



HAL
open science

RÉPONSE À LA CHIMIOTHÉRAPIE ET PROGRESSION DU CYCLE CELLULAIRE : RÔLE DE L'ONCOGÈNE STAT3 DANS LE CANCER COLORECTAL

Hélène Sellier

► **To cite this version:**

Hélène Sellier. RÉPONSE À LA CHIMIOTHÉRAPIE ET PROGRESSION DU CYCLE CELLULAIRE : RÔLE DE L'ONCOGÈNE STAT3 DANS LE CANCER COLORECTAL. Biologie cellulaire. Université d'Angers, 2011. Français. NNT : . tel-00979247

HAL Id: tel-00979247

<https://theses.hal.science/tel-00979247>

Submitted on 15 Apr 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**RÉPONSE À LA CHIMIOTHÉRAPIE ET PROGRESSION DU CYCLE CELLULAIRE :
RÔLE DE L'ONCOGÈNE STAT3 DANS LE CANCER COLORECTAL**

THÈSE DE DOCTORAT

SPÉCIALITÉ : Biologie Cellulaire

Ecole Doctorale Biologie Santé NANTES-ANGERS

Présentée et soutenue publiquement

le 9 novembre 2011

à ANGERS

par **Hélène Sellier**

Devant le jury ci-dessous :

Isabelle Dusanter-Fourt, rapporteur, Directrice de Recherche, INSERM, Paris

Sylvie Gazzeri, rapporteur, Directrice de Recherche, INSERM, Grenoble

Yves Delneste, examinateur, Directeur de Recherche, INSERM, Angers

Claude Prigent, examinateur, Directeur de Recherche, CNRS, Rennes

Olivier Coqueret, Directeur de thèse, Professeur des Universités, Angers

Directeur de Thèse : Pr Olivier Coqueret

INSERM U892

Institut de Cancérologie de l'Ouest, Paul Papin

2 rue Moll

49 933 ANGERS Cedex 09

REMERCIEMENTS



Pour commencer, je tiens à remercier le Professeur Olivier Coqueret de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et m'avoir permis de réaliser cette étude.

Je remercie le Professeur François Régis Bataille, directeur de l'Institut de Cancérologie de l'Ouest où j'ai pu réaliser ces travaux.

Je tiens à remercier les Docteurs Sylvie Gazzeri et Isabelle Dusanter-Fourt d'avoir accepté, en tant que rapporteurs, de consacrer une partie de leur temps à examiner ce travail.

Je remercie également le Docteur Claude Prigent d'avoir accepté de faire partie de ce jury et d'examiner cette thèse.

Merci au Docteur Yves Delneste d'avoir accepté de siéger à ce jury et d'avoir bien voulu examiner cette thèse.

Mes plus sincères et respectueux remerciements vont à mon directeur de thèse, le Professeur Olivier Coqueret, pour m'avoir accueillie dans son équipe et pour m'avoir fait confiance. Je le remercie de m'avoir guidée tout au long de ce travail et d'avoir été aussi disponible. Je crois savoir que ses cours donnés à l'université d'Angers ont été le moteur de nombreuses vocations, dont la mienne. Merci de m'avoir donné l'opportunité de partir à Montréal faire du ChIP on chip et de participer à différents congrès comme celui de Cold Spring Harbor, NY. Merci de m'avoir prouvé que nous pouvons toujours dépasser nos limites.

Mes remerciements s'adressent également au Docteur Catherine Guette. Comme disait Sophie «Les biologistes étant parfois de piètres chimistes», ses conseils nous sont souvent bien utiles. Merci à elle pour son écoute et sa grande sympathie.

Un grand merci au Docteur Benjamin Barré pour sa grande écoute, sa disponibilité et sa bonne humeur quotidienne. Merci pour toutes ces idées et ces heures passées à émettre des hypothèses de travail ou analyser des résultats. Merci pour son grand optimisme, il trouve toujours quelque chose d'intéressant dans une manip ratée.

Merci également au Professeur Alain Morel et au Docteur Michèle Boisdron pour ce qu'ils m'ont apporté au cours de ces trois années de thèse.

Je remercie le Docteur Agnès Chassevent ainsi que Cécile et Denise pour leur disponibilité et leur sympathie.

Je remercie le Docteur Isabelle Valo pour sa disponibilité et sa gentillesse.

Je tiens à remercier le Docteur Alain Nepveu de l'Université de McGill à Montréal pour nous avoir accueillis dans son laboratoire ainsi que Charles Vadnais pour son aide dans la réalisation du ChIP on chip.

Je remercie aussi Daniel Henrion pour l'utilisation du microscope confocal et Antoine pour sa patience dans l'explication du logiciel. Bon courage pour ta thèse.

Merci également à l'ensemble de l'équipe 15, nos collègues angevins de l'U892, pour nous avoir toujours dépanné sur quoi que ce soit.

J'adresse également mes remerciements aux anciens thésards avec qui j'ai commencé ma thèse. Merci à Julia, mon maître Jedi, pour m'avoir accompagné dans mes premiers pas au laboratoire. Merci à Sory, le statisticien du bureau. Merci à Andreea et son «bouquin de la jungle».

Merci au groupe Emilie, Sandy, Marie-Laure et Laurent pour les cosmo du vendredi soir détente durant lesquels on refaisait le monde. Merci à Sophie, pour tous ses précieux conseils sur la fin de thèse, merci également pour l'été dernier à la Cale.

Je tiens à remercier Amélie pour ses encouragements et son soutien. Son parcours, sans faute, est un modèle pour tous.

