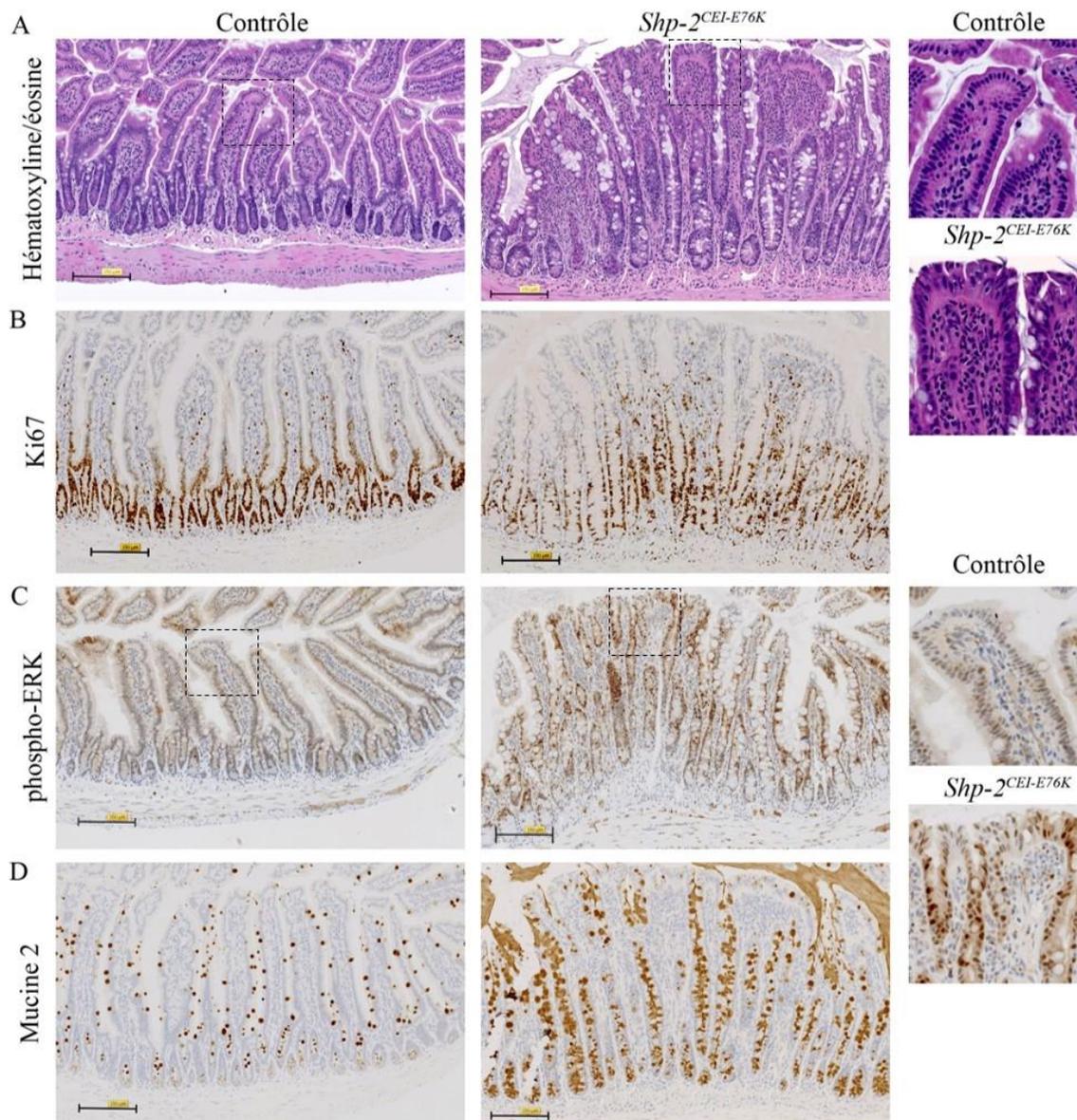


Figure 19. L'activation de Shp-2 induit la formation de cryptes hyperplasiques dans le jéjunum des souris. (A) L'analyse histologique du jéjunum des souris *Shp-2^{CEI-E76K}* âgées de 15 mois a révélé la présence de cryptes hyperplasiques suite à une coloration à l'hématoxyline et éosine. À plus fort grossissement, la perte de polarité cellulaire. Les cellules prolifératives (B) ainsi que les cellules ayant une accumulation nucléaire d'ERK (C) et les cellules caliciformes (D) ont été visualisées par une immunohistochimie contre l'antigène Ki67, phospho-ERK (T202/Y204) et la Mucine 2. (C) À plus fort grossissement, accumulation nucléaire de Erk1/2. Les analyses ont été effectuées sur 12 souris de chaque groupe. Échelle=150 μ m.

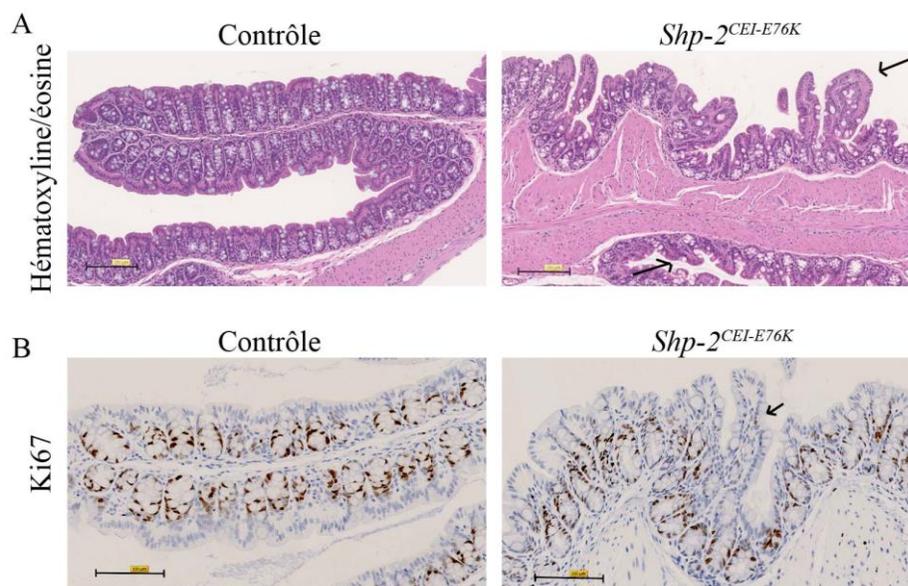


Figure 20. Des lésions festonnées traditionnelles sont présentes dans le côlon proximal chez la souris $Shp-2^{CEI-E76K}$. (A) Une coloration à l'hématoxyline et éosine a permis de déceler la présence de structures ressemblant à des villosités (\leftarrow) dans le côlon des souris $Shp-2^{CEI-E76K}$ âgées de 15 mois. (B) Les cellules prolifératives ectopiques (\leftarrow) sont visualisées par un IHC contre l'antigène Ki67. (A) Échelle=150 μ m. (B) Échelle=100 μ m.

7.8 Les souris $Shp-2^{CEI-E76K}$ ne présentent pas de signes de sénescence dans l'intestin

Les lésions de type festonné sont caractérisées par une augmentation et une délocalisation du compartiment prolifératif ainsi qu'une forte accumulation nucléaire de la β -caténine chez les souris $Villine-Cre;Braf^{SL-V637E/+}$ (Rad *et al.*, 2013; Carragher *et al.*, 2010). L'activation aberrante et concomitante des voies Ras/MAPK et Wnt/ β -caténine représente un stress oncogénique important pour les cellules qui entrent en sénescence et deviennent positives pour les marqueurs β -galactosidase et p16 (Carragher *et al.*, 2010). Afin de mesurer l'implication de la sénescence dans l'absence de tumeurs invasives chez les souris $Shp-2^{CEI-E76K}$ âgées, nous avons mesuré les niveaux d'expression de *p16* et de *Tp53* dans des extraits totaux de jéjunum, en plus de mesurer l'expression de l'*Axine2*, un gène cible du complexe β -caténine/TCF4. Les analyses ont également été effectuées dans le côlon. Étonnamment, l'expression de l'*Axine2* est diminuée chez les souris $Shp-2^{CEI-E76K}$ autant dans l'intestin grêle que dans le côlon (Figure 21A et C), ce qui est contraire à ce qui est observé dans les souris $Villine-Cre;Braf^{SL-V637E/+}$. De plus, aucune induction de l'expression des marqueurs

de sénescence *p16* et *Tp53* (Figure 21B et D) n'a été observée en présence d'une forme active de Shp-2 dans les CEI en comparaison à la muqueuse normale de l'intestin et du côlon.

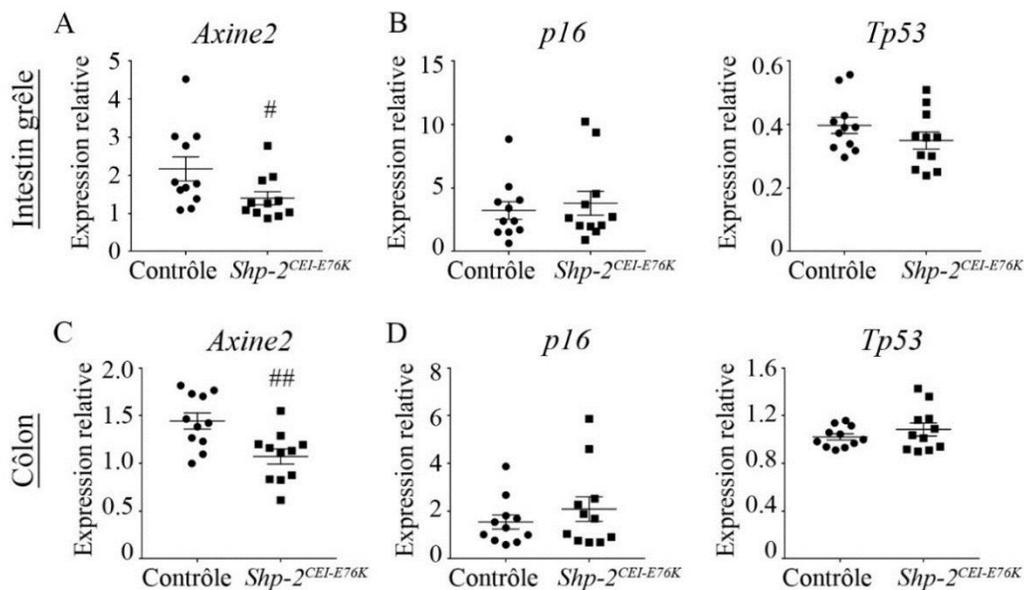


Figure 21. L'activation de Shp-2 n'est pas suffisante pour induire la sénescence dans l'épithélium intestinal chez la souris. Les niveaux d'expression de l'*Axine 2*, de *p16* et de *Tp53* ont été mesurés par analyses de PCR quantitatif dans des extraits de jéjunum (A-B) ainsi que dans des extraits de côlon proximal (C-D) provenant de souris *Shp-2^{CEI-E76K}* âgées de 15 mois et des souris contrôles. Les analyses ont été effectuées sur 12 souris de chaque groupe. Les gènes *Psmc4*, *Pum1* et *Tbp* ont été utilisés comme référence. Les graphiques représentent la moyenne \pm SEM. Student's t-test # $p=0,05$, ## $p=0,01$.

7.9 SHP-2 régule la stabilité de la β -caténine et l'expression de ses gènes cibles

L'activation de Shp-2 semble réguler à la baisse le niveau d'expression de la β -caténine, ce qui suggère une diminution de l'activité de la voie Wnt/ β -caténine dans notre modèle murin *Shp-2^{CEI-E76K}*. De plus, nous avons précédemment rapporté que les souris invalidées pour l'expression de Shp-2 dans les CEI ont des niveaux d'expression accrus de trois gènes cibles de la voie Wnt canonique dont *CD44*, *c-Myc* et *Cycline D1* dans la muqueuse du côlon, associée à une hausse des niveaux protéiques de la β -caténine (Manuscrit 1). Ensemble, ces résultats suggèrent que Shp-2 pourrait réguler l'activation de la voie Wnt/ β -caténine. Pour valider que cette régulation est déjà présente chez des souris en bas âge et ne serait pas due à une compensation de l'épithélium avec le temps, l'expression de la β -caténine totale et

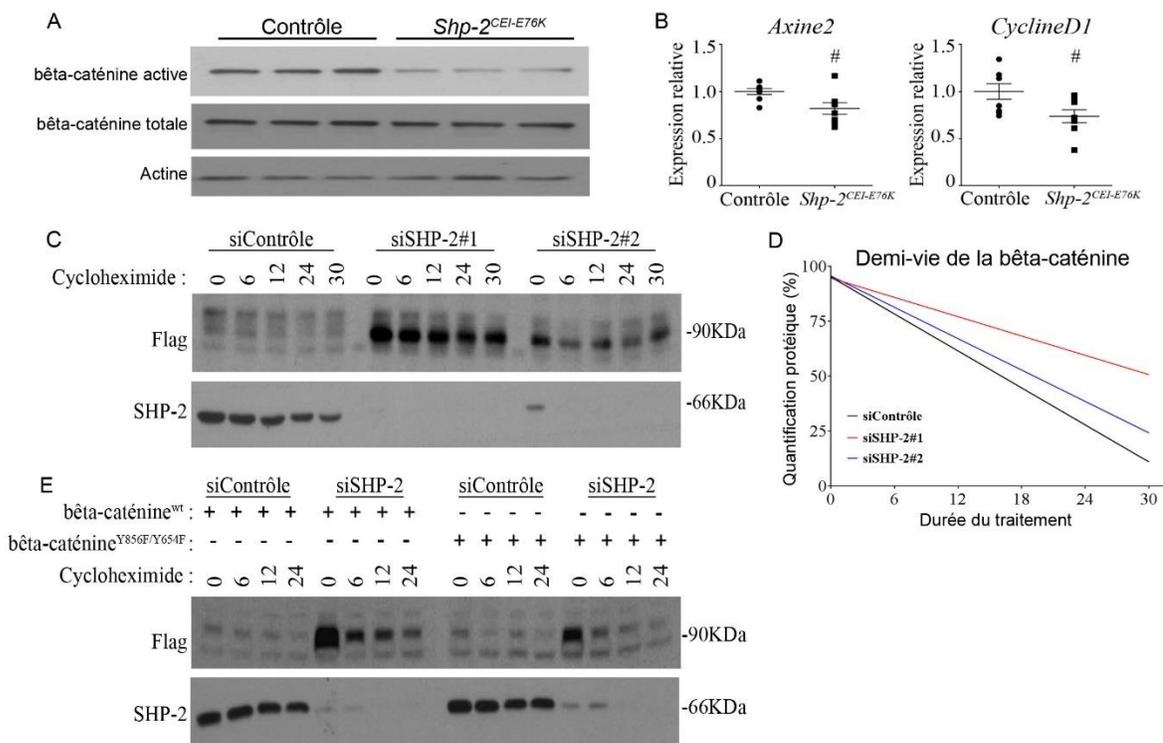


Figure 22. SHP-2 régule la stabilité de la β -caténine. (A) L'expression de la β -caténine totale et de la β -caténine active (non phosphorylée) a été quantifiée par immunobuvardage dans des extraits de jéjunum provenant de souris *Shp-2^{CEI-E76K}* âgées de 1 mois. La β -actine a été utilisée comme contrôle de charge. (B) Les niveaux d'expression de l'*Axine 2* et de la *Cycline D1* ont été mesurés par qPCR et les gènes *Psmc4*, *Pum1* et *Tbp* ont été utilisés comme référence. N= 8. Les graphiques représentent la moyenne \pm SEM. Student's t-test #p=0,05. (C) Un plasmide permettant l'expression d'une protéine de fusion Flag- β -caténine a été transfecté dans les cellules HEK293T conjointement avec des ARN interférents non ciblant (siContrôle) ou dirigés contre SHP-2 (siSHP-2). La stabilité de la β -caténine a été évaluée suite à un traitement avec 50 μ g/mL de cycloheximide. (D) La demi-vie de Flag- β -caténine a été calculée en traçant une courbe de régression à partir des analyses densitométriques. Un graphique représentatif est représenté. Ces expériences ont été répétées avec 3 populations de cellules différentes. (E) L'expression de la β -caténine sauvage et celle de la β -caténine mutée sur les résidus Y86 et Y654 (β -caténine^{Y86F/Y654F}) ont été analysées par immunobuvardage suite à un traitement au cycloheximide tel que décrit ci-haut.

celle de la β -caténine active (non phosphorylée) ont été mesurées par immunobuvardage dans l'épithélium intestinal des souris *Shp-2^{CEI-E76K}* âgées de 1 mois. La Figure 22A démontre que la β -caténine non phosphorylée par GSK3 β est diminuée très tôt suite à l'activation de Shp-2 dans la muqueuse intestinale, suggérant une hausse de son ciblage au protéasome, ce qui corrèle avec une réduction de l'expression de l'*Axine2* et de la *Cycline D1* (Figure 22B)

(Rubinstein *et al.*, 2013). Les niveaux totaux de la β -caténine majoritairement associée aux jonctions cellulaires ne sont toutefois pas modulés dans les souris *Shp-2*^{CEL-E76K}. Par ailleurs, la Figure 22C démontre que SHP-2 régule la stabilité de la β -caténine dans les cellules HEK293T en culture traitées avec un inhibiteur de la synthèse protéique. De manière intéressante, la demi-vie de la β -caténine est augmentée dans les cellules exprimant des ARN interférents dirigés contre les ARN messagers de SHP-2 en comparaison à des ARN non ciblant (Figure 22D). Cette stabilisation semble indépendante de la phosphorylation des tyrosines 86 et 654 de la β -caténine puisque l'expression d'un mutant non-phosphorylable de la β -caténine (β -caténine^{Y86F/Y654F}) ne module pas le résultat obtenu lors de l'inhibition de SHP-2 dans les HEK293T. Ainsi, SHP-2 régule négativement la stabilité de la β -caténine et conséquemment, l'expression de ses gènes cibles.

7.10 La phosphorylation de SHP-2 est augmentée dans les lignées cancéreuses colorectales en culture

L'expression de SHP-2 semble augmentée de façon précoce au cours de la tumorigenèse colorectale puisque l'on retrouve des niveaux plus élevés de cette phosphatase dans les adénomes chez les patients (Figure manuscrit 1). Par contre, l'expression de SHP-2 n'est pas représentative de son niveau d'activité. Il peut être difficile de mesurer l'activité catalytique d'une protéine dans des biopsies de patients dû aux techniques de préparation et à la conservation des échantillons. Néanmoins, il est connu que SHP-2 est phosphorylée sur deux tyrosines présentes sur sa queue C-terminale lorsqu'elle se lie avec des récepteurs activés, ce qui engendre la création de sites de liaison pour des protéines d'échafaudage telle que Grb2 et augmente son potentiel enzymatique (Songyang *et al.*, 1994). Nous avons donc mesuré le niveau de phosphorylation sur les tyrosines 542 et 580 de SHP-2 dans les lignées de cancer colorectal disponibles au laboratoire. Comme l'illustre la Figure 23, autant l'expression totale de SHP-2 que sa phosphorylation Y542 et Y580 sont augmentées dans les lignées cancéreuses colorectales en comparaison aux cellules épithéliales intestinales normales humaines, les HIEC. Ces résultats suggèrent que SHP-2 serait plus active dans les cellules cancéreuses comparativement aux cellules normales.

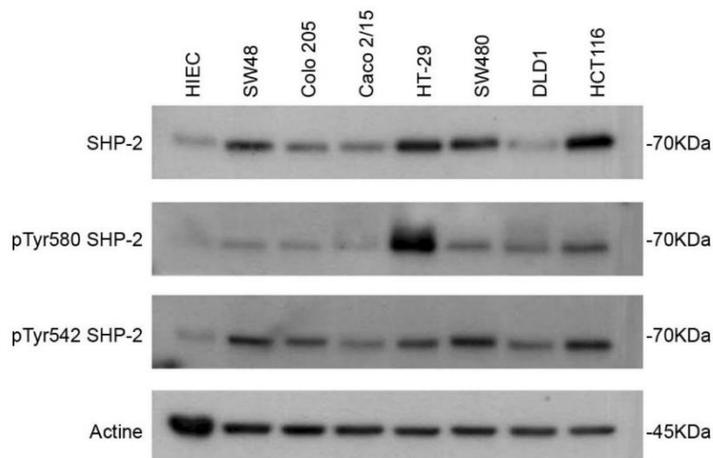


Figure 23. L'expression de SHP-2 et sa phosphorylation sur tyrosine sont augmentées dans les cellules cancéreuses colorectales en culture.

Les lignées cellulaires SW48, Colo205, Caco2/15, HT-29, SW480, DLD-1 et HCT116 ainsi que les CEI normales humaines (HIEC) ont été cultivées à sous-confluence. Les cellules ont été lysées et des analyses en immunobuvardage ont été effectuées afin de mesurer le niveau d'expression de SHP-2 et sa phosphorylation sur tyrosine 580 et 542. La β -actine a servi de référence pour comparer les cellules de CRC et les cellules normales. Les expériences ont été réalisées avec 3 lysats provenant de 3 populations cellulaires différentes. Les immunobuvardages montrés sont représentatifs de 3 expériences.

IV. DISCUSSION

La protéine tyrosine phosphatase SHP-2 est un élément clé dans la régulation de nombreuses voies de signalisation importantes pour le contrôle de la prolifération, de la différenciation, du métabolisme et de l'inflammation. Ce n'est donc pas surprenant que SHP-2 soit associée au développement de nombreuses pathologies, tels que le syndrome de Noonan et le cancer (Bentires-Alj *et al.*, 2004). D'ailleurs, SHP-2 est considérée comme un oncogène dans les cellules hématopoïétiques, tandis que dans de nombreux cancers solides, comme le cancer du sein, elle participe à la tumorigenèse en induisant une EMT, une prolifération accrue et la formation de métastases (Xu *et al.*, 2011; Aceto *et al.*, 2012). De plus, une mutation gain-de-fonction a été répertoriée chez certains patients atteints du CRC, mais aucune étude n'a caractérisé le rôle de SHP-2 dans cette pathologie (Bentires-Alj *et al.*, 2004). En ce qui concerne les MII, des polymorphismes dans le gène codant SHP-2 ont été associés à une susceptibilité accrue de développer une CU chez les patients (Narumi *et al.*, 2009). Les résultats obtenus précédemment par notre équipe ont également démontré que certains patients atteints de MII présentent une diminution de l'expression de SHP-2 dans la muqueuse intestinale. Finalement, la délétion de Shp-2 dans les CEI chez la souris mène au développement spontané d'inflammation dans le côlon, avec un défaut dans la différenciation des cellules caliciformes et des cellules de Paneth, engendrant une augmentation de la perméabilité intercellulaire et une dysbiose (Coulombe *et al.*, 2013, 2016). Comme l'inflammation chronique est un facteur de susceptibilité à développer un cancer du côlon, cela suggère que SHP-2 pourrait être impliquée dans le développement de cette pathologie.

Basé sur les données de la littérature sur le rôle de SHP-2 dans la carcinogenèse et sur le phénotype de nos souris invalidées pour Shp-2 dans les CEI, l'hypothèse générale du projet de cette thèse est donc que ***l'activation de SHP-2 dans les CEI protège la muqueuse colique de l'inflammation mais promeut sa tumorigenèse.*** Les objectifs associés étaient de déterminer la contribution de SHP-2 dans la carcinogenèse colorectale, de vérifier si SHP-2

est un oncogène pour l'épithélium intestinal et d'évaluer le potentiel anti-inflammatoire de SHP-2 dans le côlon.