Merci aux Petits, les nouveaux thésards. Merci à Damien, la relève en protéomique, pour sa touche masculine dans le labo et le bureau mais aussi pour sa tranquillité et son écoute. Merci à Audrey, ma voisine de bureau et ma future collègue de NF- κ B2, pour sa bonne humeur et ses fous rires partagés. Merci à Barbara, pour sa douceur et sa gentillesse.

Merci à ChaCha, pour son dynamisme, sa gentillesse et son écoute. Merci à Laurence, ma nouvelle voisine (même si on n'est encore jamais croisé). Merci à Zaza, pour être toujours là pour nous écouter, nous secouer mais aussi nous rassurer. Mais comment les nouveaux thésards vont faire sans toi ? Bon courage chez les «végétaux».

Merci à la famille Boissard Nico, Alice et Timothé. Merci à Nico pour avoir réparé ma voiture sur le parking du CPP, merci à Alice, petit bout de femme dynamique et toujours à l'écoute. Merci pour ce très beau mariage cet été.

Merci à toute l'équipe de Pharmaco, Marie-Claire, Luc, Adélaïde, Vincent, Audrey, Julie, Sabrina et Catherine. Merci pour leur bonne humeur et leur gentillesse au quotidien. Merci pour les pauses-café et les nombreuses parties de rigolades. Je garderais un excellent souvenir de ces années à travailler dans un même laboratoire.

Merci aux anciens, aux nouveaux ou à ceux de passage. Merci aux petits nouveaux Alexandra et Julien, merci aux Docteurs Paule, Aude-Hélène, Souhil et Caroline pour leurs petites touches de médecin qu'ils ont apportés au labo. Je remercie particulièrement Aude-Hélène pour ses explications précises sur l'histologie du cancer colorectal. Merci à Jérôme qui m'a laissé l'appeler Marc-Antoine pendant 2 ans sans jamais me contrarier.

Merci à Gaëlle pour ces soirées détente aqua-jogging, ciné et resto.

Merci à Julien, pour avoir partagé avec moi les cours de l'école doctorale. Bon courage pour cette dernière année.

Et surtout Merci à Anne-So pour ses longues heures hebdomadaires passées au téléphone. Merci d'avoir toujours été là dans les bons comme les mauvais moments. Les week-ends Angevins, Rennais et Malouins vont beaucoup me manquer, mais je t'attends à Newcastle. Bon courage pour cette nouvelle année en tant qu'ATER.

J'aimerais dire un grand merci à ChaCha et Audrey pour leurs soutiens et leurs encouragements dans ces derniers mois. Merci pour toutes les soirées au James en terrasse ou à l'intérieur pour voir les matchs de Rugby.

Enfin, je souhaiterais remercier ma famille.

Un grand merci à ma Maman pour son soutien tant financier que moral. Elle m'a écouté attentivement parler, pendant des heures, de manips, de résultats et d'hypothèses sans jamais m'interrompre et me dire qu'elle ne comprenait rien. Merci de m'avoir nourri, logé et blanchi pendant ces quatre derniers mois avant mon grand départ.

Merci à mon Papa et Sylvia pour leur soutien principalement téléphonique. Merci pour toute leur aide pour préparer mon départ pour l'Angleterre. J'espère que nous pourrons plus souvent nous voir, puisque la Manche ne nous séparera plus.

Merci à ma grande soeur Mathilde pour être toujours présente quoi qu'il arrive, même pour écraser les araignées ! Ces derniers mois de colocation ont été super ! Ca m'a rappelé notre enfance. Je te souhaite de réussir dans ton nouveau projet. Les vétérinaires auront bien de la chance de t'avoir à leur côté.

Merci à ma petite soeur Emilie et son fabuleux Christopher, ou devrais-je dire Maître Sellier et Maître Silly. Félicitations pour ce très beau parcours qu'ils ont effectué ensemble. Merci d'avoir toujours été présents dans les très bons comme dans les moins bons moments. Merci d'avoir été mes gardes-malades pendant plusieurs jours après une chute inoubliable !

TABLE DES MATIÈRES

Abréviations

Contexte Scientifique

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1. A la découverte des STATs

I. Caractérisation du complexe ISGF-3	17
II. Les protéines du complexe ISGF-3 deviennent les protéines STATs	20
III. Conservation, localisation et structure des STATs	21
Les STATs dans les organismes modèles	21
Localisation chromosomique des STATs chez les mammifères	23
Structure et domaines fonctionnels des STATs	24
<i>Le domaine Coiled-coil</i>	25
<i>Le domaine de liaison à l'ADN et la séquence reconnue par les STATs</i>	26
<i>Le domaine SH2</i>	27
<i>Le domaine de transactivation (TAD)</i>	28
IV. Voie de signalisation des STATs	29
Mécanisme d'activation des STATs	29
Mécanismes de régulation des STATs	30
<i>L'import/export des STATs</i>	30
<i>L'inactivation des STATs</i>	31
<i>L'ubiquitination</i>	32
<i>La sumoylation</i>	33

2. Généralités sur le facteur de transcription STAT3

I. Les domaines importants de STAT3	36
II. Les deux isoformes de STAT3	37
STAT3 α et STAT3 β , découverte et structure	37
STAT3 β , rôle de dominant négatif ou facteur de transcription ?	38
III. Les mutations de STAT3	40
IV. L'activation de STAT3	41
La phosphorylation conventionnelle de STAT3 sur la tyrosine 705	41
Les autres modifications post-traductionnelles de STAT3	44
<i>La phosphorylation du résidu sérine 727 augmente l'activité transcriptionnelle de STAT3</i>	44
<i>L'acétylation de STAT3 est nécessaire à sa liaison à l'ADN et à son activité transcriptionnelle</i>	47
<i>STAT3 est méthylé lorsqu'il est lié au promoteur de ses gènes cibles</i>	48
<i>L'ubiquitination et la dégradation de STAT3</i>	49
<i>La forme non phosphorylée de STAT3 possède un rôle important dans la cellule</i>	50
Recrutement des coactivateurs de STAT3 nécessaires à son activité transcriptionnelle	52

3. Implication de STAT3 dans la transformation cellulaire

I. STAT3 et cancer	56
STAT3 est retrouvé constitutivement actif dans de nombreuses tumeurs	56
Plusieurs voies d'activation de STAT3 sont responsables de sa phosphorylation constitutive	57
<i>L'activation de STAT3 par les récepteurs de facteurs de croissance dans les cellules tumorales.</i>	57
<i>Activation par l'oncogène v-src</i>	58
<i>Dérégulation des composants de la voie JAK/STAT3 dans les cellules tumorales</i>	59

II. STAT3 et la transformation cellulaire	60
STAT3 active des gènes permettant la prolifération cellulaire	60
STAT3 et l'angiogenèse	62
STAT3 et son implication dans la longueur des télomères	62
STAT3 et la migration, formation des métastases	63
STAT3 et la survie cellulaire	64
<i>Les protéines de la familles Bcl-2</i>	64
<i>STAT3 régule des protéines de la famille Bcl-2</i>	66
<i>STAT3 régule deux protéines de survie de la famille LAP</i>	67
<i>STAT3 inactive des gènes apoptotiques pour favoriser la prolifération cellulaire</i>	69
Les Fonctions de STAT3 dans la mitochondrie	70

RÉSULTATS

1. La kinase Cdk5 régule le facteur de transcription STAT3 pour empêcher les dommages de l'ADN induits par une inhibition des topoisomères I	
I. Une inhibition des topoisomères de type I induit la phosphorylation de STAT3 sur son résidu Sérine 727	78
II. L'expression de la kinase Cdk5 est augmentée à la suite d'une inhibition des topoisomères I.	81
III. La kinase Cdk5 interagit avec STAT3 et le phosphoryle sur la sérine 727 à la suite d'une inhibition des topoisomères I.	83
IV. La kinase Cdk5 régule l'activation des gènes cible de STAT3 en réponse à une inhibition des topoisomères de type I.	86
V. STAT3 se fixe sur le promoteur de Eme1 lorsqu'il est phosphorylé sur la sérine 727 mais pas sur la tyrosine 705.	91
VI. Conclusion : La kinase Cdk5 régule le facteur de transcription STAT3 pour empêcher les dommages de l'ADN à la suite d'une inhibition des topoisomères I.	95
2. Le facteur de transcription STAT3 est activé pendant la phase G2 du cycle cellulaire pour réguler l'expression des gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire	
I. STAT3 est phosphorylé sur son résidu sérine 727 pendant les stades précoces du cancer colorectal.	111
II. STAT3 est phosphorylé sur son résidu sérine 727 pendant la phase G2 du cycle cellulaire.	113
III. STAT3 est phosphorylé sur son résidu sérine 727 par la kinase Cdk1	115
IV. STAT3 régule l'expression de gènes impliqués dans la progression de la phase S vers la mitose	116
V. STAT3 est important pour la progression de la phase S vers la mitose.	123
VI. Conclusion : STAT3 est activé pendant la phase G2 du cycle cellulaire pour réguler l'expression des gènes impliqués dans la progression vers la mitose	127

3. Le facteur de transcription STAT3 est principalement phosphorylé sur son résidu sérine 727 durant le stade précoce de dysplasie du cancer colorectal.

I. Introduction	147
II. STAT3 est principalement phosphorylé sur son résidu sérine 727 à un stade précoce du cancer colorectal	148

DISCUSSION

1. La kinase Cdk5 régule STAT3 pour empêcher les dommages de l'ADN induits par une inhibition des topoisomérases I.	165
I. Aucune phosphorylation du résidu tyrosine 705 n'a été détectée	165
II. La kinase Cdk5 est-elle la seule kinase qui phosphoryle STAT3 sur son résidu sérine 727 en réponse aux dommages de l'ADN ?	166
2. STAT3 est activé pendant la phase G2 du cycle cellulaire afin de réguler l'expression des gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire.	169
3. STAT3 est principalement phosphorylé sur son résidu sérine durant le stade précoce de dysplasie du cancer colorectal.	177