8.1 ROLE DE SHP-2 DANS LA CARCINOGENESE COLORECTALE

Les résultats présentés dans cette thèse proposent un double rôle pour SHP-2 dans la tumorigenèse intestinale. Premièrement, l'expression de SHP-2 est augmentée dans les adénomes et les tumeurs de stade 1 chez les patients atteints de CRC. Ensuite, la baisse d'expression de SHP-2 dans les cellules colorectales cancéreuses en culture altère leur capacité à croître en indépendance d'ancrage et à migrer au travers le Matrigel. Finalement, la baisse d'expression de Shp-2 dans des cellules normales immortalisées de rat exprimant l'oncogène KRAS^{G12V} renverse l'EMT et le potentiel tumoral de ces cellules. D'un autre côté, l'activation soutenue de Shp-2 dans les CEI chez la souris promeut la formation d'hyperplasie et de lésions festonnées dans l'intestin grêle et dans le côlon, lésions précurseurs au cancer de type festonné chez l'humain. De plus, l'expression de la forme E76K de Shp-2 promeut la formation de tumeurs dans le modèle de tumorigenèse *Apc*^{Min/+}. En dernier lieu, les souris qui ont une délétion de *Shp-2* dans les CEI développent une colite ulcéreuse et un cancer associé à la colite avec l'âge. Ainsi, ces résultats suggèrent que SHP-2 participe au développement du CRC de type classique et de type festonné, tandis qu'elle inhibe le CRC associé à l'inflammation chronique.

8.1.1 L'expression de SHP-2 est augmentée dans les tumeurs colorectales précoces humaines

En 2014, un article a été publié par un autre groupe en lien avec l'expression et l'importance de SHP-2 dans le CRC chez les patients. En mesurant l'expression transcriptionnelle et protéique de SHP-2 dans une large cohorte de patients atteints de CRC, les auteurs ont montré que son expression était diminuée dans les stades TNM avancés de la maladie, corrélant avec la présence de métastases ganglionnaires et un mauvais pronostic (Cai *et al.*, 2014). Cette étude démontre également que l'expression de SHP-2 est diminuée dans les cellules cancéreuses en culture en comparaison aux cellules épithéliales normales de côlon telles que les FHC et CCD841. Finalement, les auteurs ont observé une diminution de l'expression de Shp-2 dans des tumeurs qu'ils ont isolées à partir du modèle murin de

tumorigenèse induite par l'inflammation AOM/DSS et ce, en comparaison à la muqueuse normale adjacente. Ces résultats suggéraient donc que SHP-2 agirait plutôt comme un gène suppresseur de tumeur dans l'intestin, au contraire des observations présentées dans ce document.

Plusieurs raisons peuvent expliquer les différences entre les résultats publiés dans la littérature et ceux présentés dans cette thèse-ci. Dans un premier temps, les études de Cai et collaborateurs ont été effectuées auprès de 232 tumeurs colorectales tandis que nos analyses ont été faites chez 94 tumeurs colorectales paires. Par ailleurs, leurs spécimens ont été classifiés selon le stade et la classification TNM. Les tumeurs de stade 1 sont très peu nombreuses avec seulement 2 patients, tandis que les tumeurs de haut grade sont majoritaires (Stade 3 = 112, stade 4 = 96). De plus, leur analyse ne comprenait pas de lésions précancéreuses telles que les adénomes. Pour cette thèse-ci, les spécimens étaient classifiés en fonction du stade de la maladie. De plus, nous avons 9 spécimens d'adénomes. Les analyses réalisées indiquent que l'expression des transcrits de SHP-2 est augmentée dans les adénomes et les tumeurs de stade 1, ce qui n'a pas été observé dans la biobanque utilisée par Cai et collaborateurs. Dans les stades plus avancés de la maladie, aucune modulation significative de l'expression de SHP-2 n'a été observée, mais une tendance à la baisse est tout de même présente dans les tumeurs de stade 3 ($p=0,17$) (Figure 1 manuscrit). Dans leur étude, Cai et collaborateurs ont établi une corrélation entre la diminution de l'expression de SHP-2 et la faible différenciation des tumeurs, tandis que nous avons démontré que la surexpression de SHP-2 dans les adénomes était bien détectée dans l'épithélium hyperplasique des adénomes. Puisque l'épithélium et le stroma sont hautement modulés au cours de la progression du cancer colorectal (Nava *et al.*, 2015), il est possible que la hausse d'expression de SHP-2 dans l'épithélium ne soit plus détectable dans les tumeurs avancées. Finalement, en ce qui concerne le modèle de tumorigenèse induite par l'inflammation, les observations obtenues par Cai et collaborateurs sont en accord avec nos résultats obtenus chez la souris *Shp-2^{CEI-KO}* qui développent ce type de tumeurs en vieillissant (Figure 6 manuscrit).

Dans un autre ordre d'idée, il serait beaucoup plus pertinent de mesurer l'activité phosphatase de SHP-2 plutôt que son expression globale dans le CRC. En effet, bien que SHP-2 puisse agir en tant que protéine adaptatrice entre autres pour l'activation de la voie RAS/MAPK, son activité catalytique est aussi requise pour la majorité de ses fonctions (Qu, 2000). De plus, SHP-2 se retrouve dans une conformation inhibée en absence de stimulation et c'est sa liaison à des substrats phosphorylés qui mène à son activation (Pluskey *et al.*, 1995). Bien que nos résultats montrent une augmentation de l'expression de SHP-2 dans les stades précoces du CRC et que Cai et collaborateurs ont montré une diminution dans les stades avancés, aucun de ces résultats ne démontre l'impact de ces modulations sur les substrats de SHP-2 et la signalisation en aval. Cependant, l'activité catalytique de SHP-2 est difficile à mesurer dans des biopsies. Il existe des anticorps qui reconnaissent spécifiquement les formes phosphorylées de SHP-2 (Y542 et Y580). La phosphorylation de SHP-2 sert à la fois au recrutement de protéines d'échafaudage et à augmenter l'activité catalytique, ce qui est requis pour l'activation de la voie RAS/MAPK en réponse à l'EGF, au FGF et au PDGF (Li *et al.*, 1994; Lu *et al.*, 2001; Bennett *et al.*, 1994). Ainsi, en mesurant le niveau de phosphorylation de SHP-2 sur ces deux tyrosines, nous serions plus en mesure de spéculer sur son l'état d'activation chez les patients atteints de CRC. Au cours de mes travaux, j'ai voulu mesurer les niveaux de phosphorylation sur tyrosine de SHP-2 dans nos spécimens de tumeurs de patients, mais sans succès. Les analyses effectuées sur les cellules humaines de CRC en culture ont toutefois démontré de forts niveaux de phosphorylation des Y542 et Y580 de SHP-2 dans toutes les lignées analysées en comparaison aux cellules normales HIEC (Figure 24). Cependant, les niveaux d'expression protéique de SHP-2 sont également à la hausse dans ces lignées, ce qui entraîne un biais important pour l'interprétation des résultats. Ainsi, des analyses plus approfondies devront être réalisées afin de déterminer le véritable statut d'activation de SHP-2 dans le cancer colorectal et de spéculer sur son rôle protumoral ou de suppresseur de tumeur.

8.1.2 SHP-2 est-elle un oncogène dans le côlon?

8.1.2.1 SHP-2 est nécessaire à la transformation induite par KRAS

Nos résultats obtenus chez les patients suggèrent que SHP-2 pourrait être impliquée dans l'initiation tumorale puisqu'elle est surexprimée dans les adénomes, donc les stades précoces

de la maladie. Dans le modèle de transformation cellulaire induit par KRAS^{G12V}, l'inhibition d'expression de Shp-2 grâce à des ARN interférents entraîne un renversement de leur morphologie fibroblastique vers une morphologie plus épithéliale de même qu'une diminution de leur potentiel tumoral (Figure 2 manuscrit). Dans ce modèle, il est bien connu que l'activation oncogénique de la voie Ras\MAPK induit l'EMT (Lemieux *et al.*, 2009). Les analyses effectuées dans cette thèse démontrent que l'inhibition de Shp-2 mène à une diminution de la phosphorylation des kinases RAF1, MEK1/2 et ERK1/2 dans les cellules IEC-6;KRAS^{G12V} et dans les cellules cancéreuses DLD-1 (Figure 4 manuscrit). Il est donc fort probable que le retour vers une morphologie plus épithéliale soit directement attribué à la diminution de l'activité de la voie MAPK dans les cellules IEC-6 déficientes pour Shp-2.

Bien que l'implication directe de l'inhibition de la voie SHP-2/MAPK sur le renversement de l'EMT n'ait pas été validée au cours de mes travaux, de nombreuses données de la littérature supportent cette hypothèse. D'abord, de façon similaire à nos résultats, SHP-2 est requise pour la transformation des cellules du cancer du sein en culture. Dans ce contexte, elle régule négativement le recrutement des protéines de la famille RasGAP sur des sites auto-phosphorylés du récepteur HER2 et permet de prolonger l'activation de la voie RAS/MAPK, ce qui est nécessaire à l'EMT (Zhou et Agazie, 2009). Dans la carcinogenèse du sein, la délétion de SHP-2 permet entre autre de restaurer les niveaux d'expression de l'E-cadhérine et de phosphorylation des ERK1/2, ce qui inhibe le potentiel de migration et d'invasion des cellules en culture (Xuan *et al.*, 2017). Finalement, SHP-2 est également impliquée dans la transformation des cellules épithéliales buccales. Une équipe a en effet rapporté que l'expression de SHP-2 est augmentée dans ce type de cancer et qu'elle serait associée à une agressivité des tumeurs. Dans leur étude, les auteurs ont démontré que l'expression d'une forme catalytiquement inactive de SHP-2 (SHP-2^{C459S}) dans les cellules de cancer buccal mène à un renversement de l'EMT, avec une diminution des marqueurs mésenchymateux Vimentine, SNAIL1 et MMP2, encore une fois de façon dépendante de l'activité ERK (Wang *et al.*, 2014). L'activité catalytique de SHP-2 est donc impliquée dans la transformation des cellules du cancer de la bouche. Prises ensemble, ces données indiquent que SHP-2 est requise pour l'induction de l'EMT engendrée par une activation

oncogénique de la voie RAS/MAPK dans de nombreux cancers, dont fort probablement le cancer colorectal tels que mes résultats suggèrent.

Par ailleurs, outre l'activation de la voie ERK/MAPK, les effets connus de SHP-2 sur la transition épithélio-mésenchymateuse pourraient également être attribués à l'activation de la voie du TGF β , comme le suggèrent certaines données de la littérature. Le TGF β promeut la transdifférenciation via de nombreux mécanismes parallèles, dont l'expression de facteurs de croissance, de cytokines/chimiokines et de marqueurs mésenchymateux tels que SNAIL1/2 et TWIST1/2 pour ne nommer que ceux-ci (Moustakas et Heldin, 2016). Dans les cellules pulmonaires tumorales A549, l'ajout de TGF β dans le milieu de culture induit une transformation cellulaire de type EMT. Cette transformation est partiellement bloquée suite à l'inactivation de SHP-2, soit par l'approche d'interférence d'ARN ou via l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique ou encore suite à l'expression du mutant inactif de SHP-2 (SHP-2^{C459S}) dans les cellules traitées avec du TGF β (Li *et al.*, 2014). Au contraire, l'expression d'une forme constitutive active E76V de SHP-2 dans ces cellules promeut l'EMT. Dans cette étude, les auteurs ont identifié la protéine Hook1 comme une nouvelle cible de SHP-2. Hook1 est diminuée au cours de l'EMT dans les cellules A549 et sa surexpression inhibe la transformation tumorale des cellules. De plus, les auteurs ont démontré que Hook1 interagit directement avec les domaines SH2 et PTP de SHP-2, ce qui inhibe son activité catalytique. Ils suggèrent ainsi que Hook1 réprime l'EMT en inhibant SHP-2 (Li *et al.*, 2014). Par ailleurs, un autre groupe s'est intéressé au rôle de SHP-2 dans l'EMT dans les cancers pulmonaire et pancréatique. De façon similaire, ces auteurs ont démontré que le traitement des cellules pulmonaires et pancréatiques avec du TGF β induit une EMT tandis que l'inactivation de SHP-2 restaure la morphologie épithéliale (Buonato *et al.*, 2015). Dans le CRC, une équipe a démontré que le TGF β pouvait induire un phénotype similaire à l'EMT dans les cellules SW480 et HT29 en culture. De façon intéressante, les auteurs ont montré que l'effet du TGF β était indépendant de SMAD4, mais plutôt dépendant de l'activation de ERK (Pino *et al.*, 2010). Il serait donc très intéressant de regarder l'implication de la voie du TGF β /ERK et d'approfondir le phénotype EMT en absence de SHP-2 dans les cellules SW480 et HT29, mais également dans les IEC-6 transformées par KRAS^{G12V}.

8.1.2.2 SHP-2 contribue aux propriétés tumorales des cellules cancéreuses colorectales

8.1.2.2.1 La baisse d'expression de SHP-2 atténue l'agressivité des cellules cancéreuses du côlon en culture

Les travaux présentés dans cette thèse ont aussi permis de démontrer que SHP-2 est requise pour certaines propriétés tumorales des cellules cancéreuses colorectales, notamment leur capacité d'invasion et de croissance en indépendance d'ancrage (Figure 3 manuscrit). Ils démontrent également que SHP-2 module l'activation des kinases MEK et ERK1/2 dans les cellules de CRC en culture et ce, malgré l'expression endogène des formes mutantes oncogéniques de KRAS ou de BRAF. La diminution du niveau d'activation de ERK dans nos modèles serait donc, en partie, à l'origine de la réduction de la croissance en indépendance d'ancrage et du potentiel invasif (Yamaguchi *et al.*, 2011). Bien que les évènements moléculaires impliqués n'aient pas été approfondis au cours de mes travaux, il est connu que la voie SHP-2/ERK participe à la production de métalloprotéases nécessaires pour le remodelage de la matrice extracellulaire (Wang *et al.*, 2014). Comme il a été mentionné plutôt, l'inactivation de SHP-2 dans des cellules du cancer du sein et de la bouche inhibe leur migration et leur capacité d'invasion suite à un retour de la morphologie épithéliale. Ce phénotype s'accompagne aussi d'une réduction de l'expression de certaines métalloprotéases essentielles au potentiel invasif des cellules (Wang *et al.*, 2014). Par ailleurs, des travaux dans notre laboratoire ont précédemment démontré que MMP2 et MMP9 étaient fortement exprimées dans les CEI transformées par une forme constitutive active de MEK1 (Lemieux *et al.*, 2009). Il serait donc très intéressant d'analyser le rôle de SHP-2 dans le contrôle de l'expression des MMPs autant dans les cellules IEC-6;KRAS^{G12V} que dans les cellules DLD-1, SW480 et HT29. Cela permettrait de valider si le potentiel invasif de ces cellules est inhibé par une atténuation de l'expression et/ou de la sécrétion de ce type de protéases.

Il y a fort à parier que la réduction du potentiel invasif des cellules sous-exprimant SHP-2 puisse également être causée par un problème de migration. En effet, l'implication de SHP-2 dans la migration et l'organisation du cytosquelette de divers types cellulaires a déjà été rapportée par plusieurs études. Par exemple, SHP-2 régule l'activation de la kinase FAK (Focal adhesion kinase). En condition basale, FAK est inhibée via une interaction

intramoléculaire. La signalisation des intégrines permet l'activation de FAK qui s'autophosphoryle sur sa Y397 et se lie avec les kinases Src pour initier une cascade d'évènements impliqués dans plusieurs fonctions cellulaires, dont la migration (Zhao et Guan, 2011). Des études ont démontré que la signalisation intégrine/FAK/Src est perturbée en absence de SHP-2. D'abord, les fibroblastes isolés des souris invalidées pour Shp-2 ont des capacités limitées de migration et de propagation sur une matrice de fibronectine. Ces cellules ont également une augmentation du nombre de points d'adhésion focaux et une agrégation de la F-actine à la périphérie cellulaire, un phénotype similaire à celui observé dans les fibroblastes déficients pour FAK (Yu *et al.*, 1998). De plus, l'association de Src avec FAK au cours de l'adhésion cellulaire est inhibée en absence de Shp-2, ce qui perturbe la demi-vie des points focaux d'adhésion. En dernier lieu, les auteurs ont démontré que la déphosphorylation de FAK était significativement réduite en absence de Shp-2 dans les fibroblastes murins en suspension (Yu *et al.*, 1998). Dans le cancer du sein, une étude a démontré que la déphosphorylation de FAK est directement médiée par SHP-2 sur la Y397. Les auteurs ont proposé que les défauts de migration observés dans les cellules cancéreuses mammaires étaient dus à une activation aberrante de FAK en absence de SHP-2, ce qui nuit à la maturation des complexes d'adhésion (Hartman *et al.*, 2013). Bien que ces résultats n'aient pas été présentés dans ce document, mes travaux de recherche ont démontré que la migration des cellules IEC-6;KRAS^{G12V}, DLD-1, SW480 et HT29 est diminuée par la baisse d'expression de SHP-2, lorsque celles-ci sont ensemencées en chambre de Boyden. De plus, il a été observé au cours des expériences effectuées avec les cellules IEC-6 que les cellules qui expriment un shARN dirigé contre Shp-2 étaient plus difficiles à décoller du pétri suite à un traitement avec de la trypsine, ce qui suggère que l'adhésion est plus forte en absence de Shp-2.

8.1.2.2.2 SHP-2^{E76K} dans la transformation des cellules cancéreuses colorectales

Bien que la hausse d'expression de SHP-2 dans les cellules DLD-1, SW480 et HT29 suggère que cette phosphatase est impliquée dans la carcinogenèse colorectale, certains résultats présentés dans cette thèse portent à croire que SHP-2 n'est pas un oncogène dans l'intestin. D'abord, l'expression d'une forme mutante E76G de SHP-2 dans les cellules IEC-6 et les cellules NIH3T3 n'est pas suffisante à induire la croissance au-delà de la confluence ni la

transformation cellulaire (résultats non présentés). Bien que cette forme mutante soit beaucoup plus active que la forme sauvage de SHP-2, un autre groupe avait déjà démontré que les mutants E76K, D61Y et N308D n'induisaient pas la transformation des cellules NIH3T3, au contraire de la forme T507H de SHP-2. Dans les fibroblastes, l'expression de SHP-2^{T507H} induit une transformation des cellules qui sont alors aptes à former des foyers ainsi que de survivre en indépendance d'ancrage (Miyamoto *et al.*, 2008). Ces résultats suggèrent que les différentes mutations de SHP-2 ont des impacts distincts sur l'acquisition des propriétés tumorales et pourraient influencer différemment la carcinogénèse colorectale.

Tout récemment, l'équipe de Wang s'est intéressée au rôle de SHP-2 dans le cancer colorectal. Dans leurs études, les auteurs ont démontré que l'activation de SHP-2 via l'expression ectopique de SHP-2^{E76K} dans les cellules HT29 et HCT116 promeut l'EMT et leur malignité lorsqu'injectées chez des souris immunodéficientes. De plus, ils ont observé que l'activation de SHP-2 stimulait la voie Wnt/ β -caténine dans ces cellules (Zhang *et al.*, 2018). Ils ont alors affirmé que SHP-2^{E76K} agissait comme un oncogène dans les cellules cancéreuses colorectales. Cette observation peut sembler contradictoire avec l'absence de changement du phénotype observée dans les cellules IEC-6 dans lesquelles nous avons surexprimé le mutant SHP-2^{E76K} (non montré). Néanmoins, les cellules HT29 et HCT116 possèdent de nombreuses altérations génétiques (notamment la mutation d'*APC* dans les HT29 et la mutation de *β -caténine* dans les HCT116) qui doivent probablement favoriser l'induction d'un phénotype mésenchymateux suite à l'activation soutenue de SHP-2 en comparaison aux cellules normales IEC-6. Par ailleurs, notre équipe a précédemment démontré que l'activité du complexe β -caténine/TCF4 était diminuée par l'inhibition pharmacologique de MEK suggérant que la voie Wnt/ β -caténine contribue à la transformation des CEI induite par MEK1 (Lemieux *et al.*, 2015). Ainsi, parce qu'elles expriment un niveau protéique plus élevé de la β -caténine active, les cellules cancéreuses doivent être plus sensibles à l'activation de SHP-2, ce qui peut promouvoir l'EMT.

8.1.2.3 L'activation de Shp-2 promeut la tumorigénèse intestinale chez la souris

8.1.2.3.1 Les souris *Shp-2^{CEI-E76K}* développent des lésions festonnées dans l'intestin

Nos études *in vivo* ont démontré que l'expression de la forme active E76K de Shp-2 dans les CEI chez la souris mène à la formation de polypes hyperplasiques et de lésions festonnées dans l'intestin grêle et le côlon. Toutefois, à l'âge de 15 mois, les souris *Shp-2^{CEI-E76K}* n'ont pas développé de carcinome. L'âge, l'environnement, l'alimentation et la présence d'inflammation intestinale chronique sont les principaux facteurs de risques pour le développement d'un cancer colorectal (Johnson *et al.*, 2013). Il faut dire que les conditions d'hébergement de nos souris sont très contrôlées. Il serait donc très intéressant de changer l'environnement ou l'alimentation des souris *Shp-2^{CEI-E76K}* pour vérifier leur susceptibilité à développer un cancer colorectal. Des expériences similaires ont d'ailleurs été réalisées auprès de nombreux modèles murins qui ne développent pas de tumeurs de façon spontanée afin de mieux reproduire les contextes du CRC. Ainsi, le traitement des souris *Villine-Cre ;Kras^{G12D}* avec le carcinogène AOM promeut la progression des lésions hyperplasiques dans le côlon proximal, ce qui suggère que la mutation *KRas^{G12D}* contribue à la tumorigénèse du côlon chez la souris (Calcagno *et al.*, 2008). De façon similaire, l'équipe de Wang et collaborateurs a soumis les souris *Shp-2^{CEI-E76K}* à un traitement à l'AOM/DSS afin de vérifier leur susceptibilité à développer un CAC. Les auteurs ont démontré que l'activation de Shp-2 dans les CEI chez la souris augmente l'incidence tumorale, mais n'affecte pas la taille des tumeurs dans ce modèle (Zhang *et al.*, 2018). Ces résultats combinés aux miens suggèrent donc que l'activation de SHP-2 n'est pas suffisante pour induire la tumorigénèse et mettent en évidence la nécessité d'un événement coopératif, comme l'inflammation ou une autre mutation, pour initier et promouvoir la néoplasie du côlon.

8.1.2.3.2 L'activation de Shp-2 accentue la polypose dans le modèle *Apc^{Min/+}*

Les résultats obtenus chez les souris *Apc^{Min/+}* vont dans le même sens que les travaux de Zhang et collaborateurs. En effet, l'expression de la forme active E76K de Shp-2 chez les souris *Apc^{Min/+}* entraîne une augmentation de la polypose dans le côlon. De plus, les souris *Apc^{Min/+} ;Shp-2^{CEI-E76K}* présentent une forte augmentation de la phosphorylation de Erk1/2 comparativement aux souris contrôles, ce qui a été associé à une augmentation de la

prolifération (Figure 5 manuscrit). Mes résultats suggèrent ainsi que Shp-2 promeut la tumorigenèse chez ces souris probablement en stimulant la voie Erk MAPK. En effet, l'activation de la signalisation MAPK est importante pour la formation de tumeurs chez la souris *Apc*^{Min/+}. D'ailleurs, l'expression de l'oncogène Kras^{G12D} chez les souris *Apc*^{Min/+} et *Apc*^{delta14} promeut la formation de tumeurs dans l'intestin grêle et le côlon de manière dépendante de l'activité Erk (Luo *et al.*, 2009; Haigis *et al.*, 2008). Ensuite, l'inhibition pharmacologique de Mek chez des souris *Apc*^{Min/+} inhibe la formation de tumeurs dans l'intestin et augmente la survie de ces souris (Lee *et al.*, 2010). Effectivement, la phosphorylation de c-Myc par les kinases Erk et sa stabilisation concomitante seraient des mécanismes impliqués dans la polypose chez la souris (Lee *et al.*, 2010). Le facteur de transcription c-Myc fait partie des gènes cibles de la voie Wnt et c'est un médiateur clé de la tumorigenèse intestinale (Yu *et al.*, 1998). D'ailleurs, une surexpression de MYC est fréquemment observée dans les tumeurs colorectales humaines (Erisman *et al.*, 1985). Des études ont démontré que la délétion concomitante de *c-Myc* et d'*Apc* chez la souris résulte en une prolifération, une différenciation et une migration tout à fait normale des cellules épithéliales dans l'intestin grêle, ce qui démontre que le phénotype des souris *Apc*^{Min/+} est fortement médié par ce facteur de transcription (Sansom *et al.*, 2007). Puisque nos résultats ont démontré que l'activation soutenue de Shp-2 dans les CEI chez la souris promeut l'activation des kinases Erk ainsi que la polypose dans le modèle *Apc*^{Min/+}, elle pourrait également influencer la phosphorylation de c-Myc. Une fois de plus, ces observations montrent que l'activation de SHP-2 a un potentiel pro-oncogénique dans l'épithélium colique.