CONCLUSION GÉNÉRALE

BIBLIOGRAPHIE

ABRÉVIATIONS



Abréviations

AAF	IFN α Activation Factor	EGF	Epidermal Growth Factor
ADN	Acide DéoxyriboNucléique	EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
AMP	Adénosine MonoPhosphate	ELISA	enzyme linked immunosorbant assay
AP-1	activator protein 1	EMT	Epithelial-mesenchymal transition
APAF-1	Apoptotic Peptidase Activating Factor 1	EPO	Erythropoïétine
APC	adenomatosis polyposis coli	ERK	Extracellular signal Related Kinase
APRE	Acute-phase response element	Fap	Fibroblast activation protein
ARA160	Androgen Recepteur-coActivator 160kDa	FasL	Fas ligand
ARN	Acide RiboNucléique	FGF	Fibroblast Growth Factor
ARNm	Acide RiboNucléique messenger	FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
ATM	Ataxia-Telangiectasia Mutated	FLAP	Fluorescence Localization After Photobleaching
ATP	Adénosine 5'-TriPhosphate	G-CSF	granulocyte colony stimulating factor
ATR	ATM and RAD23-related	Gab	Grb2 Associated Binder
BAD	Bcl-2 Antagonist of cell Death	GAF	IFN γ Activation Factor
Bcl-2	B-cell leukemia protein-2	GAS	IFN γ Activation Site
Bcl-XL	B-cell lymphoma-extra large	GBP	Guanylate-Binding Protein
BIK	Bcl-2 Interacting Killer	GFP	Green Fluorescent Protein
BIM	Bcl-2 Interacting Mediator of cell Death	GM-CSF	Granulocyte Macrophage-Colony Stimulated Factor
BOK	Bcl-2 related ovarian killer	GMP	Guanylate MonoPhosphate
BOO	Bcl-2 homologue of ovary	gp130	glycoprotein 130
cAR1	Adénosine MonoPhosphate Receptor 1	Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
CBP	CREB Binding Protein	GRIM	Gene associated with Retinoid-IFN-induced Mortality 19
CD	cluster designation	H2O2	peroxyde d'hydrogène
Cdc	cell division cycle	HAT	Histone acetylTransferase
CDCA	Cell division cycle-associated protein	HB-EGF	Heparin-binding EGF
CDK	Cyclin Dependant Kinase	HDAC	Histone deacetylase
CHD	Chromodomain helicase/ATPase DNA binding protein	HDMEC	Human Dermal Microvascular Endothelial
ChIP	Chromatin ImmunoPrecipitation	HGFR	Hepatocyte Growth Factor Receptor
CIS	Cytokine Inducible SH2 domain containing protein	HNSCC	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma
cM	centimorgan	HR	Homologous Recombinaison
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité	Hsp70	Heat shock Protein 70
CNTF	Ciliary NeuroTrophic Factor	hTERT	human TElomerase Reverse Transcriptase
Coch	Coagulation factor C homolog	IAP	Inhibitor of Apoptosis
COX	cyclooxygénase	ICAM	InterCellular Adhesion Molecule
CPC	Chromosomal Passenger Complex	IFN	Interféron
CRE	cAMP response element	IgE	Immunoglobuline E
Crip	Cysteine-rich intestinal protein	IGFR	Insulin-like Growth Factor Receptor
CRM1	Chromosome Region Maintenance 1	IHCA	Inflammatory hepatocellular adenomas
CSF	Colony-Stimulating Factor-1	IL	Interleukine
CTD	COOH Terminal Domain	INCENP	Inner centromere protein
DAG	DiAcylGlycerol	INO	Inositol
DdSTAT	Dictyostelium discoideum STAT		

Abréviations

IP	Immunoprécipitation	siRNA	small interfering RNA
IRF	Interferon Regulatory Factor	SMRT	Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid hormone
ISG	Interferon-Stimulated Genes	SOCS	Suppressor Of Cytokine Signaling
ISGF	Interferon-Stimulated Genes Factor	SSI	STAT-induced STAT-inhibitor
ISRE	Interferon-Stimulated Reponse Element	STA-1	Signal Transducer and transcriptional Activator
ISWI	Imitation of Switch	STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
JAB	JAK Binding protein	StIP1	STAT3 Interacting Protein 1
JAK	Janus Kinase	SUMO	Small Ubiquitin-related Modifier
JNK	Jun Kinase	SWI/SNF	Switch/Sucrose Non Fermenting
kDa	kiloDalton	TAD	TransActivation Domain
KO	KnockOut	Tc-PTP	T-cell Protein Tyrosine Phosphatase
LIF	Leukemia inhibitory factor	TGF	Transforming Growth Factor
LPS	Lipopolysaccharide	Th	T helper
LSD	Lysine-Specific Demethylase	TMF	TATA Element Modulatory
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase	TNF	Tumor Necrosis Factor
Mcl-1	Myeloid-Cell Leukemia sequence 1	TRADD	Tumor necrosis factor Receptor type 1 Associated Death Domain
MEF	Mouse Embryo Fibroblasts	Treg	T régulateur
MEKK1	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1	tsg-101	Tumor susceptibility gene 101
MGF	Mammary Gland Factor	Tyk2	Non-receptor tyrosine-protein kinase TYK2
MKK	MAPK kinase	Udp	Unpaired
Mmp1	Matrix metalloproteinase 1	UVB	ultraviolet B
NF-kB	Nuclear Factor-kappa B	VEGF	Vascular Epidermal Growth Factor
NHEJ	NonHomologous Ends Junctions	VEGFR	Vascular Epidermal Growth Factor Receptor
NK	Natural Killer	vps25	Vacuolar protein-sorting-associated protein 25
OSM	oncostatine M		
pb	paire de base		
PCR	Polymerase Chain Reaction		
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor		
PDGFR	Platelet Derived Growth Factor Receptor		
PG	prostaglandine		
PIAS	Protein Inhibitor of Activated STAT		
Pin1	peptidyl-prolyl cis/trans isomerase (PPIase)		
pIRE	palindromic IL-6/IFN γ Response Element		
PKC	Protein Kinase C		
PLK1	Polo-Like-Kinase 1		
pTyr	phospho Tyrosine		
PUMA	p53 Upregulated Modulator of Apoptosis		
Rb	RetinoBlastoma		
SA-B-Gal	Senescence-Associated-B-Galactosidase		
SBE	STAT Binding Element		
SH2	Src Homology 2		
SHP-2	SH2- domain containing PTP-2		

CONTEXTE SCIENTIFIQUE

~

Durant la tumorigenèse, les cellules modifient leur capacité à détecter puis à réparer les dommages de l'ADN ou encore à réguler la progression du cycle cellulaire et l'apoptose. En parallèle, ces cellules interviennent dans de nouveaux mécanismes tels que l'angiogenèse et la croissance invasive. L'étude du rôle des protéines STATs depuis deux décennies a permis de mettre en évidence que ces protéines contribuent à la tumorigenèse à travers leur implication dans la signalisation des facteurs de croissance, l'apoptose et l'angiogenèse.

Le but de ce travail a été d'étudier le rôle du facteur de transcription STAT3 dans des lignées tumorales colorectales en réponse à un traitement génotoxique mais également au cours du cycle cellulaire. Pour cela, il nous a semblé important de réaliser, dans un premier temps, une introduction générale portant sur la famille des facteurs de transcription STATs, et dans un deuxième temps d'aborder plus précisément les plus grands rôles de STAT3, mais sans pouvoir être exhaustif.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

~

Chapitre 1

A la découverte des STATs

I. Caractérisation du complexe ISGF-3

Pour savoir comment les facteurs de transcription STATs ont été découverts, il faut faire un saut dans le temps d'environ 20 ans. Il avait déjà été établi que des peptides spécifiques étaient capables de se fixer à leurs récepteurs présents à la surface de la cellule pour entraîner la transcription d'un groupe de gènes spécifiques. Ces peptides étaient l'Interféron, l'EGF et le PDGF. L'équipe de J.E. Darnell a ensuite identifié, dans les cellules humaines, des gènes dont la transcription était dépendante d'une stimulation à l'Interféron de type I ($IFN\alpha$ ou $IFN\beta$). Elle les a alors nommés les ISG (*Interferon-Stimulated Genes*). Ils ont remarqué qu'en réponse à l'IFN, l'activation transcriptionnelle de ces gènes passait par des protéines intermédiaires. En étudiant la séquence des promoteurs des ISGs en 5' par la méthode « Dnase I Footprinting », ils ont identifié un élément commun, appelé ISRE (Interferon-Stimulated Response Element), présent sur beaucoup de promoteurs des ISGs (Levy *et al.* 1988) correspondant à la séquence suivante : YAGTTTCAYTTYCC (chaque Y correspond à une base pyrimidique). Cependant, cette équipe a observé que cette séquence ISRE différait parfois de quelques bases d'un gène à l'autre, et que ces petites différences pouvaient jouer un rôle important dans la régulation de l'expression de ces gènes. Ils se sont alors demandés si cette séquence consensus ne permettait pas la fixation de différents facteurs de transcription. Afin de déterminer ces protéines, la séquence consensus ISRE, et ses formes mutantes ont été utilisées comme sondes, dans des extraits nucléaires de cellules traitées à l'IFN. Au moins trois complexes ADN-protéine ont été identifiés par gel retard. Le premier complexe (nommé ISGF-1, *Interferon-Stimulated Genes Factor-1*), le plus rapide, est observé même dans les cellules non traitées, tandis que les deux autres complexes, ISGF-2 et ISGF-3, sont observés seulement dans les extraits traités à l'IFN α . Le facteur ISGF-3, le plus lent, était fortement corrélé avec l'induction de la transcription des gènes (Bandyopadhyay *et al.* 1990). Il avait été montré, en parallèle, que ISGF-3 était considéré comme un activateur transcriptionnel des ISGs et que sa liaison sur le promoteur survenait aussitôt après un traitement à l'IFN. Des mutations de la séquence ISRE, réalisées par mutagenèse dirigée, ont montré que la fixation de cette protéine ISGF-3 sur le promoteur des ISGs était corrélée à l'expression de ces gènes (Figure 1). Il a alors été mis en évidence que ISGF-3 était présent dans le cytoplasme, sous forme latente, dans des cellules non traitées. Néanmoins, à la suite d'une stimulation à l'IFN α , une succession d'étapes permettait l'activation de ISGF-3. Cette modification, non définie à cette époque, entraînait une association avec un second polypeptide, permettant la translocation nucléaire de ce facteur (Levy *et al.* 1989).

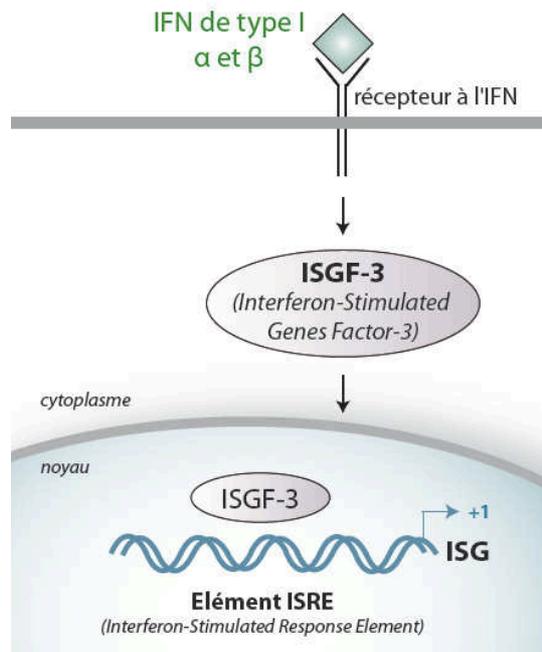


FIGURE 1 | Une stimulation de l'IFN de type I induit l'activation du facteur ISGF-3. Celui-ci se fixe alors sur le promoteur de ses gènes cibles, les ISG, au niveau d'une séquence spécifique ISRE.