8.1.3 SHP-2 est-elle aussi un suppresseur de tumeur dans le côlon?

8.1.3.1 La délétion de Shp-2 dans l'épithélium des souris *Apc*^{Min/+} stimule la tumorigenèse intestinale

De manière paradoxale, certains des résultats obtenus durant mon doctorat suggèrent que SHP-2 peut agir comme un suppresseur de tumeur dans l'intestin. D'abord, la délétion de Shp-2 dans l'épithélium intestinal augmentait la polypose chez les souris *Apc*^{Min/+} au même titre que son activation constitutive, bien que le niveau d'activation des Erk soit diminué dans ce dernier modèle. Ce résultat, quoique surprenant à première vue, s'explique fort

probablement par la forte inflammation intestinale présente chez les souris *Apc^{Min/+}; Shp-2^{CEI-KO}*. L'inflammation est bien connue pour stimuler la tumorigénèse colique et constitue d'ailleurs un facteur de risque prévalent de cette pathologie chez l'humain. Chez les souris *Apc^{Min/+}*, un traitement au DSS augmente fortement la tumorigénèse du côlon (Tanaka *et al.*, 2006). Cette inflammation est associée à la stimulation de Stat3 et NFκB, deux facteurs de transcription dont l'activation dans les CEI a été associée au développement tumoral dans l'intestin (Terzić *et al.*, 2010). De manière intéressante, l'inactivation de Stat3 dans les CEI des souris *Apc^{Min/+}* diminue le développement d'adénomes précoces, mais est associée à une augmentation du nombre de carcinomes invasifs (Musteanu *et al.*, 2010). Dans ce modèle, la délétion de Stat3 ralentit l'apparition des lésions néoplasiques tout en favorisant la transition adénome-carcinome dans les polypes qui réussissent à se former. Des études subséquentes ont démontré que la délétion de Stat3 chez la souris empêche la dégradation de Snail-1 induite par la GSK3β et médie la transformation cellulaire (Lee *et al.*, 2012). Chez les souris *Apc^{Min/+}; Shp-2^{CEI-KO}*, une augmentation importante de la phosphorylation activatrice de Stat3 et du nombre d'adénomes dans le côlon a été observée (> de 30 fois), ce qui corrèle avec le rôle positif attribué à Stat3 dans la tumorigénèse intestinale. Malheureusement, nous n'avons pas pu analyser l'impact de la signalisation Shp-2/Stat3 sur la progression des polypes en carcinomes. Bien que les souris *Apc^{Min/+}* puissent survivre plusieurs mois, la délétion de Shp-2 dans ce modèle induit une colite chronique et diminue grandement la survie des souris, qui doivent d'ailleurs être sacrifiées avant 3 mois. À cet âge, bien que quelques adénocarcinomes aient été identifiés, aucune différence significative n'a été observée entre les souris *Apc^{Min/+}; Shp-2^{CEI-KO}* versus *Apc^{Min/+}*.

En plus de l'activation du facteur de transcription Stat3, il ne faut pas oublier que la délétion de Shp-2 dans l'épithélium intestinal diminue fortement le nombre de cellules caliciformes et ce, dès 2 semaines de vie (Coulombe *et al.*, 2013). La réduction dans la production de la mucine 2 est un évènement qui accélère le développement de tumeurs intestinales chez la souris (Velcich *et al.*, 2002). D'ailleurs, lorsque les souris *Muc2^{-/-}* sont croisées avec le modèle *Apc^{Min/+}* ou encore *Apc^{I638N/+}*, l'incidence des tumeurs est augmentée avec une prépondérance pour les tumeurs dans le côlon plutôt que dans l'intestin grêle (Yang *et al.*, 2008), ce qui est également observé chez les souris *Apc^{Min/+}; Shp-2^{CEI-KO}*. Cette polypose

accrue a été attribuée à une augmentation de la signalisation Wnt en absence de Muc2 par les auteurs. Une telle augmentation a également été observée dans l'épithélium intestinal déficient pour Shp-2 (Coulombe *et al.*, 2016). Le microenvironnement inflammatoire serait également impliqué dans l'induction importante de la tumorigenèse dans ces deux modèles. Des études réalisées sur des souris *Apc^{Min/+}* traitées au DSS ont montré que le stress oxydatif, mesuré notamment par une augmentation de COX-2 et de iNOS, favorise le développement tumoral de façon similaire à ce qui est observé chez les souris *Apc^{Min/+};Shp-2^{CEI-KO}* et *Apc^{Min/+};Muc2^{-/-}* (Tanaka *et al.*, 2006). Ainsi, bien que les souris *Shp-2^{CEI-KO}* présentent une diminution de l'activation des kinases Erk, l'augmentation précoce de la β -caténine active, la réduction importante de la production du mucus et la présence d'un microenvironnement inflammatoire, contribuent certainement à l'initiation tumorale dans le côlon des souris *Apc^{Min/+};Shp-2^{CEI-KO}*.

8.1.3.2 Les souris invalidées pour Shp-2 développent un cancer associé à la colite

Les patients atteints de MII ont une susceptibilité accrue à développer un cancer colorectal (Rubin *et al.*, 2012). Avec le temps, l'accumulation répétée de dommages induits par l'inflammation chronique augmente le risque de développer un CAC. Ainsi, les patients atteints de CU ont environ 20% de risque d'avoir un cancer du côlon après 30 ans de maladie (Terzić *et al.*, 2010). Précédemment, notre équipe a démontré que les souris *Shp-2^{CEI-KO}* développent de l'inflammation dans le côlon en bas âge (Coulombe *et al.*, 2013). Mes travaux actuels ont démontré que cette inflammation ne se résorbe pas avec le temps et qu'au contraire, elle évolue en tout point similaire à une colite ulcéreuse, avec une activation soutenue de Stat3 et de NFkB ainsi qu'une production importante de plusieurs cytokines, dont l'IL-6. En fait, cette inflammation est tellement sévère que plusieurs souris déficientes pour Shp-2 meurent de façon précoce en comparaison aux souris contrôles. Chez les patients atteints de CU sévère, il n'est pas rare qu'une grande proportion du côlon doive être retirée pour éviter ce genre de complications (Frizelle et Burt, 2001). De façon intéressante, toutes les souris *Shp-2^{CEI-KO}* qui ont survécu jusqu'à 15 mois ont développé un cancer associé à la colite et certaines souris ont même développé des carcinomes invasifs dans la sous-muqueuse et la musculuse (Figure 6 manuscrit). Ceci suggère que l'inactivation de SHP-2 dans

l'épithélium intestinal induit de l'inflammation colique qui, avec le temps, stimule le développement d'un CAC.

8.1.3.2.1 La dysbiose dans la carcinogenèse colorectale en absence de Shp-2

La microflore est un facteur important pour la tumorigenèse colorectale. De manière intéressante, une modulation des bactéries présentes dans les fèces des souris *Shp-2^{CEI-KO}* a été observée et ce, à 2 semaines et 1 mois après la naissance (Coulombe *et al.*, 2016). Cette microflore est impliquée dans l'apparition de l'inflammation dans notre modèle, puisqu'un traitement avec des antibiotiques permet de l'inhiber (Coulombe *et al.*, 2013). Un des changements majeurs observés chez les souris *Shp-2^{CEI-KO}* est une réduction des *Firmicutes* et une augmentation des *Enterobacteriaceae/E. coli* (Coulombe *et al.*, 2016). Étonnamment, certaines souches plus invasives ou génotoxiques de *Escherichia coli* sont retrouvées chez des patients atteints de MII et de CRC où elles participent au développement de ces pathologies (Bonnet *et al.*, 2014; Gagnière *et al.*, 2016). Des études effectuées chez les souris déficientes pour l'IL-10 ont démontré que l'inflammation de la muqueuse qui est observée dans ce modèle induit une modification de la composition du microbiote intestinal. De façon intéressante, la colonisation des souris *IL-10^{-/-}* avec une souche génotoxique de *E coli* NC101 promeut la formation de carcinomes invasifs suite à un traitement à l'AOM (Arthur *et al.*, 2012). Au contraire, l'utilisation d'un cocktail d'antibiotiques à large spectre réduit la polypose chez les souris présentant une perte de fonction d'*Apc* (Grivennikov *et al.*, 2012). Ces résultats suggèrent que la colite promeut le CRC en modulant entre autres le microbiote et en favorisant l'émergence et/ou l'expansion de micro-organismes génotoxiques. Il serait donc très intéressant d'évaluer le rôle du microbiote des souris *Shp-2^{CEI-KO}* dans l'apparition du cancer, mais également dans la malignité des tumeurs. Par exemple, cela pourrait être possible grâce à un transfert de flore des souris *Shp-2^{CEI-KO}* dans le modèle *Apc^{Min/+}*.

8.1.3.2.2 Implication de l'axe IL-17/IL-23 dans le CAC induit par la délétion de Shp-2

Les travaux de cette thèse suggèrent l'implication de l'axe IL-17/IL-23 dans les altérations phénotypiques du côlon des souris *Shp-2^{CEI-KO}* âgées. Ces deux cytokines sont associées au développement de maladies auto-immunes et inflammatoires chroniques chez l'humain

(Cătană *et al.*, 2015). Des études récentes ont démontré que ces cytokines jouent également un rôle important dans l'apparition de plusieurs types de cancers associés à l'inflammation. Dans le CRC, des niveaux d'expression élevés d'IL-23, d'IL-17A et du récepteur de l'IL-23 ont été associés à un pronostic défavorable et une progression rapide des carcinomes de stade 1 et 2 vers des stades métastatiques et incurables (Schetter *et al.*, 2009; Tosolini *et al.*, 2011). Dans le modèle AOM/DSS, l'IL-17A est importante pour le développement tumoral puisque sa délétion génétique diminue de 4 fois le nombre de tumeurs et de 3 fois la taille des tumeurs formées (Hyun *et al.*, 2012). L'inflammation causée par le DSS dans ce modèle est aussi moins prononcée avec une réduction des médiateurs inflammatoires IL-6, IFN γ et TNF α ainsi qu'une diminution du nombre de cellules positives pour phospho-Stat3, CyclineD1 et β -caténine (Hyun *et al.*, 2012).

Chez la souris *Apc*^{Min/+}, bien que ce ne soit pas un modèle de CAC, l'invalidation de l'IL-23 ou de son récepteur diminue de près de 3 fois la taille des tumeurs et inhibe la transition des adénomes en adénocarcinomes (Grivennikov *et al.*, 2012). Dans cette étude, les auteurs ont émis l'hypothèse que c'est la perméabilité épithéliale accrue qui serait responsable de l'expression des IL-17 et IL-23 par les cellules immunitaires de la muqueuse et de la sous-muqueuse. Ils ont d'ailleurs démontré que les tumeurs des souris *Apc*^{Min/+} avaient une augmentation de la perméabilité épithéliale en comparaison à la muqueuse saine adjacente, une réduction de la production de mucus et une réduction de l'expression des protéines de jonction, ce qui a également été observé dans les tumeurs colorectales chez l'humain (Grivennikov *et al.*, 2012). De façon intéressante, nos études précédentes ont démontré que les souris *Shp-2*^{CEI-KO} âgées de 2 semaines présentent aussi une réduction du niveau d'expression des protéines de jonction et de la production de mucines, ce qui module la perméabilité épithéliale (Coulombe *et al.*, 2013). Ce changement phénotypique pourrait être responsable de l'induction de l'axe IL-17/IL-23 dans notre modèle en permettant aux micro-organismes et aux antigènes de pénétrer dans la muqueuse. De plus, une signature de l'IL-17 a été observée dans la muqueuse des souris *Shp-2*^{CEI-KO}, soit une augmentation de l'IL-6, de phospho-Stat3, de CyclineD1 et de β -caténine. Il est donc fort probable que cette cytokine soit responsable, du moins en partie, de l'apparition du CAC suite à la délétion de *Shp-2* dans les CEI.

8.1.3.2.3 La délétion de Shp-2 induit des dommages à l'ADN

De façon intéressante, les altérations phénotypiques observées chez les souris *Shp-2^{CEI-KO}* sont très similaires au phénotype des souris traitées à l'AOM/DSS. Dans ce modèle, les souris sont injectées avec un puissant agent carcinogène, l'AOM, puis elles reçoivent trois séries de traitement au DSS pour induire de l'inflammation. Au bout de 20 semaines, la totalité des souris ainsi traitées ont développé un CAC, soit des adénocarcinomes avec la présence de quelques adénomes. Ces néoplasmes sont caractérisés par un marquage positif de la β -caténine, COX2 et iNOS, mais ne présentent pas de mutations de *Tp53*. De plus 18% des souris traitées à l'AOM/DSS développent des adénocarcinomes qui envahissent la sous-muqueuse, la musculuse ou la séreuse (Tanak *et al.*, 2003). De leur côté, 100% des souris *Shp-2^{CEI-KO}* analysées à 15 mois présentent des adénocarcinomes et certaines d'entre elles ont des carcinomes qui atteignent la sous-muqueuse et la musculuse. De plus, les tumeurs des souris *Shp-2^{CEI-KO}* ont aussi une augmentation de β -caténine, COX2 et iNOS tout comme chez le modèle AOM/DSS, mais présentent également des mutations de *Tp53* (Figure 7 manuscrit). Ces résultats suggèrent donc que la délétion de Shp-2 dans les CEI induit des altérations similaires au traitement AOM/DSS.

Lorsqu'il est injecté chez la souris, l'AOM est métabolisé en sous-produits qui induisent des mutations de l'ADN, notamment dans le gène *Kras* (Jiezhong Chen et Huang, 2009). Malheureusement, nos analyses de séquençage n'ont pas permis de détecter la présence de mutations de *Kras* ou d'*Apc* dans les tumeurs extraites du côlon des souris *Shp-2^{CEI-KO}* (résultats non présentés). Toutefois, ces tumeurs présentent des dommages importants à l'ADN tel que visualisé par la phosphorylation de l'histone H2AX (Figure 8 manuscrit). Dans des cellules en culture, il a été montré que SHP-2 est activée suite à des dommages à l'ADN et qu'elle est requise pour l'activation de CHK1 et la réparation de l'ADN (Tsang *et al.*, 2012). L'inhibition de Shp-2 dans les CEI chez la souris pourrait donc contribuer directement à l'accumulation des dommages à l'ADN en plus de l'inflammation. D'ailleurs, une réduction significative du messenger de *Mlh1* a été mesurée dans la muqueuse des souris *Shp-2^{CEI-KO}* âgées de 15 mois (résultat non présenté), ce qui pourrait avoir un impact majeur sur l'efficacité de la réparation de l'ADN et l'apparition du cancer dans ce contexte inflammatoire. Il est possible que ces défauts dans la réparation de l'ADN et l'accumulation

de dommages soient à l'origine de la mutation R273H de Tp53 qui a été observée dans la muqueuse de nos souris *Shp-2^{CEI-KO}* âgées. Chez la souris, cette mutation a été associée à une augmentation du potentiel invasif des cellules tumorales et de la formation de métastases (Tan *et al.*, 2015). Il serait donc très intéressant de vérifier si des métastases sont détectables dans le foie ou les poumons chez les *Shp-2^{CEI-KO}* âgées. Un marquage des cellules cancéreuses qui ont envahi la sous-muqueuse et la musculature pourrait également permettre de valider l'expression de Tp53 dans ces cellules.

8.2 ROLE DE SHP-2 DANS LA PROTECTION DU COLON CONTRE L'INFLAMMATION

Les résultats présentés dans cette thèse suggèrent que l'activation soutenue de SHP-2 protège la muqueuse du côlon contre le développement d'une inflammation intestinale. De manière intéressante, l'activation de Shp-2 dans les CEI protège les souris contre le développement de la colite induite avec le DSS ou suite à une infection avec le pathogène *Citrobacter rodentium*. Cette protection a été associée à une augmentation du nombre de cellules caliciformes, à une sécrétion de mucus accrue et à une augmentation de la capacité régénérative de l'épithélium intestinal. Bien que tous ces résultats suggèrent que Shp-2 protège l'épithélium de l'inflammation intestinale, en régulant notamment les voies Ras/MAPK et Jak/Stat, aucun lien direct entre ces voies et la protection contre l'inflammation n'avait encore été confirmé.

8.2.1 Les cellules sécrétrices dans le développement de la colite

8.2.1.1 Shp-2 régule négativement la différenciation des cellules de Paneth

Les cellules de Paneth ont un impact sur le développement de l'inflammation intestinale, notamment dans la colite infectieuse, puisqu'elles jouent un rôle clé dans la modulation de la composition du microbiote intestinal et dans l'élimination des bactéries pathogènes (Salzman, 2010). Chez certains patients atteints de MII, la sécrétion des peptides antimicrobiens par les cellules de Paneth est diminuée en réponse à la microflore, ce qui donne lieu à une dysbiose (Frank *et al.*, 2007). Chez la souris, il a été démontré qu'une infection avec *Citrobacter rodentium* mène à une sécrétion accrue des facteurs Reg3, des défensines et du lysozyme par les cellules de Paneth. Des études ont démontré que c'est l'axe

IL-22/Stat3 qui contrôle la production des peptides antimicrobiens en réponse à *C. rodentium* (Vaishnava *et al.*, 2011). De plus, cette interleukine est requise pour la résistance précoce à l'infection puisque les souris *IL-22^{-/-}* succombent rapidement à l'infection dans les 8 à 12 premiers jours et ne démontrent aucune induction de Reg3 γ (Zheng *et al.*, 2008). Lorsque Reg3 γ est réintroduit dans les souris *IL-22^{-/-}*, celles-ci sont partiellement résistantes à l'infection, indiquant que Reg3 est un acteur majoritaire de la réponse à l'IL-22 et dans l'élimination de *C. rodentium* (Zheng *et al.*, 2008). On pourrait donc spéculer que les composés antimicrobiens seraient responsables de la résistance des souris *Shp-2^{CEI-E76K}* à l'infection par ce pathogène. Cependant, une forte réduction du nombre de cellules de Paneth chez les souris qui expriment une forme active de Shp-2 dans les CEI a été observée. De plus, la production des défensines, de l'angiogénine 4, de Reg3 γ et de Reg3 β est réduite dans la muqueuse des souris *Shp-2^{CEI-E76K}* à 1 mois en comparaison aux souris contrôles (Figure 12). Chez les souris infectées avec *C. rodentium*, l'activation de Shp-2 inhibe l'induction de Reg3 γ et de Reg3 β contrairement à ce qui est observé chez les souris de type sauvage (résultat non présenté). Ainsi, il semblerait que la résistance des souris *Shp-2^{CEI-E76K}* à la colite infectieuse ne soit pas due à une élimination plus rapide des bactéries par les composés antimicrobiens provenant des cellules de Paneth.

8.2.1.2 Shp-2 favorise la maturation des cellules caliciformes

Il est connu que des dérèglements au niveau des cellules caliciformes sont également impliqués dans le développement des MII (Chapitre 2). Premièrement, le mucus protège contre le contenu de la lumière intestinale et contre le stress mécanique du bol alimentaire (Noah *et al.*, 2011). Une diminution de la production de MUC2 a été répertoriée chez les patients atteints de CU (Dorofeyev *et al.*, 2013; Tytgat *et al.*, 1996) et les souris invalidées pour *Muc2* développent de l'inflammation de façon spontanée dans le côlon (Van der Sluis *et al.*, 2006). De plus, nous avons démontré que nos souris *Shp-2^{CEI-KO}* souffrent de colite et qu'elles ont une forte diminution du nombre de cellules caliciformes (Coulombe *et al.*, 2013). Au contraire de ces modèles, l'activation de Shp-2 dans les CEI chez la souris mène à une production accrue de cellules caliciformes et de la sécrétion du mucus, ce qui protège contre le développement de la colite chimique et infectieuse (Figure 13). La contribution du mucus

dans cette protection est évidente, mais n'a pas été étudiée davantage dans notre modèle. De nombreuses hypothèses restent à valider, notamment à savoir si la sécrétion du mucus plus importante en présence d'une forme active de Shp-2 entraîne un transit accéléré du contenu de la lumière intestinale et nuit à l'établissement de *C. rodentium*. D'ailleurs, l'épaississement de la couche de mucus associée à l'épithélium peut empêcher les bactéries d'adhérer à la muqueuse et de créer des dommages, comme ce qui est observé chez les souris *Shp-2^{CEI-E76K}*. Dans la colite induite au DSS, cet épaississement de la couche de mucus interne pourrait être responsable de la réduction de l'inflammation puisque le contact entre la muqueuse et le détergent serait diminué chez les souris *Shp-2^{CEI-E76K}* en comparaison aux souris contrôles.

D'un autre côté, l'expression accrue de *Tff3* suite à l'activation soutenue de Shp-2 peut très certainement participer à la protection contre la colite. Cette protéine est co-sécrétée avec la Mucine 2 par les cellules caliciformes et augmente la viscosité et l'élasticité de la couche de mucus recouvrant la muqueuse (Kjellek, 2009). De plus, TFF3 forme des hétéromères avec les protéines associées au mucus, dont le FCGBP (IgG-Fc binding protein) (Albert *et al.*, 2010), participant de ce fait à la protection de l'épithélium. Dans un contexte de colite ulcéreuse, *Tff3* est requis pour la régénération épithéliale et les souris qui en sont invalidées ne survivent pas à un traitement aigue au DSS en comparaison aux souris de type sauvage qui récupèrent complètement de la maladie (Mashimo *et al.*, 1996). Ainsi, en induisant la différenciation des cellules caliciformes et la production de la Mucine 2, de la Mucine5ac et de *Tff3*, l'activation de Shp-2 promeut la fonction barrière de l'épithélium intestinal.

8.2.2 SHP-2/STAT3 dans la régulation de l'inflammation

Le modèle de souris invalidées pour Shp-2 dans les CEI développe de l'inflammation très rapidement dans le côlon et celle-ci se maintient dans le temps. Avant même l'apparition de l'inflammation, une augmentation de la phosphorylation sur la Y705 de Stat3 a été observée dans la muqueuse des souris *Shp-2^{CEI-KO}* (Coulombe *et al.*, 2013). Or, les rôles de Stat3 dans le développement de l'inflammation sont controversés et il n'est pas clair si son activation participe au phénotype inflammatoire observé ou si l'épithélium tente simplement de se

protéger. En effet, il a été démontré que l'activation de Stat3 dans les CEI stimule la réparation de l'épithélium et la survie cellulaire (Pickert *et al.*, 2009). D'ailleurs, les souris invalidées pour Stat3 dans les CEI développent une colite induite au DSS plus sévère que les souris contrôles (Pickert *et al.*, 2009). Ainsi, à la lumière de ces données de la littérature, l'activation importante et rapide de Stat3 dans nos souris *Shp-2^{CEI-KO}* pourrait représenter une réponse de protection de l'épithélium contre l'inflammation. Pour valider cette hypothèse, nous avons invalidé Stat3 dans les CEI de nos souris *Shp-2^{CEI-KO}*. Les résultats préliminaires obtenus ont démontré que la délétion concomitante de Stat3 et de Shp-2 dans les CEI diminue modestement les signes macroscopiques de la colite induite par l'absence de Shp-2, mais atténue significativement les dommages à la muqueuse du côlon en comparaison aux souris *Shp-2^{CEI-KO}* seules (Figure 18). Comme les souris *Shp-2^{CEI-KO};Stat3^{CEI-KO}* présentent un DAI et un score histologique supérieurs aux souris contrôles, nos résultats suggèrent que l'activation soutenue de Stat3 observée dans les CEI des souris *Shp-2^{CEI-KO}* contribue à l'inflammation observée dans ce modèle. Par ailleurs, la délétion de Stat3 chez les souris *Shp-2^{CEI-KO}* ne restaure pas le défaut de différenciation des cellules sécrétrices observé dans l'épithélium de l'intestin grêle et du côlon. En effet, les souris ayant la double délétion démontrent toujours une métaplasie des cellules de Paneth dans le côlon proximal et une diminution du nombre de cellules caliciformes, responsables de l'induction de l'inflammation en absence de Shp-2 (Figure 18E).

De façon similaire aux souris *Shp-2^{CEI-KO}*, les patients qui souffrent de maladies inflammatoires intestinales ont des niveaux élevés de la phosphorylation de STAT3, à la fois dans les cellules de la *lamina propria* et les cellules épithéliales (Neufert *et al.*, 2010; Sugimoto, 2008). De plus, l'induction d'une colite chez la souris entraîne une phosphorylation rapide de ce facteur de transcription (Pickert *et al.*, 2009). Alors que STAT3 est requis pour la réparation de blessure suite à un stress inflammatoire modéré, son activation soutenue semble plutôt délétère pour l'épithélium intestinal dans des conditions pathologiques. Dans des modèles murins souffrant de colite chronique, notamment chez les souris *IL-10^{-/-}*, l'inhibition de l'axe IL-6/Stat3 suite à l'injection d'anticorps bloquant permet de réduire la sévérité de l'inflammation (Atreya *et al.*, 2000). Ce phénotype est associé à une diminution du recrutement et à l'induction de l'apoptose dans les cellules immunitaires de la

muqueuse. De plus, STAT3 est également nécessaire à l'expression de gènes responsables de la maturation des cellules Th17, impliquées dans la colite ulcéreuse (Tripathi *et al.*, 2017). Bien que ces données suggèrent plutôt un rôle primordial de STAT3 mésenchymateux dans la promotion de la maladie, nos résultats démontrent clairement une importance de sa signalisation épithéliale dans le développement de notre phénotype inflammatoire. Il faut aussi rappeler que l'augmentation de la phosphorylation sur tyrosine de Stat3 a été mesurée dans les souris *Shp-2^{CEI-KO}* dès la naissance, avant même l'apparition des premiers signes d'inflammation et avant l'expression accrue de certaines cytokines pro-inflammatoires et de la mise en place d'un système immunitaire mature (Coulombe, 2015). Étant impliquée dans l'expression de chimiokines (Zhang *et al.*, 2015), cette activation soutenue de Stat3 influence certainement le recrutement de cellules immunitaires à la muqueuse et participe au développement de la colite. Ainsi, dans notre modèle de souris *Shp-2^{CEI-KO}*, l'activation de Stat3 initie une communication entre les cellules épithéliales et les cellules immunitaires sous-jacentes, de laquelle résulte une boucle d'amplification inflammatoire.

8.2.3 La réparation de blessure

Lors de la colite, des mécanismes de réparation de blessure entrent en jeu afin de limiter l'étendue des dommages à l'épithélium et assurer un retour rapide à l'homéostasie. Ainsi, lorsqu'il y a une brèche dans l'épithélium intestinal, les cellules du pourtour se dépolarisent, s'étalent et migrent afin de recouvrir provisoirement la blessure (Iizuka et Konno, 2011). Ensuite, la prolifération des cellules épithéliales est accentuée et de nouvelles cellules différenciées viennent repeupler l'épithélium. La balance entre la migration, la prolifération et la différenciation est importante afin d'assurer une réparation efficace des dommages (Iizuka et Konno, 2011). De façon intéressante, les travaux de cette thèse ont démontré que Shp-2 est nécessaire à la migration et à la prolifération des CEI chez la souris, mais également dans les cellules en culture et dans les organoïdes. De plus, Shp-2 influence la différenciation des cellules épithéliales et favorise la production du mucus qui protège la muqueuse. Ainsi, l'activation de Shp-2 protège en partie de la colite en induisant une réparation de l'épithélium plus rapide et efficace.

8.2.3.1 SHP-2 promeut la migration des cellules épithéliales intestinales

La migration des cellules épithéliales aux pourtours d'une blessure s'initie dans les minutes suivant les dommages (Sturm et Dignass, 2008). Cette première réponse est indépendante de la prolifération. Au cours de mes travaux, le rôle positif de Shp-2 dans la migration des CEI a été montré à plusieurs reprises. D'abord, l'incorporation du BrdU suivie de 18 heures de repos a permis de visualiser que les CEI qui expriment une forme active de Shp-2 parcourent une plus grande distance que les cellules normales. Ensuite, dans les cellules DLD-1, SW480 et HT29 en culture, la baisse d'expression de SHP-2 diminue la migration en chambre de Boyden. Finalement, des travaux précédents du laboratoire ont démontré que SHP-2 est requis pour la fermeture d'une blessure infligée sur une monocouche de cellules Caco-2/15 et IEC-6 (Coulombe, 2015). Deux mécanismes avaient alors été proposés, soit une anomalie de la voie RhoA/ROCK et une inhibition de la signalisation MAPK. Dans un premier temps, nous avons démontré que les cellules déficientes pour SHP-2 présentaient une augmentation de l'activité de RhoA suivant l'induction d'une blessure sur une monocouche. De manière intéressante, un traitement avec un inhibiteur pharmacologique de ROCK a permis de restaurer la migration des cellules Caco-2/15 sous-exprimant SHP-2 au niveau des cellules contrôles, ce qui suggère que la voie SHP-2/RhoA/ROCK est impliquée dans le phénotype migratoire des CEI (Coulombe, 2015).

En ce qui concerne le rôle de la voie RAS/MAPK dans la restitution épithéliale, des études ont démontré que l'activation des kinases ERK1/2 est accentuée dans les cellules qui recouvrent la blessure en comparaison aux cellules adjacentes (Iizuka et Konno, 2011). De plus, l'inhibition de MEK dans le feuillet de cellules épithéliales en mouvement atténue fortement leur mobilité (Iizuka et Konno, 2011). D'un autre côté, un phénotype similaire est observé suite à l'inhibition de Src dans les cellules épithéliales, ce qui est accompagné par une réduction de l'activité ERK. Ainsi, les kinases de la famille Src influencent l'activation de ERK et la restitution épithéliale (Matsubayashi *et al.*, 2004). Chez les souris *Shp-2^{CEI-E76K}*, il est fort probable que les kinases de la famille Src soient plus actives que chez les souris contrôles puisque Shp-2 régule négativement l'activité et la localisation de leurs inhibiteurs, les Csk (Zhang *et al.*, 2004). De plus, Shp-2 peut aussi déphosphoryler directement la queue C-terminale de Src pour lever l'inhibition induite par les Csk (Zhang *et*

al., 2004). Cette régulation de la migration par l'axe Shp-2/Src/Erk pourrait donc être aussi impliquée dans la restitution épithéliale et dans la protection contre la colite.

8.2.3.2 SHP-2 dans le maintien des cellules souches et la régénération cryptale

Au cours de la réparation de blessure, la prolifération cellulaire est également importante afin de repeupler l'épithélium. Les résultats actuels ont démontré que la prolifération cryptale est augmentée chez nos souris *Shp-2^{CEI-E76K}* ainsi que dans les organoïdes dérivés de leurs cryptes intestinales. Étonnamment, les marqueurs de cellules souches CBC *Ascl2* et *Olfm4* sont diminués dans les entéroïdes qui expriment une forme active de Shp-2, mais aucune modulation de LGR5 n'a été observée. La diminution de certains gènes associés aux cellules souches pourrait être attribuée à une réduction de leur nombre dans l'intestin des souris *Shp-2^{CEI-E76K}* ou encore à des défauts dans les mécanismes menant à l'expression de ces gènes, comme une diminution de l'activité de la voie Wnt/ β -caténine. Il serait donc intéressant de croiser les souris *Shp-2^{CEI-E76K}* avec des souris qui expriment un gène reporteur sous le contrôle du promoteur de *LGR5* afin de visualiser et de dénombrer *in vivo* les cellules souches CBC. Ceci pourrait permettre de mieux comprendre la régulation du compartiment souche par Shp-2 et par la signalisation en aval. Par ailleurs, une altération des cellules souches a également été observée dans l'intestin des souris qui expriment l'oncogène *Kras^{G12D}* ou *Braf^{V600E}*, suggérant que l'activation soutenue de la voie Ras/MAPK influence négativement le compartiment souche tout en favorisant la prolifération des cellules progénitrices (Carragher *et al.*, 2010; Feng *et al.*, 2011). Selon les résultats, le taux de prolifération accru en présence d'une forme active de Shp-2 est restauré à des niveaux contrôlés lors de l'inhibition pharmacologique de MEK dans les entéroïdes dérivés des souris *Shp-2^{CEI-E76K}* (Figure 14). Ces résultats suggèrent que les cellules progénitrices de l'intestin se divisent plus rapidement en réponse à l'activation de la voie MEK/ERK afin de compenser la diminution des cellules souches. Ainsi, en cas de dommages ou de stress inflammatoire, l'activation de Shp-2 dans les CEI permettrait de régénérer plus rapidement l'épithélium et participerait à la protection accrue contre la colite, malgré le fait que les cellules souches CBC soient quelque peu altérées.

8.3 ROLE DE SHP-2/MAPK DANS LE CONTROLE DE LA DIFFERENCIATION DES CELLULES CALICIFORMES

Quelques évidences de la littérature suggèrent que la voie RAS/MAPK pourrait être impliquée dans le contrôle de la différenciation des cellules caliciformes de l'intestin. Par exemple, les souris qui expriment une forme oncogénique de Kras ou de Braf ont plus de cellules caliciformes dans leur intestin et ces cellules sont plus grosses. De plus, les souris *Villine-Cre ;Kras^{G12D}* ont moins de cellules de Paneth dans l'intestin grêle (Feng *et al.*, 2011). Chez les souris invalidées pour Shp-2 et qui présentent une diminution de l'activation de Erk, le nombre de cellules caliciformes est réduit et une métaplasie des cellules de Paneth est observée (Coulombe *et al.*, 2013, 2016). Dans le modèle utilisé au cours de mes études, mes résultats ont démontré que l'activation de Shp-2 augmente la phosphorylation de Erk et favorise la différenciation des cellules caliciformes aux dépens des cellules de Paneth. Les principales voies de signalisation impliquées dans la maturation de la cellule intermédiaire vers ces deux types cellulaires sont les voies Wnt/ β -caténine et NOTCH (Crosnier *et al.*, 2006). Dans le modèle de cellules LS174T, capables d'exprimer des marqueurs de cellules caliciformes différenciées, l'inhibition pharmacologique de MEK induit une baisse de l'expression de *MUC2* en lien avec une augmentation de la signalisation NOTCH (Figure 15). Cette augmentation de la signalisation NOTCH est attribuable à l'augmentation d'expression des ligands DLL1 et DLL4 et ce, dépendamment de l'activité du complexe transcriptionnel β -caténine/TCF. Ainsi, nos résultats suggèrent que SHP-2 promeut la différenciation des cellules caliciformes en stimulant la signalisation MEK/ERK qui elle inhibe l'activité transcriptionnelle de la β -caténine, ce qui réduit l'expression des ligands de NOTCH.

En culture d'entéroïdes, la baisse d'expression d'*Ascl2* (gène cible du complexe β -caténine/TCF) et d'*Olfm4* (gène cible de Notch) suggère aussi la baisse d'activité des voies de signalisation Wnt/ β -caténine et Notch par Shp-2. Chez la souris, l'expression de la forme active de Shp-2 diminue aussi le niveau d'activation de la voie Wnt/ β -caténine, tel que démontré par la baisse d'expression de la β -caténine ainsi que de l'*Axine2* et de la *cycline D1*, deux de ses gènes cibles. De plus, une baisse du nombre de cellules de Paneth est observée chez la souris *Shp-2^{CEI-KO}*. Concernant la voie Notch, nous n'avons cependant pas

été capables de détecter l'inhibition de l'expression de NICD ou de Hes-1 chez la souris *Shp-2^{CEI-KO}* âgées de 2 semaines (résultats non montrés). Il se pourrait que cette régulation de la voie Notch soit transitoire et/ou spécifique à un type cellulaire et donc difficile à mettre en évidence dans des extraits totaux d'épithélium. Par exemple, il est possible que cette régulation soit spécifique aux cellules précurseuses déjà déterminées à devenir des cellules caliciformes, comme les LS174T. D'ailleurs, des résultats préliminaires de notre laboratoire montrent que l'inhibition pharmacologique de MEK n'induit aucune modulation de la voie NOTCH dans les lignées colorectales Caco-2/15 et HCT116 (résultats non présentés). Ainsi, l'axe SHP-2/ERK doit certainement réguler le devenir cellulaire et la signalisation NOTCH de façon précoce dans le processus de différenciation épithéliale.

Bien que cette régulation ne soit pas encore bien comprise, les travaux présentés dans ce document démontrent clairement que Shp-2 stimule la différenciation des cellules caliciformes en stimulant la signalisation Mek/Erk. Afin de bien démontrer ce lien, d'anciennes étudiantes du laboratoire, Geneviève Coulombe et Ariane Langlois, ont croisé les souris *Shp-2^{CEI-KO}* avec des souris *BRaf^{V600E}* (Annexe 1). L'expression d'une forme active de BRaf dans l'épithélium ayant une baisse d'expression de *Shp-2* permet de restaurer la phosphorylation des kinases Mek1/2 tel que mesuré dans des extraits de muqueuse. De façon remarquable, les souris *Shp-2^{CEI-KO};BRaf^{V600E}* ne présentent aucun signe histologique d'inflammation à 1 mois en comparaison aux souris *Shp-2^{CEI-KO}* qui développent toutes une colite. De plus, tout comme les souris *BRaf^{V600E}*, les souris *Shp-2^{CEI-KO};BRaf^{V600E}* ont une augmentation du nombre et de la taille des cellules caliciformes dans le côlon en comparaison aux souris contrôles. Finalement, la métaplasie des cellules de Paneth est inhibée lorsque la voie Mek/Erk est réactivée dans les souris *Shp-2^{CEI-KO}*, démontrant une fois de plus l'importance de cette signalisation sur la différenciation du précurseur commun caliciforme/Paneth.

8.4 REGULATION DE LA β -CATENINE PAR SHP-2

La voie de signalisation Wnt/ β -caténine est essentielle pour l'épithélium intestinal puisqu'elle participe au maintien des cellules souches et à la différenciation cellulaire. Chez

les souris *Shp-2^{IEC-KO}*, une augmentation des niveaux protéiques de la β -caténine et de l'expression de ses gènes-cibles a été observée, ce qui pourrait expliquer la hausse du nombre de cellules de Paneth dans l'iléon et l'apparition de cellules de Paneth métaplasiques dans le côlon (Coulombe *et al.*, 2016). Au contraire, les souris *Shp-2^{CEI-E76K}* ont moins de cellules de Paneth et ont une réduction des niveaux de la β -caténine active. De plus, ces souris ont une diminution des marqueurs des cellules de Paneth, comme les peptides antimicrobiens. Pris ensemble, ces résultats suggèrent que Shp-2 régularise l'activation de la signalisation Wnt/ β -caténine en contrôlant le niveau d'expression de la β -caténine.

Ces résultats nous rappellent des résultats précédents réalisés par une autre étudiante du laboratoire, Mélanie Simoneau, et qui montraient que la phosphatase SHP-1 inhibe les fonctions de la β -caténine en induisant sa dégradation et en interférant avec son association avec la protéine TBP (TATA-binding protein) (Simoneau *et al.*, 2011). En effet, ces travaux ont démontré que l'expression ectopique de SHP-1 inhibe la phosphorylation de la β -caténine induite par Src sur les tyrosines 86 et 654, ce qui diminue son activité transcriptionnelle. Par ailleurs, la liaison de la β -caténine avec TBP est aussi inhibée par SHP-1 et par la mutation des tyrosines 86 et 654 en phénylalanine (mutant non phosphorylable). Finalement, l'expression ectopique de SHP-1 induit une dégradation de la β -caténine et ce, indépendamment de la déphosphorylation sur les tyrosines 86 et 654 (Simoneau *et al.*, 2011).

Puisque SHP-1 et SHP-2 sont très semblables au niveau de leur structure, nous avons spéculé que SHP-2 pouvait contrôler le niveau d'expression de la β -caténine par un mécanisme semblable à SHP-1. D'abord, mes expériences de stabilité ont démontré que la demi-vie de la β -caténine est augmentée lorsque l'expression de SHP-2 est diminuée avec un siARN dans les cellules HEK293T (Figure 23). Cette stabilisation de la β -caténine est indépendante de sa phosphorylation sur les tyrosines 86 et 654 car le mutant β -caténine^{Y86F/Y654F} est également stabilisé par l'inhibition de SHP-2. De plus, les souris *Shp-2^{IEC-KO}* présentent non seulement une augmentation des niveaux protéiques de la β -caténine dans leur muqueuse mais

également un niveau plus élevé des formes phosphorylées sur les tyrosines 86 et 654 en comparaison aux souris contrôles (résultat non présenté). Il semble donc que SHP-2 régule aussi la phosphorylation sur tyrosine, la stabilité et le potentiel transcriptionnel de la β -caténine dans les CEI. Tout comme son paralogue SHP-1, SHP-2 pourrait influencer la dégradation de la β -caténine. Les mécanismes moléculaires impliqués restent cependant à caractériser.

Nos résultats s'opposent ainsi aux données de la littérature démontrant plutôt que Shp-2 participe à l'activation de la β -caténine en modulant la parafibromine dans les cellules cancéreuses gastriques (Takahashi *et al.*, 2011). La parafibromine recrute des histones méthyltransférases, inhibant l'expression de *la cycline D1* et de *c-Myc* (Takahashi *et al.*, 2011). Cependant, lorsqu'elle est déphosphorylée par SHP-2, elle devient un coactivateur transcriptionnel de la β -caténine et induit la transcription de ses gènes cibles (Takahashi *et al.*, 2011). Ces données de la littérature ne concordent donc pas avec ce qui a été observé chez nos souris *Shp-2^{CEI-E76K}*. Une explication que nous pouvons avancer est que les fonctions de SHP-2 pourraient différer selon sa localisation. Chez la souris, nous avons observé que Shp-2 est principalement retrouvée dans le cytoplasme des CEI (Coulombe *et al.*, 2013). Au contraire, dans les cellules cancéreuses colorectales, nous avons plutôt observé que SHP-2 était principalement localisée dans le noyau (G. Coulombe, résultats non publiés). Ainsi, il est possible que SHP-2 participe à l'activation de la voie Wnt en modulant positivement l'activité transcriptionnelle de la β -caténine nucléaire (Takahashi *et al.*, 2011) alors que dans le cytoplasme, SHP-2 régulerait plutôt négativement la stabilité de cette protéine afin de limiter sa translocation nucléaire. Des expériences dans les CEI normales et cancéreuses sont en cours dans le laboratoire pour vérifier cette hypothèse.

8.5 SHP-2 CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS DE MII ET DU CANCER COLORECTAL : UNE APPROCHE THERAPEUTIQUE POTENTIELLE ?

Les maladies inflammatoires intestinales et le cancer colorectal sont des pathologies avec une haute incidence au Canada. Malheureusement, les traitements offerts aux patients sont limités dû à un manque de connaissance sur les causes spécifiques de ces maladies et la

résistance aux drogues couramment utilisées. Les résultats qui ont été présentés dans ce document suggèrent que la phosphatase SHP-2 pourrait être une nouvelle cible thérapeutique de choix dans le traitement à la fois du CRC et de la CU, bien que des études plus poussées devront être réalisées avant de pouvoir envisager des études translationnelles.

8.5.1 L'inhibition de SHP-2 dans le traitement du cancer colorectal

En ce qui concerne le cancer du côlon, des inhibiteurs pharmacologiques de SHP-2 pourraient être utilisés pour le traitement des patients qui présentent ou non une mutation de cette protéine. Selon les résultats de cette thèse, la baisse d'expression de SHP-2 grâce à une approche d'interférence à l'ARN induit une diminution du potentiel tumoral des cellules cancéreuses colorectales en culture et ce, malgré la présence des formes mutantes de KRAS ou BRAF. Ainsi, dans le cancer du côlon, l'utilisation d'inhibiteurs de SHP-2 pourrait s'avérer être une stratégie intéressante pour pallier la résistance des cancers mutés pour KRAS ou BRAF, aux traitements de chimiothérapie conventionnelle et aux anti-EGFR.

Les inhibiteurs enzymatiques qui sont régulièrement utilisés en recherche sont plutôt non spécifiques de SHP-2, dû à une haute homologie de séquence dans le domaine catalytique des protéines tyrosines phosphatases. Récemment, une équipe a développé une nouvelle classe d'inhibiteur ciblant SHP-2, le SHP099, une molécule capable de stabiliser la conformation inactive de la protéine en se liant dans le tunnel formé à l'interface des domaines N-SH2, C-SH2 et PTP (Chen *et al.*, 2016). Puisque cette interface est spécifique à SHP-2, cet inhibiteur allostérique n'est pas en mesure de se lier avec SHP-1 et est hautement spécifique. Dans cette étude, les auteurs ont testé le SHP099 sur une multitude de lignées cancéreuses d'origine épithéliale afin d'évaluer son potentiel thérapeutique. Autant pour les cellules du cancer du sein et du cancer colorectal, l'inhibition allostérique de SHP-2 bloque la croissance des cellules qui ont une amplification des récepteurs RTK alors que les cellules qui ont des mutations dans les gènes *KRAS* ou *BRAF* sont résistantes (Chen *et al.*, 2016). Cette différence entre les résultats observés par Chen et collaborateurs suite au traitement des cellules du cancer colorectal avec le SHP099 et les résultats obtenus à l'aide de shARN dirigés contre SHP-2 pourrait suggérer que les propriétés de protéine adaptatrice de cette

phosphatase sont nécessaires à sa signalisation en aval des oncogènes KRAS et BRAF. Puisque les mutations dans ces deux gènes sont répertoriées chez plus de 50% des patients atteints de CRC (Brink *et al.*, 2003; Dinu *et al.*, 2014), il serait plus intéressant de trouver une stratégie où l'inhibition de SHP-2 permettrait à la fois d'enrayer son activité catalytique et ses propriétés de protéine adaptatrice. En parallèle, il serait pertinent de cibler les partenaires d'interaction de SHP-2 les plus en aval de la voie MAPK afin de limiter les éventuels rétrocontrôles et les résistances mises en place par les cellules cancéreuses. Pour ce faire, des études plus approfondies devront être réalisées afin de trouver les partenaires d'interaction de SHP-2, particulièrement ceux impliqués dans la régulation de la signalisation de RAS et de RAF.

Bien que l'inhibition de SHP-2 soit une option intéressante pour le traitement de nombreux types de cancer dont les leucémies (Chen *et al.*, 2016), l'inactivation prolongée de SHP-2 pourrait s'avérer problématique en vue d'une approche thérapeutique. Actuellement, des études pré-cliniques sont en cours afin de tester des inhibiteurs pharmacologiques contre la forme sauvage et les formes mutées constitutives actives de SHP-2, notamment pour le traitement des désordres myéloprolifératifs et des leucémies juvéniles associées au syndrome de Noonan. Ces études visent à déterminer la sécurité et l'efficacité des inhibiteurs pharmacologiques dans des cellules humaines et des modèles murins afin de permettre le début de potentielles études cliniques. Bien que l'efficacité de cette approche soit certainement confirmée par les études pré-cliniques, son innocuité sera probablement mise en doute. Selon mes résultats et ceux du groupe de GS Feng (Bard-Chapeau *et al.*, 2011), l'inhibition prolongée de SHP-2, du moins chez la souris, entraîne des désordres inflammatoires comme la colite ulcéreuse et l'hépatite. Il sera donc important que les études pré-cliniques en cours prennent en considération ces résultats et valident l'impact de l'utilisation des inhibiteurs pharmacologiques de SHP-2 sur les fonctions intestinales et hépatiques dans les modèles *in vivo*. Néanmoins, il est possible que les bénéfices de cette approche soient supérieurs aux effets indésirables. Il serait intéressant d'évaluer le temps nécessaire à l'apparition de l'inflammation intestinale chez la souris suite à l'injection répétée des inhibiteurs pharmacologiques de SHP-2. Par ailleurs, il est possible que la simple inactivation de SHP-2 ne soit pas suffisante à induire tous les phénotypes qui ont été observés

chez les souris *Shp-2^{IEC-KO}*, chez lesquelles les propriétés de protéine adaptatrice sont également abolies. De plus, puisque le traitement du cancer est d'une durée limitée, il est logique de penser que l'inflammation dans le côlon disparaîtra suite à la régénération de l'épithélium intestinal suivant le retrait des inhibiteurs de SHP-2. Ainsi, avant d'envisager des études cliniques basées sur l'inhibition de SHP-2 dans le cancer, de nombreuses études restent à effectuer afin de mesurer l'innocuité d'une telle approche particulièrement pour le foie et l'intestin.