Ces travaux ont donc montré que l'élément ISRE correspond à une séquence d'ADN reconnue par des protéines en réponse à une stimulation à l'IFN α et que ISGF-3 est considéré comme un facteur de transcription majeur dans l'activation des gènes en réponse à l'IFN α . Il avait été mis en évidence, en parallèle de ces recherches, que l'IFN γ était capable d'activer la transcription des gènes de réponse à l'IFN α , tout comme il pouvait inhiber la transcription des gènes répresseurs induits par l'IFN α . Il a alors été montré, dans les cellules HeLa, que ISGF-3 était le facteur de transcription majeur en réponse à l'IFN α , tandis que GAF (*IFN γ Activation Factor*) était le principal facteur de transcription, stimulé par l'IFN γ , capable de se fixer sur le promoteur de GBP (*Guanylate-Binding Protein*). Par conséquent ces deux facteurs étaient considérés comme les deux principaux facteurs gouvernant la réponse transcriptionnelle des deux types d'IFN. Pour mieux comprendre la conséquence d'une interaction entre les deux IFN de type α et γ sur l'activation des facteurs de transcription, des études ont été menées sur l'effet de l'IFN α sur le facteur GAF. Il a été remarqué que l'IFN α induisait rapidement l'activation de facteurs de transcription se fixant à des sites d'activation de l'IFN γ (nommé élément GAS, *IFN γ Activation Site*) et contenant des caractéristiques similaires à celles des facteurs GAF (Figure 2). Ces nouveaux facteurs, activés en réponse à l'IFN α ont donc été appelés AAF (*IFN α Activating Factor*).

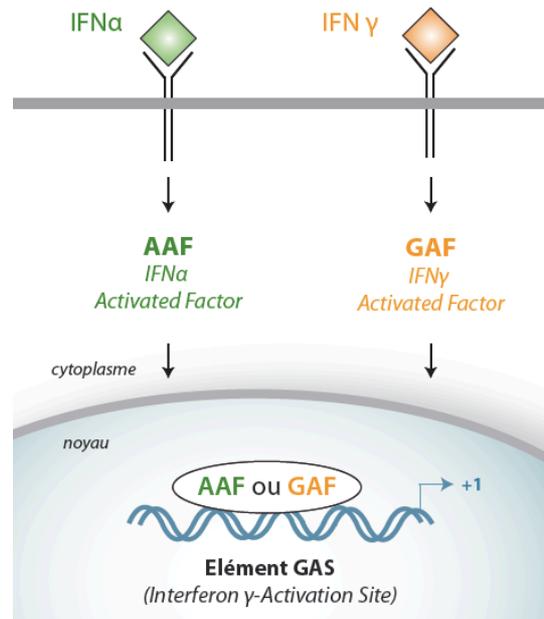


FIGURE 2 | Les IFN α et γ activent respectivement les facteurs AAF et GAF. Ces deux facteurs se fixent alors sur leurs gènes cibles en reconnaissant les éléments GAS.

L'utilisation de deux inhibiteurs de protéines kinases, H7 (inhibiteur de PKC, *Protein Kinase C*) et 2-aminopurine (inhibiteur de kinases dépendantes de l'ARN double brin), a permis de comprendre l'activation de AAF, GAF et ISGF-3. L'activation de ISGF-3 n'a pas été modifiée par ces deux inhibiteurs en réponse à l'IFN α , contrairement à GAF qui a été inhibé par les deux molécules et AAF qui a été bloqué seulement par 2-aminopurine. De cette manière, l'équipe de Darnell a montré que l'IFN α peut activer les facteurs de transcription par deux mécanismes distincts utilisant des kinases différentes, conduisant à l'activation soit de AAF soit de ISGF-3 (Decker *et al.* 1991).

A la suite de ces résultats, J.E. Darnell a souhaité étudier le facteur de transcription ISGF-3 dans les cellules HeLa. Ce facteur a été purifié, ses composants protéiques ont été séparés puis analysés par séquençage. Ces travaux ont montré que ISGF-3 est constitué de quatre protéines de 113, 84, 91 et 48 kDa. Il a été montré que les sous-unités de 113, 84 et 91 kDa sont régulièrement associées à la sous-unité de 48 kDa, capable de se lier à l'ADN, pour constituer l'ISGF-3 (Schindler *et al.* 1992).

En utilisant la staurosporine, inhibiteur des tyrosines kinases, ils ont observé une inhibition de la transcription dépendante de l'IFN α et un blocage de la formation de ISGF-3. Ils en ont déduit que la phosphorylation de la tyrosine était importante dans l'activation de ces protéines lors de la transcription médiée par l'IFN α . Ils ont ensuite remarqué que les sous-unités sont toutes les trois phosphorylées sur un résidu tyrosine immédiatement après une stimulation à l'IFN α . Cependant, la stimulation de l'IFN γ conduit à la phosphorylation de la protéine de 91 kDa

uniquement (Schindler *et al.* 1992). Il a donc été montré que la spécificité de réponse à l'IFN α ou à l'IFN γ résulte dans la différence de phosphorylation des résidus tyrosines des protéines de 113, 91 et 84 kDa. De plus, la protéine de 91 kDa peut fonctionner comme activateur transcriptionnel dans deux voies différentes. Dans les cellules traitées à l'IFN α , elle appartient au complexe ISGF-3 qui se fixe à l'ADN au niveau de la séquence ISRE. En parallèle, dans les cellules traitées à l'IFN γ , la protéine de 91 kDa phosphorylée sur un résidu tyrosine se lie à l'ADN, mais sur une région différente, au niveau de l'élément GAS (Shuai *et al.* 1992). La Figure 3 est extraite de la publication de J.E. Darnell et résume la voie de transduction du signal et l'activation transcriptionnelle dans les cellules HeLa traitées à l'IFN α ou IFN γ .