8.5.2 Cibler l'activité phosphatase de SHP-2 pour limiter l'inflammation intestinale

En ce qui concerne le ciblage de l'activation de SHP-2 pour le traitement d'une colite ulcéreuse, l'approche thérapeutique pourrait s'avérer beaucoup plus difficile que dans le cas du cancer colorectal. Bien qu'il existe des peptides contenant des phospho-tyrosines commercialement disponibles et qui sont capables de maintenir SHP-2 dans sa conformation active (Chen *et al.*, 2016; Nichols *et al.*, 2017), un peu comme le fait la mutation E76K pour SHP-2, des défis techniques de taille devront être surmontés afin de les cibler spécifiquement aux cellules épithéliales intestinales avec une stabilité suffisante et une perméabilité membranaire adéquate. Ces restrictions sont nécessaires car les cellules souches hématopoïétiques sont très sensibles à l'activation soutenue de SHP-2 (Xu *et al.*, 2011). De plus, il faudra éviter l'activation prolongée de SHP-2 même dans le côlon, puisque cela pourrait engendrer la formation de lésions festonnées, des lésions qui peuvent progresser en cancer avec le temps. Afin de pallier cette limitation et puisque les MII sont des maladies chroniques caractérisées par une succession de phases actives et de latence, l'utilisation de peptides qui activent SHP-2 pourrait être limitée aux phases actives de la maladie, ce qui permettrait de favoriser une meilleure réparation de la muqueuse et de raccourcir la durée de la période d'inflammation.

Par ailleurs, comme il a été mentionné précédemment, nous n'avons pas encore déterminé les mécanismes moléculaires exacts régulés par SHP-2 dans la protection de l'inflammation intestinale. Selon les résultats de cette thèse, SHP-2 régule les fonctions de barrière intestinale et la régénération cryptale, en partie de manière MEK/ERK dépendante. Il est

connu que SHP-2 participe à l'activation de la voie RAS/MAPK en permettant une activation soutenue des isoformes de RAS (Bennett *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1994; Lu *et al.*, 2001), mais nous avons également mis en évidence que cette phosphatase pourrait avoir des effets en aval de RAS. De plus, il est très probable que SHP-2 exerce ses fonctions de protection via d'autres voies de signalisation. Des études devront être réalisées afin d'identifier les partenaires d'interaction et les substrats de SHP-2, notamment dans la différenciation des cellules caliciformes. Une activation des effecteurs de la signalisation SHP-2/ERK beaucoup plus en aval pourrait éventuellement s'avérer une approche thérapeutique alternative intéressante dans le traitement de la colite. Cette approche permettrait de limiter la cascade d'amplification du signal et d'induire une protection contre l'inflammation sans toutefois favoriser la tumorigenèse. En ce sens, il existe des phosphatases spécifiques des kinases effectrices ERK1/2, phosphatases appartenant à la famille des DUSP, pour Dual-specificity phosphatases (Caunt et Keyse, 2013). Des travaux actuellement en cours dans notre laboratoire ont permis de démontrer que la délétion génétique de la phosphatase DUSP6, qui est spécifique à ERK1/2, pourrait être une cible de choix. Selon nos travaux, les souris qui n'expriment plus *Dusp6* démontrent des similitudes importantes avec les souris *Shp-2^{CEI-E76K}*, bien que ces altérations phénotypiques ne soient pas aussi drastiques. En effet, les souris *Dusp6^{-/-}* présentent une modeste augmentation de la phosphorylation des ERK et une augmentation du nombre de cellules prolifératives et de cellules caliciformes dans le côlon en comparaison aux souris contrôles. De plus, l'épithélium déficient pour l'expression de *Dusp6* se régénère plus rapidement, ce qui a été démontré par la culture de cryptes *ex vivo*. Par conséquent, ces souris sont résistantes à l'induction d'une colite par le dextran sulfate de sodium (Beaudry, 2017). Finalement, avec l'âge, outre la légère hyperplasie colique, ces souris ne développent pas de tumeurs. Ainsi, l'inhibition pharmacologique de DUSP6 pourrait être une approche thérapeutique intéressante pour les patients souffrant de colite ulcéreuse.

V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La protéine SHP-2 est un régulateur clé de nombreux processus cellulaires, dont la prolifération, la différenciation et la migration. Puisqu'elle régule des fonctions primordiales au maintien de l'homéostasie, une dérégulation de SHP-2 a été associée au développement de certaines pathologies, dont le syndrome de Noonan et les leucémies juvéniles. Au niveau de l'intestin, nous avons précédemment démontré que la délétion de Shp-2 dans les cellules de l'épithélium mène à l'apparition spontanée d'inflammation dans le côlon des souris. De plus, les patients atteints d'une maladie inflammatoire intestinale présentent des niveaux d'expression réduits de cette phosphatase. Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que SHP-2 protège contre le développement des MII. D'un autre côté, une mutation gain-de-fonction de SHP-2 a été répertoriée chez certains patients souffrant de cancer colorectal. Cette même mutation est directement associée au développement des leucémies myéloïdes juvéniles autant chez l'humain que chez la souris. Nous avons donc émis la seconde hypothèse que SHP-2 est un proto-oncogène dans l'intestin. Les travaux présentés dans ce document ont permis de démontrer que SHP-2 protège contre le développement de la colite ulcéreuse mais qu'elle promeut la tumorigenèse intestinale.

Les résultats de cette thèse démontrent que la phosphatase Shp-2 stimule la différenciation des cellules caliciformes au dépend des cellules de Paneth, ce qui entraîne une production accrue de mucus et une protection supplémentaire contre la colite. Nous avons démontré dans nos études *ex vivo* que Shp-2 régule la production de la *Mucine2* en activant notamment la voie de signalisation MEK/ERK. Pour les travaux futurs, il serait intéressant d'identifier les substrats de Shp-2 au sein de la voie MAPK et qui sont impliqués dans la régulation de la différenciation des cellules caliciformes. Aussi, il semble nécessaire de déterminer si cette régulation se produit dans les cellules progénitrices sécrétrices et/ou plutôt au niveau des précurseurs communs. De plus, l'axe Shp-2/ERK jouerait-il également un rôle dans les cellules caliciformes pleinement différenciées? En effet, en plus de l'augmentation du nombre de cellules caliciformes et de la diminution des cellules de Paneth, l'activation soutenue de Shp-2 mène à une production accrue de mucines et de protéines associées au

mucus dans l'épithélium intestinal. Il serait intéressant d'étudier cette régulation pour comprendre si cette induction est proportionnelle à la quantité de cellules présentes dans notre modèle ou si Shp-2 et ses substrats participent à la transcription génique dans les cellules caliciformes pleinement différenciées.

Nos travaux ont également démontré une interconnexion des voies MAPK, Wnt/ β -caténine et NOTCH dans la différenciation des cellules caliciformes *in cellulo*. Ces résultats démontrent aussi que SHP-2 régule la stabilité de la β -caténine *in cellulo* et l'activation de la voie RAS/MAPK. Par ailleurs dans des cellules déterminées à se différencier en cellules caliciformes, l'inhibition de MEK résulte en une activation de la voie Wnt canonique et un rétrocontrôle positif sur la voie NOTCH. Il se pourrait donc que SHP-2 influence le devenir cellulaire à plusieurs niveaux. Afin de mieux réconcilier ces éléments, il est important de bien caractériser les mécanismes moléculaires régulés par SHP-2 dans le contrôle de la β -caténine et de la voie MAPK, de façon indépendante et concomitante. Est-ce que la régulation de la β -caténine par SHP-2 serait dépendante de MEK/ERK dans les cellules épithéliales intestinales ou plutôt indépendante? Est-ce que cette régulation se situe au niveau de la GSK3 β et du recrutement potentiel d'une E3-ubiquitine ligase ou bien plutôt au niveau des jonctions cellulaires que nous avons vu modulées en absence de Shp-2 chez la souris?

Il est connu que les cellules de Paneth régulent la composition du microbiote intestinal et qu'elles sont impliquées dans l'élimination des pathogènes. Bien qu'une diminution de la production des peptides antimicrobiens et du nombre de cellules de Paneth ait été observée suite à l'activation soutenue de Shp-2 dans l'épithélium intestinal murin, les souris *Shp-2^{CEI-E76K}* résistent tout même beaucoup plus que les souris sauvages à une infection avec *Citrobacter rodentium*. Il serait intéressant d'analyser la composition du microbiote intestinal chez les souris *Shp-2^{CEI-E76K}* afin de voir si la dérégulation des cellules de Paneth influence sa diversité. Certaines bactéries commensales peuvent faire compétition directe avec les pathogènes et dans notre cas, il se pourrait que cela contribue à la résistance à une colite infectieuse. Ces analyses pourraient permettre aussi de clarifier pourquoi seulement

50% des souris *Shp-2*^{CEI-E76K} sont résistantes à une colonisation avec *Citrobacter rodentium* alors que toutes présentent une augmentation du nombre de cellules caliciformes.

Le modèle de souris invalidé pour Shp-2 démontre bien l'importance de la microflore dans le développement de la colite. Ces souris ont une dysbiose et une augmentation de la perméabilité paracellulaire, entraînant un appel important de cellules immunitaires dans la muqueuse, un stress oxydatif et des dommages à l'ADN. Selon les résultats précédents de notre laboratoire (Coulombe *et al.*, 2016), la signalisation déclenchée en réponse à la microflore via les récepteurs Toll-like pourrait être une cible potentielle pour le traitement de la colite puisqu'un traitement avec un cocktail d'antibiotiques à large spectre ou la délétion de MyD88 dans les souris *Shp-2*^{CEI-KO} permet d'inhiber l'inflammation (Coulombe *et al.*, 2016). Ces résultats suggèrent ainsi une participation potentielle de SHP-2 dans la signalisation de certains récepteurs TLR. Par ailleurs, il a été démontré que la signalisation des TLR dépendante de Myd88 est impliquée dans la réponse inflammatoire engendrée par une infection avec *Citrobacter rodentium* et qu'elle permet de limiter l'étendue de la colite (Lebeis *et al.*, 2007). Ainsi, les souris *Myd88*^{-/-} développent une colite infectieuse sévère qui engendre la mort des individus (Lebeis *et al.*, 2007). Ces résultats nous suggèrent que la protection contre la colite infectieuse dans les souris *Shp-2*^{CEI-E76K} pourrait impliquer la signalisation des TLR. Des études sont présentement en cours afin de décortiquer les mécanismes moléculaires régulés par SHP-2 dans la signalisation des TLR et de mieux comprendre les résultats que nous avons obtenu.

D'un autre côté, nous avons démontré qu'une activation soutenue de Shp-2 altère l'expression des gènes associés aux cellules souches intestinales mais favorise la prolifération épithéliale chez la souris. Bien que ces résultats indiquent que la régénération cryptale est accentuée dans les organoïdes dérivés des souris *Shp-2*^{CEI-E76K}, nous n'avons jamais maintenu ces cultures sur une longue période. Puisque ce sont les cellules souches qui sont à l'origine de tous les types cellulaires de l'épithélium intestinal, il est probable que la baisse d'expression d'*Ascl2* et d'*Olfm4* que nous avons mesurée nuit à la remise en culture des organoïdes expérimentaux suite à des passages répétés. Il serait très intéressant de faire

ces expériences et de mieux caractériser les cellules souches qui expriment une forme active de Shp-2. Au-delà de l'expression d'*Ascl2* et d'*Olfm4*, le marqueur *Lgr5* n'est pas modulé, ce qui suggère que le nombre de cellules n'est peut-être pas tant affecté. Les cellules quiescentes en position +4 pourraient peut-être également prendre part à la régénération cryptale lorsqu'elles sont sorties de leur environnement et mises en culture, ce qui pourrait expliquer le nombre de protrusions accru dans notre modèle malgré l'altération des CBC.

En 2013, notre équipe a répertorié une baisse dans les niveaux d'expression de SHP-2 chez des patients atteints de maladies inflammatoires intestinales (Coulombe *et al.*, 2013). Dans les dernières années, nous avons également amorcé la création d'une biobanque de patients juvéniles qui souffrent d'une MII. Rappelons en effet que la délétion de *Shp-2* dans l'épithélium des souris entraîne le développement rapide d'une colite dès 3 semaines après la naissance. Nous voulons donc analyser, chez de jeunes patients, si la présence des deux polymorphismes de *PTPN11* est associée à une baisse d'expression de SHP-2 dans la muqueuse intestinale et à une sévérité plus importante de la maladie. Par la suite, nous prévoyons caractériser l'épithélium colique chez les patients que nous allons identifier comme porteurs de SNPs et par exemple, y dénombrer les cellules caliciformes et vérifier la présence d'une métaplasie des cellules de Paneth. Il serait intéressant de comparer ces résultats avec le phénotype observé chez les souris *Shp-2^{CEI-KO}*.

En ce qui concerne les patients atteints de cancer colorectal, les travaux actuels démontrent que l'expression de SHP-2 est régulée à la hausse dans les stades précoces de la maladie. *In cellulo*, cette expression est nécessaire à la tumorigenicité des cellules épithéliales intestinales. La phosphatase SHP-2 est une protéine ubiquitaire et donc exprimée dans toutes les cellules. Normalement, sa régulation se déroule plutôt à un niveau post-traductionnel, soit via sa conformation, sa localisation subcellulaire ou sa phosphorylation. La régulation transcriptionnelle du gène *SHP-2* a été très peu étudiée. Puisque tous les adénomes analysés au cours de mes travaux ont une mutation d'*APC*, on pourrait spéculer que le complexe β -caténine/TCF4 participe à l'augmentation de l'expression de SHP-2. Il serait intéressant de démystifier ce qui force l'expression de SHP-2 dans les adénomes. Est-ce que les patients

atteints de polypose familiale induit par des mutations d'*APC* ont également une modulation de SHP-2?

Selon mes travaux de recherche, les cellules cancéreuses colorectales humaines sont dépendantes de la phosphatase SHP-2 pour le maintien de leurs propriétés tumorales. De manière intéressante, des travaux actuellement en cours dans le laboratoire par Vanessa Vaillancourt-Lavigueur montrent que la baisse d'expression de SHP-2 dans les cellules cancéreuses colorectales induit des dommages à l'ADN et des signes de sénescence cellulaire. Par conséquent, il serait très intéressant de vérifier si l'hyperactivation de SHP-2 confère aussi aux cellules cancéreuses une résistance aux agents chimiothérapeutiques comme le 5-FU ou l'oxaliplatine.

En conclusion, bien que plusieurs questions persistent quant aux mécanismes moléculaires régulés par SHP-2 dans la protection contre l'inflammation et dans le développement du cancer, nos résultats démontrent clairement que cette phosphatase protège l'épithélium colique contre la colite ulcéreuse mais qu'elle participe activement à la progression tumorale.

VI. REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier mon mentor Nathalie Rivard qui a su alimenter ma passion pour la science, piquer ma curiosité et me pousser à dépasser mes limites quand les épreuves étaient plus difficiles à surmonter. Merci à de m'avoir accueillie dans ton laboratoire, de m'avoir fourni les ressources nécessaires et donné les opportunités pour accomplir ce travail.

Merci aux professeurs qui ont fait partie de mon comité d'encadrement, P^{re} Jana Stankova et Pr François Boudreau, mais également aux membres de mon jury de thèse, Pr Michel Tremblay et Pr Claude Asselin. Merci pour ces échanges dynamiques que nous avons eu tout au long de mon parcours et qui ont eu un impact important pour la réussite de ce projet.

Merci à Geneviève Coulombe et Ariane Langlois qui ont travaillé sur le projet SHP-2 au cours de leurs études doctorales et de maîtrise, sans qui le projet n'aurait pas eu autant d'envergure. Bonne chance à Valérie Lannoy pour la continuité!

Merci à Mia Lecours, Claire Hamel et Nadia Bourdages qui m'ont assistée pendant mes études doctorales et dont certains résultats figurent dans cet ouvrage. Merci à mes collègues de travail qui ont participé de près ou de loin à mon projet : Vanessa Vaillancourt-Lavigueur, Marie-Josée Langlois, Sébastien Cagnol, Jennifer Raisch, Katia Beaudry et Caroline Leblanc.

Je voudrais remercier nos collaborateurs qui ont rendu ces travaux possibles : Pr Gen-Sheng Feng (souris *Shp-2^{fx/fx}*), Pr Cheng-Kui Qu (souris *Ptpn11^{E76K^{Neo/+}}*), Pr Alfredo Menendez et Sarah Tremblay (*Citrobacter rodentium*), D^{re} Marilène Paquet et Dr Sameh Geha (analyses pathologiques) ainsi que les membres de la plateforme de phénotypage (Marilène Paquette et Anne Vézina) et de la plateforme de RNomique (Mathieu Durand et Elvy Lapointe).

Merci à ma famille, mon copain Étienne Lemieux, mes beaux-parents et mes amis proches pour tout le support et les encouragements tout au long de ces 12 années universitaires. Sans vous, rien n'aurait été possible!

« Toutes les histoires ont une fin, mais chaque fin est le début de quelque chose de nouveau. »

VII. RÉFÉRENCES

- Abreu, M.T. (2010). Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 215.
- Aceto, N., Sausgruber, N., Brinkhaus, H., Gaidatzis, D., Martiny-Baron, G., Mazzarol, G., Confalonieri, S., Quarto, M., Hu, G., Balwierz, P.J., *et al.* (2012). Tyrosine phosphatase SHP2 promotes breast cancer progression and maintains tumor-initiating cells via activation of key transcription factors and a positive feedback signaling loop. *Nat. Med.* *18*, 529–537.
- Adolph, T.E., Tomczak, M.F., Niederreiter, L., Ko, H.-J., Böck, J., Martinez-Naves, E., Glickman, J.N., Tschurtschenthaler, M., Hartwig, J., Hosomi, S., *et al.* (2013). Paneth cells as a site of origin for intestinal inflammation. *Nature* *503*, 272–276.
- Akira, S., and Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 499–511.
- Albert, T.K., Laubinger, W., Müller, S., Hanisch, F.-G., Kalinski, T., Meyer, F., and Hoffmann, W. (2010). Human intestinal TFF3 forms disulfide-linked heteromers with the mucus-associated FCGBP protein and is released by hydrogen sulfide. *J. Proteome Res.* *9*, 3108–3117.
- Allanson, J.E., and Roberts, A.E. (1993). Noonan Syndrome. In *GeneReviews®*, M.P. Adam, H.H. Ardinger, R.A. Pagon, S.E. Wallace, L.J. Bean, H.C. Mefford, K. Stephens, A. Amemiya, and N. Ledbetter, eds. (Seattle (WA): University of Washington, Seattle).
- Araki, T., Nawa, H., and Neel, B.G. (2003). Tyrosyl phosphorylation of Shp2 is required for normal ERK activation in response to some, but not all, growth factors. *J. Biol. Chem.* *278*, 41677–41684.
- Aronson, B.E., Stapleton, K.A., and Krasinski, S.D. (2014). Role of GATA factors in development, differentiation, and homeostasis of the small intestinal epithelium. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* *306*, G474–G490.
- Arthur, J.C., Perez-Chanona, E., Mühlbauer, M., Tomkovich, S., Uronis, J.M., Fan, T.-J., Campbell, B.J., Abujamel, T., Dogan, B., Rogers, A.B., *et al.* (2012). Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science* *338*, 120–123.
- Arthur, J.C., Gharaibeh, R.Z., Mühlbauer, M., Perez-Chanona, E., Uronis, J.M., McCafferty, J., Fodor, A.A., and Jobin, C. (2014). Microbial genomic analysis reveals the essential role of inflammation in bacteria-induced colorectal cancer. *Nat. Commun.* *5*, 4724.
- Artis, D., Wang, M.L., Keilbaugh, S.A., He, W., Brenes, M., Swain, G.P., Knight, P.A., Donaldson, D.D., Lazar, M.A., Miller, H.R.P., *et al.* (2004). RELM β /FIZZ2 is a goblet cell-specific immune-effector molecule in the gastrointestinal tract. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 13596–13600.

- Atreya, R., and Neurath, M.F. (2005). Involvement of IL-6 in the pathogenesis of inflammatory bowel disease and colon cancer. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* *28*, 187–196.
- Atreya, R., Mudter, J., Finotto, S., Müllberg, J., Jostock, T., Wirtz, S., Schütz, M., Bartsch, B., Holtmann, M., Becker, C., *et al.* (2000). Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat. Med.* *6*, 583–588.
- Avruch, J., Khokhlatchev, A., Kyriakis, J.M., Luo, Z., Tzivion, G., Vavvas, D., and Zhang, X.F. (2001). Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. *Recent Prog. Horm. Res.* *56*, 127–155.
- Ayabe, T., Satchell, D.P., Wilson, C.L., Parks, W.C., Selsted, M.E., and Ouellette, A.J. (2000). Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nat. Immunol.* *1*, 113–118.
- Bao, Y., Guo, Y., Li, Z., Fang, W., Yang, Y., Li, X., Li, Z., Xiong, B., Chen, Z., Wang, J., *et al.* (2014). MicroRNA profiling in Muc2 knockout mice of colitis-associated cancer model reveals epigenetic alterations during chronic colitis malignant transformation. *PLoS One* *9*, e99132.
- Bard-Chapeau, E.A., Li, S., Ding, J., Zhang, S.S., Zhu, H.H., Princen, F., Fang, D.D., Han, T., Bailly-Maitre, B., Poli, V., *et al.* (2011). PTPN11/Shp2 Acts as a Tumor Suppressor in Hepatocellular Carcinogenesis. *Cancer Cell* *19*, 629–639.
- Barford, D., and Neel, B.G. (1998). Revealing mechanisms for SH2 domain mediated regulation of the protein tyrosine phosphatase SHP-2. *Structure* *6*, 249–254.
- Barker, N., van Es, J.H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegebarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P.J., *et al.* (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* *449*, 1003–1007.
- Barras, D. (2015). BRAF Mutation in Colorectal Cancer: An Update. *Biomark. Cancer* *7*, 9–12.
- Bates, R.C., and Mercurio, A.M. (2005). The epithelial-mesenchymal transition (EMT) and colorectal cancer progression. *Cancer Biol. Ther.* *4*, 365–370.
- Beaudry, K. (2017). Le rôle de la phosphatase DUSP6 dans le contrôle de la tumorigénèse et de l'inflammation intestinale. Mémoire. Université de Sherbrooke.
- Becker, C., Fantini, M.C., Schramm, C., Lehr, H.A., Wirtz, S., Nikolaev, A., Burg, J., Strand, S., Kiesslich, R., Huber, S., *et al.* (2004). TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. *Immunity* *21*, 491–501.
- Bennett, A.M., Tang, T.L., Sugimoto, S., Walsh, C.T., and Neel, B.G. (1994). Protein-tyrosine-phosphatase SHPTP2 couples platelet-derived growth factor receptor beta to Ras. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 7335–7339.

- Bentires-Alj, M., Paez, J.G., David, F.S., Keilhack, H., Halmos, B., Naoki, K., Maris, J.M., Richardson, A., Bardelli, A., Sugarbaker, D.J., *et al.* (2004). Activating Mutations of the Noonan Syndrome-Associated SHP2/PTPN11 Gene in Human Solid Tumors and Adult Acute Myelogenous Leukemia. *Cancer Res.* *64*, 8816–8820.
- Bergstrom, K.S.B., Kisson-Singh, V., Gibson, D.L., Ma, C., Montero, M., Sham, H.P., Ryz, N., Huang, T., Velcich, A., Finlay, B.B., *et al.* (2010). Muc2 protects against lethal infectious colitis by disassociating pathogenic and commensal bacteria from the colonic mucosa. *PLoS Pathog.* *6*, e1000902.
- Bettington, M., Walker, N., Clouston, A., Brown, I., Leggett, B., and Whitehall, V. (2013). The serrated pathway to colorectal carcinoma: current concepts and challenges. *Histopathology* *62*, 367–386.
- Bettington, M.L., Walker, N.I., Rosty, C., Brown, I.S., Clouston, A.D., McKeone, D.M., Pearson, S.-A., Klein, K., Leggett, B.A., and Whitehall, V.L.J. (2015). A clinicopathological and molecular analysis of 200 traditional serrated adenomas. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* *28*, 414–427.
- Binder, G. (2009). Noonan syndrome, the Ras-MAPK signalling pathway and short stature. *Horm. Res.* *71 Suppl 2*, 64–70.
- Birchenough, G.M.H., Johansson, M.E.V., Gustafsson, J.K., Bergström, J.H., and Hansson, G.C. (2015). New developments in goblet cell mucus secretion and function. *Mucosal Immunol.* *8*, 712–719.
- Blache, P., van de Wetering, M., Duluc, I., Domon, C., Berta, P., Freund, J.-N., Clevers, H., and Jay, P. (2004). SOX9 is an intestine crypt transcription factor, is regulated by the Wnt pathway, and represses the CDX2 and MUC2 genes. *J. Cell Biol.* *166*, 37–47.
- Böhmer, F.-D., and Friedrich, K. (2014). Protein tyrosine phosphatases as wardens of STAT signaling. *JAK-STAT* *3*, e28087.
- Bollrath, J., and Greten, F.R. (2009). IKK/NF-kappaB and STAT3 pathways: central signalling hubs in inflammation-mediated tumour promotion and metastasis. *EMBO Rep.* *10*, 1314–1319.
- Bonnet, M., Buc, E., Sauvanet, P., Darcha, C., Dubois, D., Pereira, B., Déchelotte, P., Bonnet, R., Pezet, D., and Darfeuille-Michaud, A. (2014). Colonization of the human gut by *E. coli* and colorectal cancer risk. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *20*, 859–867.
- Borowsky, J., Dumenil, T., Bettington, M., Pearson, S.-A., Bond, C., Fennell, L., Liu, C., McKeone, D., Rosty, C., Brown, I., *et al.* (2017). The role of APC in WNT pathway activation in serrated neoplasia. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc.*

- Boucher, M.-J., Jean, D., Vézina, A., and Rivard, N. (2004). Dual role of MEK/ERK signaling in senescence and transformation of intestinal epithelial cells. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* *286*, G736–G746.
- Brabletz, T., Jung, A., Dag, S., Hlubek, F., and Kirchner, T. (1999). beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *Am. J. Pathol.* *155*, 1033–1038.
- Brink, M., de Goeij, A.F.P.M., Weijnenberg, M.P., Roemen, G.M.J.M., Lentjes, M.H.F.M., Pachen, M.M.M., Smits, K.M., de Bruïne, A.P., Goldbohm, R.A., and van den Brandt, P.A. (2003). K-ras oncogene mutations in sporadic colorectal cancer in The Netherlands Cohort Study. *Carcinogenesis* *24*, 703–710.
- Bromann, P.A., Korkaya, H., and Courtneidge, S.A. (2004). The interplay between Src family kinases and receptor tyrosine kinases. *Oncogene* *23*, 7957–7968.
- Bu, X.-D., Li, N., Tian, X.-Q., and Huang, P.-L. (2011). Caco-2 and LS174T cell lines provide different models for studying mucin expression in colon cancer. *Tissue Cell* *43*, 201–206.
- Buonato, J.M., Lan, I.S., and Lazzara, M.J. (2015). EGF augments TGFβ-induced epithelial–mesenchymal transition by promoting SHP2 binding to GAB1. *J Cell Sci* *128*, 3898–3909.
- Bustos, R.I., Forget, M.-A., Settleman, J.E., and Hansen, S.H. (2008). Coordination of Rho and Rac GTPase function via p190B RhoGAP. *Curr. Biol. CB* *18*, 1606–1611.
- Caceci, D.T. (2008). Digestive system 2: Intestines (Virginia-Maryland College of Veterinary Medicine).
- Cadwell, K., Patel, K.K., Komatsu, M., Virgin, H.W., and Stappenbeck, T.S. (2009). A common role for Atg16L1, Atg5 and Atg7 in small intestinal Paneth cells and Crohn disease. *Autophagy* *5*, 250–252.
- Cagnol, S., and Rivard, N. (2013). Oncogenic KRAS and BRAF activation of the MEK/ERK signaling pathway promotes expression of dual-specificity phosphatase 4 (DUSP4/MKP2) resulting in nuclear ERK1/2 inhibition. *Oncogene* *32*, 564.
- Cai, P., Guo, W., Yuan, H., Li, Q., Wang, W., Sun, Y., Li, X., and Gu, Y. (2014). Expression and clinical significance of tyrosine phosphatase SHP-2 in colon cancer. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* *68*, 285–290.
- Calcagno, S.R., Li, S., Colon, M., Kreinest, P.A., Thompson, E.A., Fields, A.P., and Murray, N.R. (2008). Oncogenic K-ras promotes early carcinogenesis in the mouse proximal colon. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *122*, 2462–2470.
- Cani, P.D., and Delzenne, N.M. (2009). The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. *Curr. Pharm. Des.* *15*, 1546–1558.

- Cappuzzo, F., Finocchiaro, G., Rossi, E., Jänne, P.A., Carnaghi, C., Calandri, C., Bencardino, K., Ligorio, C., Ciardiello, F., Pressiani, T., *et al.* (2008). EGFR FISH assay predicts for response to cetuximab in chemotherapy refractory colorectal cancer patients. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* *19*, 717–723.
- Carragher, L.A.S., Snell, K.R., Giblett, S.M., Aldridge, V.S.S., Patel, B., Cook, S.J., Winton, D.J., Marais, R., and Pritchard, C.A. (2010). V600EBraf induces gastrointestinal crypt senescence and promotes tumour progression through enhanced CpG methylation of p16INK4a. *EMBO Mol. Med.* *2*, 458–471.
- Castellano, E., and Downward, J. (2011). RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway. *Genes Cancer* *2*, 261–274.
- Castellarin, M., Warren, R.L., Freeman, J.D., Dreolini, L., Krzywinski, M., Strauss, J., Barnes, R., Watson, P., Allen-Vercocoe, E., Moore, R.A., *et al.* (2012). *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Res.* *22*, 299–306.
- Castellone, M.D., Teramoto, H., Williams, B.O., Druey, K.M., and Gutkind, J.S. (2005). Prostaglandin E2 promotes colon cancer cell growth through a Gs-axin-beta-catenin signaling axis. *Science* *310*, 1504–1510.
- Cătană, C.-S., Berindan Neagoe, I., Cozma, V., Magdaş, C., Tăbăran, F., and Dumitraşcu, D.L. (2015). Contribution of the IL-17/IL-23 axis to the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol. WJG* *21*, 5823–5830.
- Caunt, C.J., and Keyse, S.M. (2013). Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs). *Febs J.* *280*, 489–504.
- Chan, R.J., and Feng, G.-S. (2007). PTPN11 is the first identified proto-oncogene that encodes a tyrosine phosphatase. *Blood* *109*, 862–867.
- Chan, R.J., Johnson, S.A., Li, Y., Yoder, M.C., and Feng, G.-S. (2003). A definitive role of Shp-2 tyrosine phosphatase in mediating embryonic stem cell differentiation and hematopoiesis. *Blood* *102*, 2074–2080.
- Chan, T.L., Zhao, W., Leung, S.Y., Yuen, S.T., and Cancer Genome Project (2003). BRAF and KRAS mutations in colorectal hyperplastic polyps and serrated adenomas. *Cancer Res.* *63*, 4878–4881.
- Chen, J., and Huang, X.-F. (2009). The signal pathways in azoxymethane-induced colon cancer and preventive implications. *Cancer Biol. Ther.* *8*, 1313–1317.
- Chen, J., Yu, W.-M., Bunting, K.D., and Qu, C.-K. (2004). A negative role of SHP-2 tyrosine phosphatase in growth factor-dependent hematopoietic cell survival. *Oncogene* *23*, 3659–3669.

- Chen, Y.-N.P., LaMarche, M.J., Chan, H.M., Fekkes, P., Garcia-Fortanet, J., Acker, M.G., Antonakos, B., Chen, C.H.-T., Chen, Z., Cooke, V.G., *et al.* (2016). Allosteric inhibition of SHP2 phosphatase inhibits cancers driven by receptor tyrosine kinases. *Nature* 535, 148–152.
- Cheng, H., and Leblond, C.P. (1974). Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. I. Columnar cell. *Am. J. Anat.* 141, 461–479.
- Chetty, R., Bateman, A.C., Torlakovic, E., Wang, L.M., Gill, P., Al-Badri, A., Arends, M., Biddlestone, L., Burroughs, S., Carey, F., *et al.* (2014). A pathologist's survey on the reporting of sessile serrated adenomas/polyps. *J. Clin. Pathol.* 67, 426–430.
- Cho, J.H., and Brant, S.R. (2011). Recent insights into the genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 140, 1704–1712.
- Clevers, H. (2006). Wnt/ β -Catenin Signaling in Development and Disease. *Cell* 127, 469–480.
- Collins, J.T., and Bhimji, S.S. (2017). Anatomy, Abdomen, Small Intestine. In *StatPearls*, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), p.
- Cooper, H.S., Murthy, S.N., Shah, R.S., and Sedergran, D.J. (1993). Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 69, 238–249.
- Cottrell, S., Bicknell, D., Kaklamanis, L., and Bodmer, W.F. (1992). Molecular analysis of APC mutations in familial adenomatous polyposis and sporadic colon carcinomas. *Lancet Lond. Engl.* 340, 626–630.
- Coulombe, G. (2015). Rôles de la protéine tyrosine phosphatase SHP-2 dans l'inflammation intestinale et le cancer colorectal associé à la colite. Université de Sherbrooke.
- Coulombe, G., Leblanc, C., Cagnol, S., Maloum, F., Lemieux, É., Perreault, N., Feng, G.-S., Boudreau, F., and Rivard, N. (2013). Epithelial Tyrosine Phosphatase SHP-2 Protects against Intestinal Inflammation in Mice. *Mol. Cell. Biol.* 33, 2275–2284.
- Coulombe, G., Langlois, A., De Palma, G., Langlois, M.-J., Mccarville, J.L., Gagné-Sanfaçon, J., Perreault, N., Feng, G.-S., Bercik, P., Boudreau, F., *et al.* (2016). SHP-2 Phosphatase Prevents Colonic Inflammation by Controlling Secretory Cell Differentiation and Maintaining Host-Microbiota Homeostasis. *J. Cell. Physiol.* 231, 2529–2540.
- Crawford, H.C., Fingleton, B.M., Rudolph-Owen, L.A., Goss, K.J., Rubinfeld, B., Polakis, P., and Matrisian, L.M. (1999). The metalloproteinase matrilysin is a target of beta-catenin transactivation in intestinal tumors. *Oncogene* 18, 2883–2891.

- Crawley, S.W., Mooseker, M.S., and Tyska, M.J. (2014). Shaping the intestinal brush border. *J. Cell Biol.* *207*, 441–451.
- Crosnier, C., Stamatakis, D., and Lewis, J. (2006). Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat. Rev. Genet.* *7*, 349–359.
- Dance, M., Montagner, A., Salles, J.-P., Yart, A., and Raynal, P. (2008). The molecular functions of Shp2 in the Ras/Mitogen-activated protein kinase (ERK1/2) pathway. *Cell. Signal.* *20*, 453–459.
- Darfeuille-Michaud, A., Neut, C., Barnich, N., Lederman, E., Di Martino, P., Desreumaux, P., Gombiez, L., Joly, B., Cortot, A., and Colombel, J.F. (1998). Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* *115*, 1405–1413.
- Darnell, J.E. (1997). STATs and gene regulation. *Science* *277*, 1630–1635.
- Deguine, J., and Barton, G.M. (2014). MyD88: a central player in innate immune signaling. *F1000prime Rep.* *6*, 97.
- Deretic, V. (2009). Links between Autophagy, Innate Immunity, Inflammation and Crohn's Disease. *Dig. Dis. Basel Switz.* *27*, 246–251.
- Dinu, D., Dobre, M., Panaitescu, E., Bîrlă, R., Iosif, C., Hoara, P., Caragui, A., Boeriu, M., Constantinoiu, S., and Ardeleanu, C. (2014). Prognostic significance of KRAS gene mutations in colorectal cancer - preliminary study. *J. Med. Life* *7*, 581–587.
- Dorofeyev, A.E., Vasilenko, I.V., Rassokhina, O.A., and Kondratiuk, R.B. (2013). Mucosal Barrier in Ulcerative Colitis and Crohn's Disease.
- Doxsey, S. (1998). The centrosome--a tiny organelle with big potential. *Nat. Genet.* *20*, 104–106.
- Emami, K.H., Nguyen, C., Ma, H., Kim, D.H., Jeong, K.W., Eguchi, M., Moon, R.T., Teo, J.-L., Oh, S.W., Kim, H.Y., *et al.* (2004). A small molecule inhibitor of β -catenin/cyclic AMP response element-binding protein transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *101*, 12682–12687.
- Erben, U., Loddenkemper, C., Doerfel, K., Spieckermann, S., Haller, D., Heimesaat, M.M., Zeitz, M., Siegmund, B., and Kühl, A.A. (2014). A guide to histomorphological evaluation of intestinal inflammation in mouse models. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* *7*, 4557–4576.
- Erisman, M.D., Rothberg, P.G., Diehl, R.E., Morse, C.C., Spandorfer, J.M., and Astrin, S.M. (1985). Deregulation of c-myc gene expression in human colon carcinoma is not accompanied by amplification or rearrangement of the gene. *Mol. Cell. Biol.* *5*, 1969–1976.

- Fearon, E.R., and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759–767.
- Feng, Y., Bommer, G.T., Zhao, J., Green, M., Sands, E., Zhai, Y., Brown, K., Burberry, A., Cho, K.R., and Fearon, E.R. (2011). Mutant Kras Promotes Hyperplasia and Alters Differentiation in the Colon Epithelium But Does Not Expand the Presumptive Stem Cell Pool. *Gastroenterology* 141, 1003-1013.e10.
- Ferraris, R.P., Villenas, S.A., and Diamond, J. (1992). Regulation of brush-border enzyme activities and enterocyte migration rates in mouse small intestine. *Am. J. Physiol.* 262, G1047-1059.
- Flandez, M., Guilmeau, S., Blache, P., and Augenlicht, L.H. (2008). KLF4 REGULATION IN INTESTINAL EPITHELIAL CELL MATURATION. *Exp. Cell Res.* 314, 3712–3723.
- van der Flier, L.G., Haegebarth, A., Stange, D.E., van de Wetering, M., and Clevers, H. (2009). OLFM4 is a robust marker for stem cells in human intestine and marks a subset of colorectal cancer cells. *Gastroenterology* 137, 15–17.
- Fodde, R. (2002). The APC gene in colorectal cancer. *Eur. J. Cancer* 38, 867–871.
- Fodde, R., Smits, R., and Clevers, H. (2001). APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat. Rev. Cancer* 1, 55–67.
- Formeister, E.J., Sionas, A.L., Lorance, D.K., Barkley, C.L., Lee, G.H., and Magness, S.T. (2009). Distinct SOX9 levels differentially mark stem/progenitor populations and enteroendocrine cells of the small intestine epithelium. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 296, G1108–G1118.
- Frank, D.N., St. Amand, A.L., Feldman, R.A., Boedeker, E.C., Harpaz, N., and Pace, N.R. (2007). Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 13780–13785.
- Fresno Vara, J.A., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C., and González-Barón, M. (2004). PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat. Rev.* 30, 193–204.
- Frizelle, F.A., and Burt, M.J. (2001). Surgical management of ulcerative colitis (Zuckschwerdt).
- Gaffen, S.L., Jain, R., Garg, A.V., and Cua, D.J. (2014). IL-23-IL-17 immune axis: Discovery, Mechanistic Understanding, and Clinical Testing. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 585–600.
- Gagné-Sansfaçon, J., Coulombe, G., Langlois, M.-J., Langlois, A., Paquet, M., Carrier, J., Feng, G.-S., Qu, C.-K., Rivard, N., Gagné-Sansfaçon, J., *et al.* (2016). SHP-2

phosphatase contributes to KRAS-driven intestinal oncogenesis but prevents colitis-associated cancer development. *Oncotarget* 7, 65676–65695.

- Gagnière, J., Raisch, J., Veziat, J., Barnich, N., Bonnet, R., Buc, E., Bringer, M.-A., Pezet, D., and Bonnet, M. (2016). Gut microbiota imbalance and colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* 22, 501–518.
- Garrett, W.S. (2015). Cancer and the microbiota. *Science* 348, 80–86.
- Gaudier, E., and Hoebler, C. (2006). [Physiological role of mucins in the colonic barrier integrity]. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 30, 965–974.
- Gregorieff, A., Stange, D.E., Kujala, P., Begthel, H., van den Born, M., Korving, J., Peters, P.J., and Clevers, H. (2009). The ets-domain transcription factor Spdef promotes maturation of goblet and paneth cells in the intestinal epithelium. *Gastroenterology* 137, 1333-1345.e1-3.
- Grivennikov, S.I. (2013). Inflammation and colorectal cancer: colitis-associated neoplasia. *Semin. Immunopathol.* 35, 229–244.
- Grivennikov, S., Karin, E., Terzic, J., Mucida, D., Yu, G.-Y., Vallabhapurapu, S., Scheller, J., Rose-John, S., Cheroutre, H., Eckmann, L., *et al.* (2009). IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell* 15, 103–113.
- Grivennikov, S.I., Wang, K., Mucida, D., Stewart, C.A., Schnabl, B., Jauch, D., Taniguchi, K., Yu, G.-Y., Osterreicher, C.H., Hung, K.E., *et al.* (2012). Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth. *Nature* 491, 254–258.
- Haigis, K.M., Kendall, K.R., Wang, Y., Cheung, A., Haigis, M.C., Glickman, J.N., Niwa-Kawakita, M., Sweet-Cordero, A., Sebolt-Leopold, J., Shannon, K.M., *et al.* (2008). Differential effects of oncogenic K-Ras and N-Ras on proliferation, differentiation and tumor progression in the colon. *Nat. Genet.* 40, 600–608.
- Han, J., and Theiss, A.L. (2014). Stat3: Friend or Foe in Colitis and Colitis-associated Cancer? *Inflamm. Bowel Dis.* 20, 2405–2411.
- Han, T., Xiang, D.-M., Sun, W., Liu, N., Sun, H.-L., Wen, W., Shen, W.-F., Wang, R.-Y., Chen, C., Wang, X., *et al.* (2015). PTPN11/Shp2 overexpression enhances liver cancer progression and predicts poor prognosis of patients. *J. Hepatol.* 63, 651–660.
- Hartman, Z.R., Schaller, M.D., and Agazie, Y.M. (2013). The tyrosine phosphatase SHP2 regulates focal adhesion kinase to promote EGF-induced lamellipodia persistence and cell migration. *Mol. Cancer Res. MCR* 11, 651–664.

- Harvey, M., McArthur, M.J., Montgomery, C.A., Bradley, A., and Donehower, L.A. (1993). Genetic background alters the spectrum of tumors that develop in p53-deficient mice. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 7, 938–943.
- Harvey, M., McArthur, M.J., Montgomery, C.A., Butel, J.S., Bradley, A., and Donehower, L.A. (1993). Spontaneous and carcinogen-induced tumorigenesis in p53-deficient mice. *Nat. Genet.* 5, 225–229.
- He, T.C., Sparks, A.B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L.T., Morin, P.J., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281, 1509–1512.
- van Heel, D.A. (2006). Interleukin 15: its role in intestinal inflammation. *Gut* 55, 444–445.
- Hernández-Monge, J., Rousset-Roman, A.B., Medina-Medina, I., and Olivares-Illana, V. (2016). Dual function of MDM2 and MDMX toward the tumor suppressors p53 and RB. *Genes Cancer* 7, 278–287.
- Hershberg, R.M., and Mayer, L.F. (2000). Antigen processing and presentation by intestinal epithelial cells - polarity and complexity. *Immunol. Today* 21, 123–128.
- Hershberg, R.M., Framson, P.E., Cho, D.H., Lee, L.Y., Kovats, S., Beitz, J., Blum, J.S., and Nepom, G.T. (1997). Intestinal epithelial cells use two distinct pathways for HLA class II antigen processing. *J. Clin. Invest.* 100, 204–215.
- Heuberger, J., Kosel, F., Qi, J., Grossmann, K.S., Rajewsky, K., and Birchmeier, W. (2014). Shp2/MAPK signaling controls goblet/paneth cell fate decisions in the intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 3472–3477.
- Hisamatsu, K., Noguchi, K., Tomita, H., Muto, A., Yamada, N., Kobayashi, K., Hirata, A., Kanayama, T., Niwa, A., Ishida, K., *et al.* (2017). Distinctive crypt shape in a sessile serrated adenoma/polyp: Distribution of Ki67-, p16INK4a-, WNT5A-positive cells and intraepithelial lymphocytes. *Oncol. Rep.* 38, 775.
- Hold, G.L., Smith, M., Grange, C., Watt, E.R., El-Omar, E.M., and Mukhopadhyay, I. (2014). Role of the gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: What have we learnt in the past 10 years? *World J. Gastroenterol. WJG* 20, 1192–1210.
- Hu, Z., Wang, X., Fang, H., Liu, Y., Chen, D., Zhang, Q., Liu, X., Wei, D., Qu, C., and Wang, S. (2016). A tyrosine phosphatase SHP2 gain-of-function mutation enhances malignancy of breast carcinoma. *Oncotarget* 7, 5664–5676.
- Hughes, L.A.E., Simons, C.C.J.M., van den Brandt, P.A., van Engeland, M., and Weijenberg, M.P. (2017). Lifestyle, Diet, and Colorectal Cancer Risk According to (Epi)genetic Instability: Current Evidence and Future Directions of Molecular Pathological Epidemiology. *Curr. Colorectal Cancer Rep.* 13, 455–469.

- Hunter, T. (1995). Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* *80*, 225–236.
- Hyun, Y.S., Han, D.S., Lee, A.R., Eun, C.S., Youn, J., and Kim, H.-Y. (2012). Role of IL-17A in the development of colitis-associated cancer. *Carcinogenesis* *33*, 931–936.
- Iizuka, M., and Konno, S. (2011). Wound healing of intestinal epithelial cells. *World J. Gastroenterol. WJG* *17*, 2161–2171.
- Ireland, H., Houghton, C., Howard, L., and Winton, D.J. (2005). Cellular inheritance of a Cre-activated reporter gene to determine paneth cell longevity in the murine small intestine. *Dev. Dyn.* *233*, 1332–1336.
- Ito, M., Yoshida, K., Kyo, E., Ayhan, A., Nakayama, H., Yasui, W., Ito, H., and Tahara, E. (1990). Expression of several growth factors and their receptor genes in human colon carcinomas. *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* *59*, 173–178.
- Jančík, S., Drábek, J., Radzioch, D., and Hajdúch, M. (2010). Clinical Relevance of KRAS in Human Cancers.
- Jobin, C. (2017). Human Intestinal Microbiota and Colorectal Cancer: Moving Beyond Associative Studies. *Gastroenterology* *153*, 1475–1478.
- Johansson, M.E.V., Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L., and Hansson, G.C. (2008). The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 15064–15069.
- Johansson, M.E.V., Ambort, D., Pelaseyed, T., Schütte, A., Gustafsson, J.K., Ermund, A., Subramani, D.B., Holmén-Larsson, J.M., Thomsson, K.A., Bergström, J.H., *et al.* (2011). Composition and functional role of the mucus layers in the intestine. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *68*, 3635–3641.
- Johansson, M.E.V., Sjövall, H., and Hansson, G.C. (2013). The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *10*, 352–361.
- Johnson, C.M., Wei, C., Ensor, J.E., Smolenski, D.J., Amos, C.I., Levin, B., and Berry, D.A. (2013). Meta-analyses of colorectal cancer risk factors. *Cancer Causes Control CCC* *24*, 1207–1222.
- Kaibuchi, K., Kuroda, S., and Amano, M. (1999). Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells. *Annu. Rev. Biochem.* *68*, 459–486.
- Kandoth, C., McLellan, M.D., Vandin, F., Ye, K., Niu, B., Lu, C., Xie, M., Zhang, Q., McMichael, J.F., Wyczalkowski, M.A., *et al.* (2013). Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* *502*, 333–339.