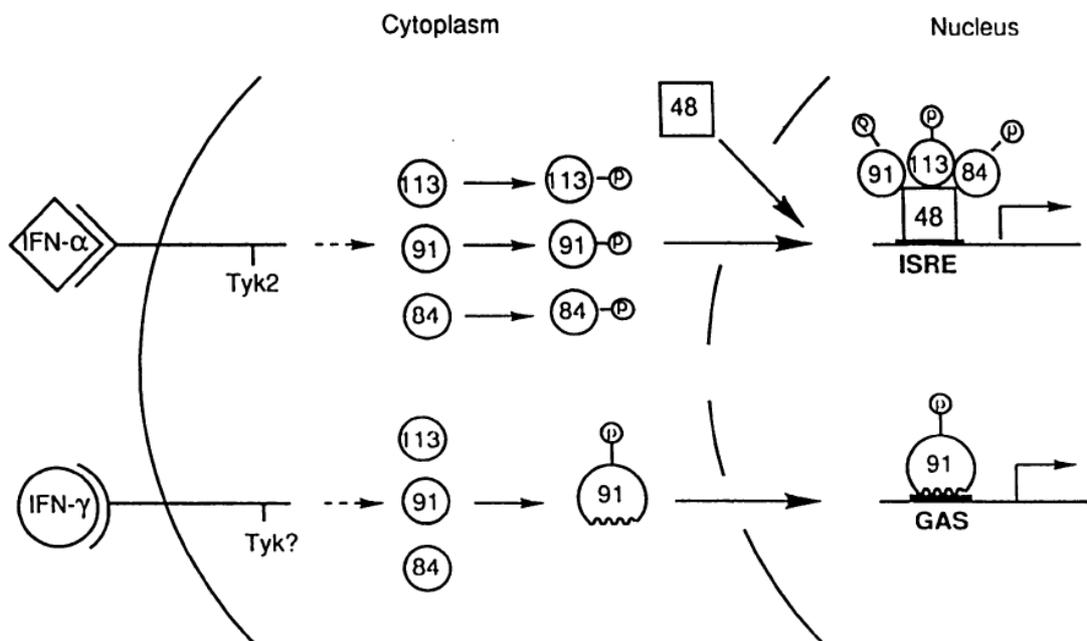


FIGURE 3 | Voie de transduction du signal et d'activation transcriptionnelle dans les cellules HeLa traitées à l'IFN α ou à l'IFN γ (Shuai, Schindler *et al.* 1992).

II. Les protéines du complexe ISGF-3 deviennent les protéines STATs

La phosphorylation de la tyrosine des protéines de 113, 91 et 84 kDa en réponse à une stimulation à l'IFN α , et la phosphorylation de la protéine de 91 kDa en réponse à l'IFN γ induit leur translocation dans le noyau où elles prennent part à l'activation de la transcription. J.E. Darnell a décidé de nommer ces protéines STAT signifiant transducteurs de signal et activateur de la transcription (*Signal Transducer and Activator of Transcription*), étant donné leurs rôles importants dans ces mécanismes.

Après la découverte de nouveaux membres de cette famille STAT en 1994, J.E. Darnell a suggéré de nommer ces protéines dans l'ordre de leur description (Zhong *et al.* 1994). Alors, STAT1 α et STAT1 β ont remplacé les protéines de 91 kDa et de 84 kDa et la protéine de 113 kDa est devenue STAT2. Puis les protéines STAT3, STAT4 (Zhong, Wen *et al.* 1994; Zhong *et al.* 1994), STAT5 (Gouilleux *et al.* 1994) et STAT6 (Hou *et al.* 1994) ont ensuite été caractérisées par différentes équipes.

III. Conservation, localisation et structure des STATs

A. Les STATs dans les organismes modèles

Des protéines se rapprochant des facteurs de transcription STATs ont été retrouvées chez les nématodes *Caenorhabditis elegans*, les amibes *Dictyostelium discoideum*, la mouche *Drosophila melanogaster*, et le poisson zèbre *Danio rerio*. Cependant, *Drosophila melanogaster* et *Danio rerio* sont les seuls organismes modèles dans lesquels les facteurs de transcription STATs sont responsables de la transduction du signal à travers une voie classique de signalisation JAK/STAT (Hou *et al.* 2002).

Dans *Dictyostelium discoideum*, quatre protéines STAT ont été identifiées : Dd-STATA, b, c et d, mais seulement trois d'entre elles, Dd-STATA, DdSTATb et DdSTATc ont été étudiées dans le détail. Contrairement à la plupart des isoformes des STATs chez les mammifères, ces facteurs de transcription ne contiennent pas de domaine d'activation transcriptionnelle en C-terminal et fonctionnent comme des répresseurs de la transcription. DdSTATA est activée par l'AMPc via son récepteur, cAR1 (*AMP receptor 1*). La protéine phosphatase PTP1 diminue la phosphorylation du résidu tyrosine de Dd-STATA et inhibe alors le programme de développement contrôlé par la protéine. DdSTATb joue un rôle important dans la croissance de *Dictyostelium*. Ce facteur de transcription est retrouvé constitutivement dimérisé, localisé dans le noyau et actif. De plus, une mutation du site de phosphorylation de la tyrosine en phénylalanine ne diminue pas ses fonctions biologiques. DdSTATc, quant à lui, est activé lors de la différenciation ou lors d'un stress. Il a été rapporté que DdSTATc est activé par une tyrosine kinase dépendante de GMPc (Sun and Kim 2011).

Les nématodes, comme *Caenorhabditis elegans*, contiennent un orthologue des STATs nommé STA-1 (*Signal Transducer and transcriptional Activator*) qui régule le développement larvaire de concert avec la voie du TGF β . Malgré un domaine N-terminal différent des STATs retrouvés chez les mammifères, STA-1 conserve les principales caractéristiques structurales et biochimiques comme

les sites spécifiques de phosphorylation sur le résidu tyrosine, la translocation nucléaire et la liaison à l'ADN sur des sites spécifiques. Des études ont suggéré que STA-1 était principalement exprimé dans le pharynx, l'intestin, les muscles et les cellules neuronales tout au long de la vie du nématode. Cependant, l'utilisation d'animaux déficients en STA-1 a démontré que ce facteur de transcription n'est pas indispensable à la viabilité des nématodes (Wang and Levy 2006).