- Kaplan, K.B., Burds, A.A., Swedlow, J.R., Bekir, S.S., Sorger, P.K., and Näthke, I.S. (2001). A role for the Adenomatous Polyposis Coli protein in chromosome segregation. *Nat. Cell Biol.* 3, 429–432.
- Kaser, A., Zeissig, S., and Blumberg, R.S. (2010). Inflammatory bowel disease. *Annu. Rev. Immunol.* 28, 573–621.
- Khayrullina, T., Yen, J.-H., Jing, H., and Ganea, D. (2008). In vitro differentiation of dendritic cells in the presence of prostaglandin E2 alters the IL-12/IL-23 balance and promotes differentiation of Th17 cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 181, 721–735.
- Kikuchi, A. (2000). Regulation of beta-catenin signaling in the Wnt pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268, 243–248.
- Kim, D.J., Tremblay, M.L., and DiGiovanni, J. (2010). Protein Tyrosine Phosphatases, TC-PTP, SHP1, and SHP2, Cooperate in Rapid Dephosphorylation of Stat3 in Keratinocytes Following UVB Irradiation. *PLOS ONE* 5, e10290.
- King, P.D., Lubeck, B.A., and Lapinski, P.E. (2013). Nonredundant functions for Ras GTPase-activating proteins in tissue homeostasis. *Sci. Signal.* 6, re1.
- Kjellek, S. (2009). The trefoil factor family - small peptides with multiple functionalities. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 66, 1350–1369.
- Kobayashi, K.S., Chamaillard, M., Ogura, Y., Henegariu, O., Inohara, N., Nuñez, G., and Flavell, R.A. (2005). Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* 307, 731–734.
- Kolls, J.K., and Lindén, A. (2004). Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 21, 467–476.
- Kontaridis, M.I., Eminaga, S., Fornaro, M., Zito, C.I., Sordella, R., Settleman, J., and Bennett, A.M. (2004). SHP-2 positively regulates myogenesis by coupling to the Rho GTPase signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* 24, 5340–5352.
- Korinek, V., Barker, N., Morin, P.J., van Wichen, D., de Weger, R., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Clevers, H. (1997). Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinoma. *Science* 275, 1784–1787.
- Kostic, A.D., Chun, E., Robertson, L., Glickman, J.N., Gallini, C.A., Michaud, M., Clancy, T.E., Chung, D.C., Lochhead, P., Hold, G.L., *et al.* (2013). *Fusobacterium nucleatum* potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor immune microenvironment. *Cell Host Microbe* 14, 207–215.
- Kriegl, L., Neumann, J., Vieth, M., Greten, F.R., Reu, S., Jung, A., and Kirchner, T. (2011). Up and downregulation of p16(Ink4a) expression in BRAF-mutated polyps/adenomas indicates a senescence barrier in the serrated route to colon cancer. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* 24, 1015–1022.

- Kruse, J.-P., and Gu, W. (2009). Modes of p53 regulation. *Cell* 137, 609–622.
- Kuitunen, P. (1966). [The structure of the normal and pathological small intestine]. *Duodecim Laaketieteellinen Aikakauskirja* 82, 1040–1045.
- Laukoetter, M.G., Bruewer, M., and Nusrat, A. (2006). Regulation of the intestinal epithelial barrier by the apical junctional complex. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 22, 85–89.
- Lebeis, S.L., Bommarius, B., Parkos, C.A., Sherman, M.A., and Kalman, D. (2007). TLR signaling mediated by MyD88 is required for a protective innate immune response by neutrophils to *Citrobacter rodentium*. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 179, 566–577.
- Lee, H., Herrmann, A., Deng, J.-H., Kujawski, M., Niu, G., Li, Z., Forman, S., Jove, R., Pardoll, D.M., and Yu, H. (2009). Persistently activated Stat3 maintains constitutive NF-kappaB activity in tumors. *Cancer Cell* 15, 283–293.
- Lee, J., Kim, J.C.K., Lee, S.-E., Quinley, C., Kim, H., Herdman, S., Corr, M., and Raz, E. (2012). Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) protein suppresses adenoma-to-carcinoma transition in *Apcmin/+* mice via regulation of Snail-1 (SNAI) protein stability. *J. Biol. Chem.* 287, 18182–18189.
- Lee, S.H., Hu, L.-L., Gonzalez-Navajas, J., Seo, G.S., Shen, C., Brick, J., Herdman, S., Varki, N., Corr, M., Lee, J., *et al.* (2010). ERK activation drives intestinal tumorigenesis in *Apc(min/+)* mice. *Nat. Med.* 16, 665–670.
- Lemieux, É., Bergeron, S., Durand, V., Asselin, C., Saucier, C., and Rivard, N. (2009). Constitutively active MEK1 is sufficient to induce epithelial-to-mesenchymal transition in intestinal epithelial cells and to promote tumor invasion and metastasis. *Int. J. Cancer* 125, 1575–1586.
- Lemieux, E., Cagnol, S., Beaudry, K., Carrier, J., and Rivard, N. (2015). Oncogenic KRAS signalling promotes the Wnt/ β -catenin pathway through LRP6 in colorectal cancer. *Oncogene* 34, 4914.
- Leslie, A., Carey, F.A., Pratt, N.R., and Steele, R.J.C. (2002). The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Br. J. Surg.* 89, 845–860.
- Levine, A.J., and Oren, M. (2009). The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat. Rev. Cancer* 9, 749–758.
- Levrero, M., De Laurenzi, V., Costanzo, A., Gong, J., Wang, J.Y., and Melino, G. (2000). The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 10), 1661–1670.
- Li, L., and Clevers, H. (2010). Coexistence of Quiescent and Active Adult Stem Cells in Mammals. *Science* 327, 542–545.

- Li, H.-L., Ma, Y., Zheng, C.-J., Jin, W.-Y., Liu, W.-S., and Wang, R.-L. (2017). Exploring the effect of D61G mutation on SHP2 cause gain of function activity by a molecular dynamics study. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1–13.
- Li, M., Brooks, C.L., Wu-Baer, F., Chen, D., Baer, R., and Gu, W. (2003). Mono- versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2. *Science* 302, 1972–1975.
- Li, S., Wang, L., Zhao, Q., Liu, Y., He, L., Xu, Q., Sun, X., Teng, L., Cheng, H., and Ke, Y. (2014). SHP2 Positively Regulates TGF β 1-induced Epithelial-Mesenchymal Transition Modulated by Its Novel Interacting Protein Hook1. *J. Biol. Chem.* 289, 34152–34160.
- Li, W., Nishimura, R., Kashishian, A., Batzer, A.G., Kim, W.J., Cooper, J.A., and Schlessinger, J. (1994). A new function for a phosphotyrosine phosphatase: linking GRB2-Sos to a receptor tyrosine kinase. *Mol. Cell. Biol.* 14, 509–517.
- Liang, G.H., and Weber, C.R. (2014). Molecular aspects of tight junction barrier function. *Curr. Opin. Pharmacol.* 19, 84–89.
- Liu, J.Z., van Sommeren, S., Huang, H., Ng, S.C., Alberts, R., Takahashi, A., Ripke, S., Lee, J.C., Jostins, L., Shah, T., *et al.* (2015). Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations. *Nat. Genet.* 47, 979–986.
- Liu, X., Zheng, H., Li, X., Wang, S., Meyerson, H.J., Yang, W., Neel, B.G., and Qu, C.-K. (2016). Gain-of-function mutations of Ptpn11 (Shp2) cause aberrant mitosis and increase susceptibility to DNA damage-induced malignancies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 984–989.
- Loddo, I., and Romano, C. (2015). Inflammatory Bowel Disease: Genetics, Epigenetics, and Pathogenesis. *Front. Immunol.* 6, 551.
- Longacre, T.A., and Fenoglio-Preiser, C.M. (1990). Mixed hyperplastic adenomatous polyps/serrated adenomas. A distinct form of colorectal neoplasia. *Am. J. Surg. Pathol.* 14, 524–537.
- López, I., P Oliveira, L., Tucci, P., Alvarez-Valín, F., A Coudry, R., and Marín, M. (2012). Different mutation profiles associated to P53 accumulation in colorectal cancer. *Gene* 499, 81–87.
- López-Díaz, L., Jain, R.N., Keeley, T.M., VanDussen, K.L., Brunkan, C.S., Gumucio, D.L., and Samuelson, L.C. (2007). Intestinal Neurogenin 3 Directs Differentiation of a Bipotential Secretory Progenitor to Endocrine Cell Rather than Goblet Cell Fate. *Dev. Biol.* 309, 298–305.
- Lu, W., Gong, D., Bar-Sagi, D., and Cole, P.A. (2001). Site-specific incorporation of a phosphotyrosine mimetic reveals a role for tyrosine phosphorylation of SHP-2 in cell signaling. *Mol. Cell* 8, 759–769.

- Luo, F., Brooks, D.G., Ye, H., Hamoudi, R., Pouligiannis, G., Patek, C.E., Winton, D.J., and Arends, M.J. (2009). Mutated K-ras(Asp12) promotes tumorigenesis in Apc(Min) mice more in the large than the small intestines, with synergistic effects between K-ras and Wnt pathways. *Int. J. Exp. Pathol.* *90*, 558–574.
- Maida, M., Macaluso, F.S., Ianiro, G., Mangiola, F., Sinagra, E., Hold, G., Maida, C., Cammarota, G., Gasbarrini, A., and Scarpulla, G. (2017). Screening of colorectal cancer: present and future. *Expert Rev. Anticancer Ther.* *17*, 1131–1146.
- Mann, B., Gelos, M., Siedow, A., Hanski, M.L., Gratchev, A., Ilyas, M., Bodmer, W.F., Moyer, M.P., Riecken, E.O., Buhr, H.J., *et al.* (1999). Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 1603–1608.
- Marais, R., Light, Y., Paterson, H.F., and Marshall, C.J. (1995). Ras recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation. *EMBO J.* *14*, 3136–3145.
- Marshman, E., Booth, C., and Potten, C.S. (2002). The intestinal epithelial stem cell. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* *24*, 91–98.
- Mashimo, H., Wu, D.C., Podolsky, D.K., and Fishman, M.C. (1996). Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor. *Science* *274*, 262–265.
- Mason, J.M., Morrison, D.J., Basson, M.A., and Licht, J.D. (2006). Sprouty proteins: multifaceted negative-feedback regulators of receptor tyrosine kinase signaling. *Trends Cell Biol.* *16*, 45–54.
- Matsubayashi, Y., Ebisuya, M., Honjoh, S., and Nishida, E. (2004). ERK Activation Propagates in Epithelial Cell Sheets and Regulates Their Migration during Wound Healing. *Curr. Biol.* *14*, 731–735.
- Miron, N., and Cristea, V. (2012). Enterocytes: active cells in tolerance to food and microbial antigens in the gut. *Clin. Exp. Immunol.* *167*, 405–412.
- Miyamoto, D., Miyamoto, M., Takahashi, A., Yomogita, Y., Higashi, H., Kondo, S., and Hatakeyama, M. (2008). Isolation of a distinct class of gain-of-function SHP-2 mutants with oncogenic RAS-like transforming activity from solid tumors. *Oncogene* *27*, 3508–3515.
- Miyoshi, H., and Stappenbeck, T.S. (2013). In vitro expansion and genetic modification of gastrointestinal stem cells in spheroid culture. *Nat. Protoc.* *8*, 2471–2482.
- Molodecky, N.A., and Kaplan, G.G. (2010). Environmental Risk Factors for Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol. Hepatol.* *6*, 339–346.
- Moser, A.R., Pitot, H.C., and Dove, W.F. (1990). A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science* *247*, 322–324.

- Moser, A.R., Shoemaker, A.R., Connelly, C.S., Clipson, L., Gould, K.A., Luongo, C., Dove, W.F., Siggers, P.H., and Gardner, R.L. (1995). Homozygosity for the Min allele of Apc results in disruption of mouse development prior to gastrulation. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *203*, 422–433.
- Moustakas, A., and Heldin, C.-H. (2016). Mechanisms of TGF β -Induced Epithelial–Mesenchymal Transition. *J. Clin. Med.* *5*.
- Mukhopadhyaya, I., Hansen, R., El-Omar, E.M., and Hold, G.L. (2012). IBD-what role do Proteobacteria play? *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *9*, 219–230.
- Müller, M.F., Ibrahim, A.E.K., and Arends, M.J. (2016). Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Arch.* *469*, 125–134.
- Mundy, R., MacDonald, T.T., Dougan, G., Frankel, G., and Wiles, S. (2005). *Citrobacter rodentium* of mice and man. *Cell. Microbiol.* *7*, 1697–1706.
- Munemitsu, S., Souza, B., Müller, O., Albert, I., Rubinfeld, B., and Polakis, P. (1994). The APC gene product associates with microtubules in vivo and promotes their assembly in vitro. *Cancer Res.* *54*, 3676–3681.
- Muñoz, J., Stange, D.E., Schepers, A.G., van de Wetering, M., Koo, B.-K., Itzkovitz, S., Volckmann, R., Kung, K.S., Koster, J., Radulescu, S., *et al.* (2012). The Lgr5 intestinal stem cell signature: robust expression of proposed quiescent ‘+4’ cell markers.’ *EMBO J.* *31*, 3079–3091.
- Musteanu, M., Blaas, L., Mair, M., Schleder, M., Bilban, M., Tauber, S., Esterbauer, H., Mueller, M., Casanova, E., Kenner, L., *et al.* (2010). Stat3 is a negative regulator of intestinal tumor progression in Apc(Min) mice. *Gastroenterology* *138*, 1003-1011.e1-5.
- Nair, M.G., Guild, K.J., Du, Y., Zaph, C., Yancopoulos, G.D., Valenzuela, D.M., Murphy, A., Stevens, S., Karow, M., and Artis, D. (2008). Goblet Cell-Derived Resistin-Like Molecule β Augments CD4⁺ T Cell Production of IFN- γ and Infection-Induced Intestinal Inflammation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *181*, 4709.
- Nakae, S., Saijo, S., Horai, R., Sudo, K., Mori, S., and Iwakura, Y. (2003). IL-17 production from activated T cells is required for the spontaneous development of destructive arthritis in mice deficient in IL-1 receptor antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 5986–5990.
- Nakayama, M., Sakai, E., Echizen, K., Yamada, Y., Oshima, H., Han, T.-S., Ohki, R., Fujii, S., Ochiai, A., Robine, S., *et al.* (2017). Intestinal cancer progression by mutant p53 through the acquisition of invasiveness associated with complex glandular formation. *Oncogene* *36*, 5885.
- Narumi, Y., Isomoto, H., Shiota, M., Sato, K., Kondo, S., Machida, H., Yanagihara, K., Mizuta, Y., Kohno, S., and Tsukamoto, K. (2009). Polymorphisms of PTPN11 coding

- SHP-2 as biomarkers for ulcerative colitis susceptibility in the Japanese population. *J. Clin. Immunol.* *29*, 303–310.
- Naser, S.A., Arce, M., Khaja, A., Fernandez, M., Naser, N., Elwasila, S., and Thanigachalam, S. (2012). Role of ATG16L, NOD2 and IL23R in Crohn's disease pathogenesis. *World J. Gastroenterol. WJG* *18*, 412–424.
 - Naugler, W.E., and Karin, M. (2008). The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer. *Trends Mol. Med.* *14*, 109–119.
 - Nava, R., González, G., Kybic, J., and Escalante-Ramírez, B. (2015). Classification of Tumor Epithelium and Stroma in Colorectal Cancer Based on Discrete Tchebichef Moments. In *Clinical Image-Based Procedures. Translational Research in Medical Imaging*, (Springer, Cham), pp. 79–87.
 - Neufert, C., Pickert, G., Zheng, Y., Wittkopf, N., Warntjen, M., Nikolae, A., Ouyang, W., Neurath, M.F., and Becker, C. (2010). Activation of epithelial STAT3 regulates intestinal homeostasis. *Cell Cycle* *9*, 652–655.
 - Ng, S.C., Shi, H.Y., Hamidi, N., Underwood, F.E., Tang, W., Benchimol, E.I., Panaccione, R., Ghosh, S., Wu, J.C.Y., Chan, F.K.L., *et al.* (2017). Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet Lond. Engl.*
 - Nichols, R.J., Haderk, F., Stahlhut, C., Schulze, C.J., Hemmati, G., Wildes, D., Tzitzilonis, C., Mordec, K., Marquez, A., Romero, J., *et al.* (2017). Efficacy of SHP2 phosphatase inhibition in cancers with nucleotide-cycling oncogenic RAS, RAS-GTP dependent oncogenic BRAF and NF1 loss. *BioRxiv* 188730.
 - Nishida, N., Kitano, M., Sakurai, T., and Kudo, M. (2015). Molecular Mechanism and Prediction of Sorafenib Chemoresistance in Human Hepatocellular Carcinoma. *Dig. Dis. Basel Switz.* *33*, 771–779.
 - Noah, T.K., Donahue, B., and Shroyer, N.F. (2011). Intestinal development and differentiation. *Exp. Cell Res.* *317*, 2702–2710.
 - Ogura, Y., Inohara, N., Benito, A., Chen, F.F., Yamaoka, S., and Nunez, G. (2001). Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J. Biol. Chem.* *276*, 4812–4818.
 - Ohtani, T., Ishihara, K., Atsumi, T., Nishida, K., Kaneko, Y., Miyata, T., Itoh, S., Narimatsu, M., Maeda, H., Fukada, T., *et al.* (2000). Dissection of signaling cascades through gp130 in vivo: reciprocal roles for STAT3- and SHP2-mediated signals in immune responses. *Immunity* *12*, 95–105.
 - Okumura, R., and Takeda, K. (2017). Roles of intestinal epithelial cells in the maintenance of gut homeostasis. *Exp. Mol. Med.* *49*, e338.

- Olive, K.P., Tuveson, D.A., Ruhe, Z.C., Yin, B., Willis, N.A., Bronson, R.T., Crowley, D., and Jacks, T. (2004). Mutant p53 gain of function in two mouse models of Li-Fraumeni syndrome. *Cell* *119*, 847–860.
- Oshima, M., Oshima, H., Kitagawa, K., Kobayashi, M., Itakura, C., and Taketo, M. (1995). Loss of Apc heterozygosity and abnormal tissue building in nascent intestinal polyps in mice carrying a truncated Apc gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 4482–4486.
- Ouellette, A.J. (2011). Paneth Cell α -Defensins in Enteric Innate Immunity. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *68*, 2215–2229.
- Park, S.-J., Rashid, A., Lee, J.-H., Kim, S.G., Hamilton, S.R., and Wu, T.-T. (2003). Frequent CpG island methylation in serrated adenomas of the colorectum. *Am. J. Pathol.* *162*, 815–822.
- Parkin, D.M. (2006). The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int. J. Cancer* *118*, 3030–3044.
- Pastorelli, L., De Salvo, C., Mercado, J.R., Vecchi, M., and Pizarro, T.T. (2013). Central Role of the Gut Epithelial Barrier in the Pathogenesis of Chronic Intestinal Inflammation: Lessons Learned from Animal Models and Human Genetics. *Front. Immunol.* *4*.
- Patai, Á.V., Molnár, B., Tulassay, Z., and Sipos, F. (2013). Serrated pathway: Alternative route to colorectal cancer. *World J. Gastroenterol. WJG* *19*, 607–615.
- Peng, Z.Y., and Cartwright, C.A. (1995). Regulation of the Src tyrosine kinase and Syp tyrosine phosphatase by their cellular association. *Oncogene* *11*, 1955–1962.
- Pickert, G., Neufert, C., Leppkes, M., Zheng, Y., Wittkopf, N., Warntjen, M., Lehr, H.-A., Hirth, S., Weigmann, B., Wirtz, S., *et al.* (2009). STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing. *J. Exp. Med.* *206*, 1465–1472.
- Pino, M.S., Kikuchi, H., Zeng, M., Herraiz, M.-T., Sperduti, I., Berger, D., Park, D.-Y., Iafrate, A.J., Zukerberg, L.R., and Chung, D.C. (2010). The epithelial to mesenchymal transition is impaired in colon cancer cells with microsatellite instability. *Gastroenterology* *138*, 1406–1417.
- Plotnikov, A., Zehorai, E., Procaccia, S., and Seger, R. (2011). The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochim. Biophys. Acta* *1813*, 1619–1633.
- Pluskey, S., Wandless, T.J., Walsh, C.T., and Shoelson, S.E. (1995). Potent stimulation of SH-PTP2 phosphatase activity by simultaneous occupancy of both SH2 domains. *J. Biol. Chem.* *270*, 2897–2900.
- Porchet, N., and Aubert, J.-P. (2004). [MUC genes: mucin or not mucin? That is the question]. *Med. Sci. MS* *20*, 569–574.

- Powell, D.W., Pinchuk, I.V., Saada, J.I., Chen, X., and Mifflin, R.C. (2011). Mesenchymal Cells of the Intestinal Lamina Propria. *Annu. Rev. Physiol.* 73, 213–237.
- Powell, S.M., Zilz, N., Beazer-Barclay, Y., Bryan, T.M., Hamilton, S.R., Thibodeau, S.N., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1992). APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 359, 235–237.
- Pozzi, A., Yan, X., Macias-Perez, I., Wei, S., Hata, A.N., Breyer, R.M., Morrow, J.D., and Capdevila, J.H. (2004). Colon carcinoma cell growth is associated with prostaglandin E2/EP4 receptor-evoked ERK activation. *J. Biol. Chem.* 279, 29797–29804.
- Qiu, W., Wang, X., Romanov, V., Hutchinson, A., Lin, A., Ruzanov, M., Battaile, K.P., Pai, E.F., Neel, B.G., and Chirgadze, N.Y. (2014). Structural insights into Noonan/LEOPARD syndrome-related mutants of protein-tyrosine phosphatase SHP2 (PTPN11). *BMC Struct. Biol.* 14, 10.
- Qu, C.K. (2000). The SHP-2 tyrosine phosphatase: Signaling mechanisms and biological functions. *Cell Res.* 10, 279.
- Rad, R., Cadiñanos, J., Rad, L., Varela, I., Strong, A., Kriegl, L., Constantino-Casas, F., Eser, S., Hieber, M., Seidler, B., *et al.* (2013). A Genetic Progression Model of BrafV600E-Induced Intestinal Tumorigenesis Reveals Targets for Therapeutic Intervention. *Cancer Cell* 24, 15–29.
- Recio-Boiles, A., and Cagir, B. (2017). Cancer, Colon. In *StatPearls*, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), p.
- Rubin, D.C., Shaker, A., and Levin, M.S. (2012). Chronic intestinal inflammation: inflammatory bowel disease and colitis-associated colon cancer. *Front. Immunol.* 3.
- Rubinstein, M.R., Wang, X., Liu, W., Hao, Y., Cai, G., and Han, Y.W. (2013). *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/ β -catenin signaling via its FadA adhesin. *Cell Host Microbe* 14, 195–206.
- Russo, A., Bazan, V., Iacopetta, B., Kerr, D., Soussi, T., Gebbia, N., and TP53-CRC Collaborative Study Group (2005). The TP53 colorectal cancer international collaborative study on the prognostic and predictive significance of p53 mutation: influence of tumor site, type of mutation, and adjuvant treatment. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 23, 7518–7528.
- Ryan, K.M., Phillips, A.C., and Vousden, K.H. (2001). Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 332–337.
- Salzman, N.H. (2010). Paneth cell defensins and the regulation of the microbiome: détente at mucosal surfaces. *Gut Microbes* 1, 401–406.
- Sangiorgi, E., and Capecchi, M.R. (2008). *Bmi1* is expressed in vivo in intestinal stem cells. *Nat. Genet.* 40, 915–920.

- Sansom, O.J., Meniel, V.S., Muncan, V., Phesse, T.J., Wilkins, J.A., Reed, K.R., Vass, J.K., Athineos, D., Clevers, H., and Clarke, A.R. (2007). Myc deletion rescues Apc deficiency in the small intestine. *Nature* 446, 676–679.
- Sato, T., van Es, J.H., Snippert, H.J., Stange, D.E., Vries, R.G., van den Born, M., Barker, N., Shroyer, N.F., van de Wetering, M., and Clevers, H. (2011). Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* 469, 415–418.
- Schetter, A.J., Nguyen, G.H., Bowman, E.D., Mathé, E.A., Yuen, S.T., Hawkes, J.E., Croce, C.M., Leung, S.Y., and Harris, C.C. (2009). Association of Inflammation-Related and microRNA Gene Expression with Cancer-Specific Mortality of Colon Adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.* 15, 5878–5887.
- Schmitt, C.A. (2007). Cellular senescence and cancer treatment. *Biochim. Biophys. Acta* 1775, 5–20.
- Schoenwaelder, S.M., Petch, L.A., Williamson, D., Shen, R., Feng, G.S., and Burridge, K. (2000). The protein tyrosine phosphatase Shp-2 regulates RhoA activity. *Curr. Biol. CB* 10, 1523–1526.
- Schuijers, J., Junker, J.P., Mokry, M., Hatzis, P., Koo, B.-K., Sasselli, V., van der Flier, L.G., Cuppen, E., van Oudenaarden, A., and Clevers, H. (2015). Ascl2 acts as an R-spondin/Wnt-responsive switch to control stemness in intestinal crypts. *Cell Stem Cell* 16, 158–170.
- Sherr, C.J. (2012). Ink4-Arf Locus in Cancer and Aging. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 1, 731–741.
- Short, M.L., Nickel, J., Schmitz, A., and Renkawitz, R. (1996). Lysozyme gene expression and regulation. *EXS* 75, 243–257.
- Shroyer, N.F., Wallis, D., Venken, K.J.T., Bellen, H.J., and Zoghbi, H.Y. (2005). Gfi1 functions downstream of Math1 to control intestinal secretory cell subtype allocation and differentiation. *Genes Dev.* 19, 2412–2417.
- Shtutman, M., Zhurinsky, J., Simcha, I., Albanese, C., D’Amico, M., Pestell, R., and Ben-Ze’ev, A. (1999). The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 5522–5527.
- Shuai, K., and Liu, B. (2003). Regulation of JAK–STAT signalling in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 900.
- Siddiqi, S.A., Kumar, N.S., Nutting, D.F., and Mansbach II, C.M. (2001). Nutrient absorption. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 17, 110–117.
- Simmonds, N., Furman, M., Karanika, E., Phillips, A., and Bates, A.W.H. (2014). Paneth cell metaplasia in newly diagnosed inflammatory bowel disease in children. *BMC Gastroenterol.* 14, 93.

- Simoneau, M., Coulombe, G., Vandal, G., Vézina, A., and Rivard, N. (2011). SHP-1 inhibits β -catenin function by inducing its degradation and interfering with its association with TATA-binding protein. *Cell. Signal.* *23*, 269–279.
- Singh, R., Zorrón Cheng Tao Pu, L., Koay, D., and Burt, A. (2016). Sessile serrated adenoma/polyps: Where are we at in 2016? *World J. Gastroenterol.* *22*, 7754–7759.
- Skolnik, E.Y., Batzer, A., Li, N., Lee, C.H., Lowenstein, E., Mohammadi, M., Margolis, B., and Schlessinger, J. (1993). The function of GRB2 in linking the insulin receptor to Ras signaling pathways. *Science* *260*, 1953–1955.
- Smith, K.J., Levy, D.B., Maupin, P., Pollard, T.D., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1994). Wild-type but not mutant APC associates with the microtubule cytoskeleton. *Cancer Res.* *54*, 3672–3675.
- Snover, D.C. (2011). Update on the serrated pathway to colorectal carcinoma. *Hum. Pathol.* *42*, 1–10.
- Songyang, Z., Shoelson, S.E., McGlade, J., Olivier, P., Pawson, T., Bustelo, X.R., Barbacid, M., Sabe, H., Hanafusa, H., and Yi, T. (1994). Specific motifs recognized by the SH2 domains of Csk, 3BP2, fps/fes, GRB-2, HCP, SHC, Syk, and Vav. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 2777–2785.
- Sturm, A., and Dignass, A.U. (2008). Epithelial restitution and wound healing in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* *14*, 348–353.
- Su, L.K., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Preisinger, A.C., Moser, A.R., Luongo, C., Gould, K.A., and Dove, W.F. (1992). Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene. *Science* *256*, 668–670.
- Sugimoto, K. (2008). Role of STAT3 in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol. WJG* *14*, 5110–5114.
- Tadesse, S., Corner, G., Dhima, E., Houston, M., Guha, C., Augenlicht, L., and Velcich, A. (2017). MUC2 mucin deficiency alters inflammatory and metabolic pathways in the mouse intestinal mucosa. *Oncotarget* *8*, 71456–71470.
- Takahashi, A., Tsutsumi, R., Kikuchi, I., Obuse, C., Saito, Y., Seidi, A., Karisch, R., Fernandez, M., Cho, T., Ohnishi, N., *et al.* (2011). SHP2 tyrosine phosphatase converts parafibromin/Cdc73 from a tumor suppressor to an oncogenic driver. *Mol. Cell* *43*, 45–56.
- Tanaka, M., Saito, H., Kusumi, T., Fukuda, S., Shimoyama, T., Sasaki, Y., Suto, K., Munakata, A., and Kudo, H. (2001). Spatial distribution and histogenesis of colorectal Paneth cell metaplasia in idiopathic inflammatory bowel disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* *16*, 1353–1359.

- Tanaka, T., Kohno, H., Suzuki, R., Hata, K., Sugie, S., Niho, N., Sakano, K., Takahashi, M., and Wakabayashi, K. (2006). Dextran sodium sulfate strongly promotes colorectal carcinogenesis in Apc(Min/+) mice: inflammatory stimuli by dextran sodium sulfate results in development of multiple colonic neoplasms. *Int. J. Cancer* *118*, 25–34.
- Tang, Y., Zhao, W., Chen, Y., Zhao, Y., and Gu, W. (2008). Acetylation is indispensable for p53 activation. *Cell* *133*, 612–626.
- Tannock, G.W. (2008). Molecular analysis of the intestinal microflora in IBD. *Mucosal Immunol. 1 Suppl 1*, S15-18.
- Tefft, D., Lee, M., Smith, S., Crowe, D.L., Bellusci, S., and Warburton, D. (2002). mSprouty2 inhibits FGF10-activated MAP kinase by differentially binding to upstream target proteins. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* *283*, L700-706.
- Terzić, J., Grivennikov, S., Karin, E., and Karin, M. (2010). Inflammation and Colon Cancer. *Gastroenterology* *138*, 2101-2114.e5.
- Tessner, T.G., Muhale, F., Riehl, T.E., Anant, S., and Stenson, W.F. (2004). Prostaglandin E2 reduces radiation-induced epithelial apoptosis through a mechanism involving AKT activation and bax translocation. *J. Clin. Invest.* *114*, 1676–1685.
- Tian, H., Biehs, B., Chiu, C., Siebel, C., Wu, Y., Costa, M., de Sauvage, F.J., and Klein, O.D. (2015). Opposing activities of Notch and Wnt signaling regulate intestinal stem cells and gut homeostasis. *Cell Rep.* *11*, 33–42.
- Tiganis, T., and Bennett, A.M. (2007). Protein tyrosine phosphatase function: the substrate perspective. *Biochem. J.* *402*, 1–15.
- Tosolini, M., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Fredriksen, T., Mauger, S., Bindea, G., Berger, A., Bruneval, P., Fridman, W.-H., Pagès, F., *et al.* (2011). Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer Res.* *71*, 1263–1271.
- Tremblay, S., Romain, G., Roux, M., Chen, X.-L., Brown, K., Gibson, D.L., Ramanathan, S., and Menendez, A. (2017). Bile Acid Administration Elicits an Intestinal Antimicrobial Program and Reduces the Bacterial Burden in Two Mouse Models of Enteric Infection. *Infect. Immun.* *85*.
- Tripathi, S.K., Chen, Z., Larjo, A., Kanduri, K., Nousiainen, K., Äijö, T., Ricaño-Ponce, I., Hrdlickova, B., Tuomela, S., Laajala, E., *et al.* (2017). Genome-wide Analysis of STAT3-Mediated Transcription during Early Human Th17 Cell Differentiation. *Cell Rep.* *19*, 1888–1901.
- Tsang, Y.H., Han, X., Man, W.Y., Lee, N., and Poon, R.Y.C. (2012). Novel Functions of the Phosphatase SHP2 in the DNA Replication and Damage Checkpoints. *PLOS ONE* *7*, e49943.

- Tytgat, K.M., van der Wal, J.W., Einerhand, A.W., Büller, H.A., and Dekker, J. (1996). Quantitative analysis of MUC2 synthesis in ulcerative colitis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *224*, 397–405.
- Urosevic, J., Garcia-Albéniz, X., Planet, E., Real, S., Céspedes, M.V., Guiu, M., Fernandez, E., Bellmunt, A., Gawrzak, S., Pavlovic, M., *et al.* (2014). Colon cancer cells colonize the lung from established liver metastases through p38 MAPK signalling and PTHLH. *Nat. Cell Biol.* *16*, 685–694.
- Vaishnava, S., Yamamoto, M., Severson, K.M., Ruhn, K.A., Yu, X., Koren, O., Ley, R., Wakeland, E.K., and Hooper, L.V. (2011). The antibacterial lectin RegIIIgamma promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. *Science* *334*, 255–258.
- Van Der Kraak, L., Gros, P., and Beauchemin, N. (2015). Colitis-associated colon cancer: Is it in your genes? *World J. Gastroenterol.* *21*, 11688–11699.
- Van der Sluis, M., De Koning, B.A.E., De Bruijn, A.C.J.M., Velcich, A., Meijerink, J.P.P., Van Goudoever, J.B., Büller, H.A., Dekker, J., Van Seuningen, I., Renes, I.B., *et al.* (2006). Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology* *131*, 117–129.
- Velcich, A., Yang, W., Heyer, J., Fragale, A., Nicholas, C., Viani, S., Kucherlapati, R., Lipkin, M., Yang, K., and Augenlicht, L. (2002). Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2. *Science* *295*, 1726–1729.
- Verdugo, P. (1990). Goblet cells secretion and mucogenesis. *Annu. Rev. Physiol.* *52*, 157–176.
- Vereecke, L., Beyaert, R., and van Loo, G. (2011). Enterocyte death and intestinal barrier maintenance in homeostasis and disease. *Trends Mol. Med.* *17*, 584–593.
- Vogel, W., Lammers, R., Huang, J., and Ullrich, A. (1993). Activation of a phosphotyrosine phosphatase by tyrosine phosphorylation. *Science* *259*, 1611–1614.
- Voisin, L., Julien, C., Duhamel, S., Gopalbhai, K., Claveau, I., Saba-El-Leil, M.K., Rodrigue-Gervais, I.G., Gaboury, L., Lamarre, D., Basik, M., *et al.* (2008). Activation of MEK1 or MEK2 isoform is sufficient to fully transform intestinal epithelial cells and induce the formation of metastatic tumors. *BMC Cancer* *8*, 337.
- Walther, A., Johnstone, E., Swanton, C., Midgley, R., Tomlinson, I., and Kerr, D. (2009). Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat. Rev. Cancer* *9*, 489.
- Wang, D., and Dubois, R.N. (2010). The role of COX-2 in intestinal inflammation and colorectal cancer. *Oncogene* *29*, 781–788.

- Wang, J., Zhao, G., Zhang, P., Wang, Z., Zhang, Y., Gao, D., Zhou, P., and Cao, Y. (2014). Measurement of the biophysical properties of porcine adipose-derived stem cells by a microperfusion system. *Cryobiology* 69.
- Wang, S., Yu, W.-M., Zhang, W., McCrae, K.R., Neel, B.G., and Qu, C.-K. (2009). Noonan Syndrome/Leukemia-associated Gain-of-function Mutations in SHP-2 Phosphatase (PTPN11) Enhance Cell Migration and Angiogenesis. *J. Biol. Chem.* 284, 913–920.
- Wehkamp, J., Stange, E.F., and Fellermann, K. (2009). Defensin-immunology in inflammatory bowel disease. *Gastroentérologie Clin. Biol.* 33, S137–S144.
- Wenzel, U.A., Magnusson, M.K., Rydström, A., Jonstrand, C., Hengst, J., Johansson, M.E.V., Velcich, A., Öhman, L., Strid, H., Sjövall, H., *et al.* (2014). Spontaneous colitis in Muc2-deficient mice reflects clinical and cellular features of active ulcerative colitis. *PloS One* 9, e100217.
- Westphalen, C.B., Asfaha, S., Hayakawa, Y., Takemoto, Y., Lukin, D.J., Nuber, A.H., Brandtner, A., Setlik, W., Remotti, H., Muley, A., *et al.* (2014). Long-lived intestinal tuft cells serve as colon cancer–initiating cells. *J. Clin. Invest.* 124, 1283–1295.
- Whitem, C.G., Williams, A.D., and Williams, C.S. (2010). Murine Colitis modeling using Dextran Sulfate Sodium (DSS). *J. Vis. Exp. JoVE*.
- Wielenga, V.J., Smits, R., Korinek, V., Smit, L., Kielman, M., Fodde, R., Clevers, H., and Pals, S.T. (1999). Expression of CD44 in Apc and Tcf mutant mice implies regulation by the WNT pathway. *Am. J. Pathol.* 154, 515–523.
- Xavier, R.J., and Podolsky, D.K. (2007). Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 448, 427–434.
- Xiang, D., Cheng, Z., Liu, H., Wang, X., Han, T., Sun, W., Li, X., Yang, W., Chen, C., Xia, M., *et al.* (2017). Shp2 promotes liver cancer stem cell expansion by augmenting β -catenin signaling and predicts chemotherapeutic response of patients. *Hepatol. Baltim. Md* 65, 1566–1580.
- Xie, H., Huang, S., Li, W., Zhao, H., Zhang, T., and Zhang, D. (2014). Upregulation of Src homology phosphotyrosyl phosphatase 2 (Shp2) expression in oral cancer and knockdown of Shp2 expression inhibit tumor cell viability and invasion in vitro. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.* 117, 234–242.
- Xu, D., and Qu, C.-K. (2008). Protein tyrosine phosphatases in the JAK/STAT pathway. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 13, 4925–4932.
- Xu, D., Liu, X., Yu, W.-M., Meyerson, H.J., Guo, C., Gerson, S.L., and Qu, C.-K. (2011). Non–lineage/stage-restricted effects of a gain-of-function mutation in tyrosine phosphatase Ptpn11 (Shp2) on malignant transformation of hematopoietic cells. *J. Exp. Med.* 208, 1977–1988.

- Yamaguchi, T., Kakefuda, R., Tajima, N., Sowa, Y., and Sakai, T. (2011). Antitumor activities of JTP-74057 (GSK1120212), a novel MEK1/2 inhibitor, on colorectal cancer cell lines in vitro and in vivo. *Int. J. Oncol.* *39*, 23–31.
- Yamashita, H., Kotani, T., Park, J.-H., Murata, Y., Okazawa, H., Ohnishi, H., Ku, Y., and Matozaki, T. (2014). Role of the protein tyrosine phosphatase Shp2 in homeostasis of the intestinal epithelium. *PLoS One* *9*, e92904.
- Yang, K., Popova, N.V., Yang, W.C., Lozonschi, I., Tadesse, S., Kent, S., Bancroft, L., Matisse, I., Cormier, R.T., Scherer, S.J., *et al.* (2008). Interaction of Muc2 and Apc on Wnt signaling and in intestinal tumorigenesis: potential role of chronic inflammation. *Cancer Res.* *68*, 7313–7322.
- Yang, Q., Bermingham, N.A., Finegold, M.J., and Zoghbi, H.Y. (2001). Requirement of Math1 for Secretory Cell Lineage Commitment in the Mouse Intestine. *Science* *294*, 2155–2158.
- Yordy, J.S., and Muise-Helmericks, R.C. (2000). Signal transduction and the Ets family of transcription factors. *Oncogene* *19*, 6503–6513.
- You, M., Yu, D.H., and Feng, G.S. (1999). Shp-2 tyrosine phosphatase functions as a negative regulator of the interferon-stimulated Jak/STAT pathway. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 2416–2424.
- Yu, D.H., Qu, C.K., Henegariu, O., Lu, X., and Feng, G.S. (1998). Protein-tyrosine phosphatase Shp-2 regulates cell spreading, migration, and focal adhesion. *J. Biol. Chem.* *273*, 21125–21131.
- Zhang, J., Zhang, F., and Niu, R. (2015). Functions of Shp2 in cancer. *J. Cell. Mol. Med.* *19*, 2075–2083.
- Zhang, K., Hornef, M.W., and Dupont, A. (2015). The intestinal epithelium as guardian of gut barrier integrity. *Cell. Microbiol.* *17*, 1561–1569.
- Zhang, Q., Zhao, R., Fan, C., Wang, X., Xu, Y., Liu, Y., and Wang, S. (2018). The gain-of-function mutation E76K in SHP2 promotes CAC tumorigenesis and induces EMT via the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Mol. Carcinog.*
- Zhang, S., Hwaiz, R., Luo, L., Herwald, H., and Thorlacius, H. (2015). STAT3-dependent CXC chemokine formation and neutrophil migration in streptococcal M1 protein-induced acute lung inflammation. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* *308*, L1159–1167.
- Zhang, S.Q., Tsiaras, W.G., Araki, T., Wen, G., Minichiello, L., Klein, R., and Neel, B.G. (2002). Receptor-specific regulation of phosphatidylinositol 3'-kinase activation by the protein tyrosine phosphatase Shp2. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 4062–4072.
- Zhang, S.Q., Yang, W., Kontaridis, M.I., Bivona, T.G., Wen, G., Araki, T., Luo, J., Thompson, J.A., Schraven, B.L., Philips, M.R., *et al.* (2004). Shp2 regulates SRC family

kinase activity and Ras/Erk activation by controlling Csk recruitment. *Mol. Cell* *13*, 341–355.

- Zhao, X., and Guan, J.-L. (2011). Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *63*, 610–615.
- Zheng, Y., Valdez, P.A., Danilenko, D.M., Hu, Y., Sa, S.M., Gong, Q., Abbas, A.R., Modrusan, Z., Ghilardi, N., de Sauvage, F.J., *et al.* (2008). Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat. Med.* *14*, 282–289.
- Zhou, X.-D., and Agazie, Y.M. (2008). Inhibition of SHP2 leads to mesenchymal to epithelial transition in breast cancer cells. *Cell Death Differ.* *15*, 988–996.
- Stages of colorectal cancer - Canadian Cancer Society. [EN LIGNE] <http://www.cancer.ca/en/cancer-information/cancer-type/colorectal/staging/?region=on>

VIII. ANNEXES

ANNEXE 1

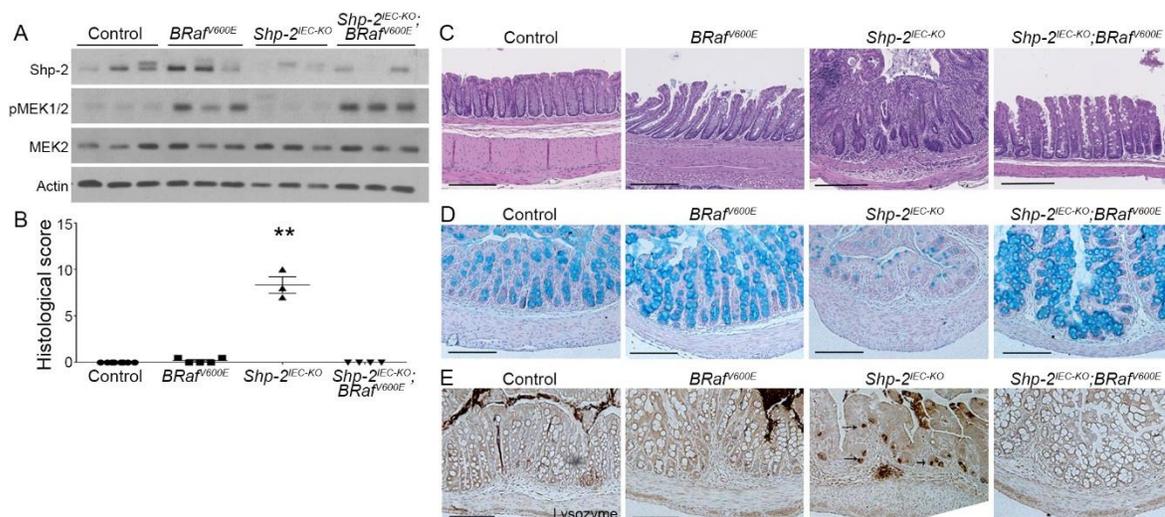


Figure annexe 1. L'activation de la voie Mek/Erk dans les souris *Shp-2^{CEI-KO}* inhibe le développement de la colite et restaure la différenciation des cellules sécrétrices.

Les souris *Shp-2^{CEI-KO}* ont été croisées avec des souris possédant un allèle codant une forme active de BRAF. (A) Des analyses en immunobuvardage démontrent que les souris *Braf^{V600E}* et les souris *Shp-2^{CEI-KO}; Braf^{V600E}* présentent une augmentation de la phosphorylation de Mek1/2 (S217/S221) en comparaison aux souris contrôles, tandis que les souris *Shp-2^{CEI-KO}* présentent une diminution de cette phosphorylation. (B) Des analyses effectuées suite à une coloration hématoxyline et éosine sur des tissus de côlon (C) ont permis de démontrer que les souris *Shp-2^{CEI-KO}* développent d'importants signes histologiques de la colite en comparaison aux souris contrôles, *Braf^{V600E}* et *Shp-2^{CEI-KO}; Braf^{V600E}*. Le score histologique évalue la présence d'érosion de la muqueuse, l'infiltration de cellules immunitaires, l'épaississement de la musculature, la diminution du nombre de cellules caliciformes et la présence d'abcès de cryptes. (D) Une coloration à l'Alcian bleu est utilisée pour visualiser les cellules caliciformes dans le côlon. L'activation constitutive de BRAF induit une augmentation des cellules caliciformes et ce malgré la baisse d'expression de Shp-2. (E) Des marquages en immunohistochimie contre le lysozyme permet de voir la métaplasie des cellules de Paneth dans le côlon proximal des souris *Shp-2^{CEI-KO}* en comparaison aux souris contrôles, *Braf^{V600E}* et *Shp-2^{CEI-KO}; Braf^{V600E}*.

Figure tirée de Gagné-Sansfaçon J, Langlois A, Coulombe G, Langlois MJ, Tremblay S, Vaillancourt-Lavigueur V, Qu CK, Menendez A and Rivard N. SHP-2 tyrosine phosphatase confers resistance to mucosal erosion and colitis by driving intestinal epithelial regeneration through ERK activation, En révision dans Journal of Pathology, (#18-252), Mars 2018.