Chez le poisson zèbre, plusieurs gènes STATs ont été identifiés : STAT1, STAT3 et STAT5. Contrairement aux mammifères, un seul homologue de STAT5 a été trouvé dans les espèces autres que les mammifères comme le poulet, le xénope et deux poissons téléostes. Cependant, de manière surprenante, il a été montré que le poisson zèbre, *Danio rerio*, possédait deux homologues distincts de STAT5 nommés STAT5.1 et STAT5.2. L'analyse génomique de ces deux copies a révélé que STAT5.1 et STAT5.2 sont localisés sur deux chromosomes différents (Lewis and Ward 2004). La plupart des domaines fonctionnels caractérisés ont été conservés entre les STATs du poisson zèbre et des mammifères, incluant le domaine d'oligomérisation en N-terminal, le domaine de liaison à l'ADN, le domaine SH2 ainsi que les sites de phosphorylation de la tyrosine et de la sérine (Oates *et al.* 1999). Par comparaison, STAT1 a un plus fort taux de changement au cours de l'évolution par rapport à STAT3. Néanmoins, le facteur STAT1 du poisson zèbre est capable de restaurer la signalisation de l'interféron dans des lignées cellulaires humaines déficientes en STAT1, indiquant que le mécanisme de signalisation des cytokines est conservé entre les tétrapodes et les mammifères (Oates *et al.* 1999).

L'organisme modèle le plus utilisé pour l'étude des facteurs de transcription de la famille des STATs est la drosophile, *Drosophila melanogaster*. STAT92E est le seul facteur de transcription de la famille STAT décrit. Au niveau de sa structure, il se rapproche le plus du STAT5 des mammifères avec 37% d'identité (Arbouzova and Zeidler 2006). De la même manière que les STATs des mammifères, STAT92E est constitué d'un site de phosphorylation sur la tyrosine 711 lui permettant de se fixer à l'ADN au niveau de séquences spécifiques et similaires aux STATs des mammifères. Compte tenu de ce degré de conservation inter-espèces, l'exploitation de ces qualités génétiques représente une approche particulièrement intéressante. En effet, la redondance des composants de la voie JAK/STAT existe à chaque niveau de la cascade de signalisation. Par contre la voie de STAT92E est une version plus simple par rapport aux mammifères. Seulement trois cytokines de type IL-6, Udp (*Unpaired*), Udp2 et Udp3, activent un récepteur de type gp130 nommé Dome (*Domeless*). Cette liaison conduit à l'activation de la seule kinase JAK Hop et du seul facteur de transcription STAT STAT92E. STAT92E activé régule l'expression de ses gènes cibles comme SOCS36E qui code pour un régulateur négatif de cette voie. Cette voie de signalisation de

STAT92E est impliquée dans différents aspects du développement de la drosophile comme le développement de l'embryon et des yeux mais également l'hématopoïèse larvaire. Une activation constitutive de cette voie conduit à un élargissement des yeux de 2 à 3 fois plus important par rapport à une voie de signalisation normale de STAT92E (Tsai and Sun 2004). De la même manière, une perte des gènes suppresseur de tumeur *tsg-101* et *vps25* conduit à une activation constitutive et excessive de la voie JAK/STAT et une croissance anormale et plus importante des yeux. Néanmoins, ce phénotype disparaît par suppression d'une copie de STAT92E. Par contre une perte totale de STAT92E durant le développement des yeux conduit à une ablation des yeux et une mort de l'animal avant l'âge adulte.

Même si les séquences sont similaires avec les STATs des mammifères, les caractéristiques fonctionnelles des différents domaines de STAT92E sont encore peu comprises et étudiées. Cependant, une étude a récemment été réalisée sur les rôles des domaines N- et C-terminal de STAT92E. Cette équipe a montré que l'acide aminé Tyr⁷¹¹ est indispensable pour son activité transcriptionnelle. En effet, la substitution de la Tyr⁷¹¹ en Phe abolit la capacité de STAT92E à se lier à l'ADN. En parallèle, ils ont remarqué que le résidu Arg⁴⁴² était également nécessaire à la liaison à l'ADN de STAT92E et qu'il pourrait être un élément de reconnaissance pour la séquence TTCnnnGAA lié par le facteur de transcription. Le résidu Arg⁴⁴² est conservé au cours de l'évolution, il est retrouvé dans le STAT de *C. elegans*, STA-1, et dans la majorité des STATs des mammifères, STAT2, 3, 5a, 5b et 6. Ils ont alors suggéré que le résidu Arg⁴⁴² pourrait être nécessaire à la fonction de facteur de transcription des protéines STATs (Ekas *et al.* 2010).

B. Localisation chromosomique des STATs chez les mammifères

Sept membres de la famille STAT ont été décrits dans les cellules de mammifères au cours des années 1990, STAT1-4, STAT5A, STAT5B et STAT6. Les gènes codant pour ces protéines sont localisés sur trois chromosomes différents : Chez la souris, STAT1 et STAT4 sont présents sur le chromosome 1, STAT2 et STAT6 sont retrouvés sur le chromosome 10, tandis que STAT3 et les deux formes de STAT5 sont tous les trois situés sur le chromosome 11 (Copeland *et al.* 1995). Chez l'homme, la répartition des STATs sur les chromosomes reste la même, cependant les chromosomes sont différents : STAT1 et STAT4 sont retrouvés dans la troisième région du bras long du chromosome 2, STAT2 et STAT6 sont présents dans la première région du bras long du chromosome 12, alors que STAT3 et STAT5 sont localisés sur le bras long du chromosome 17 mais au niveau de régions différentes : respectivement, deuxième et première région (Figure 4).

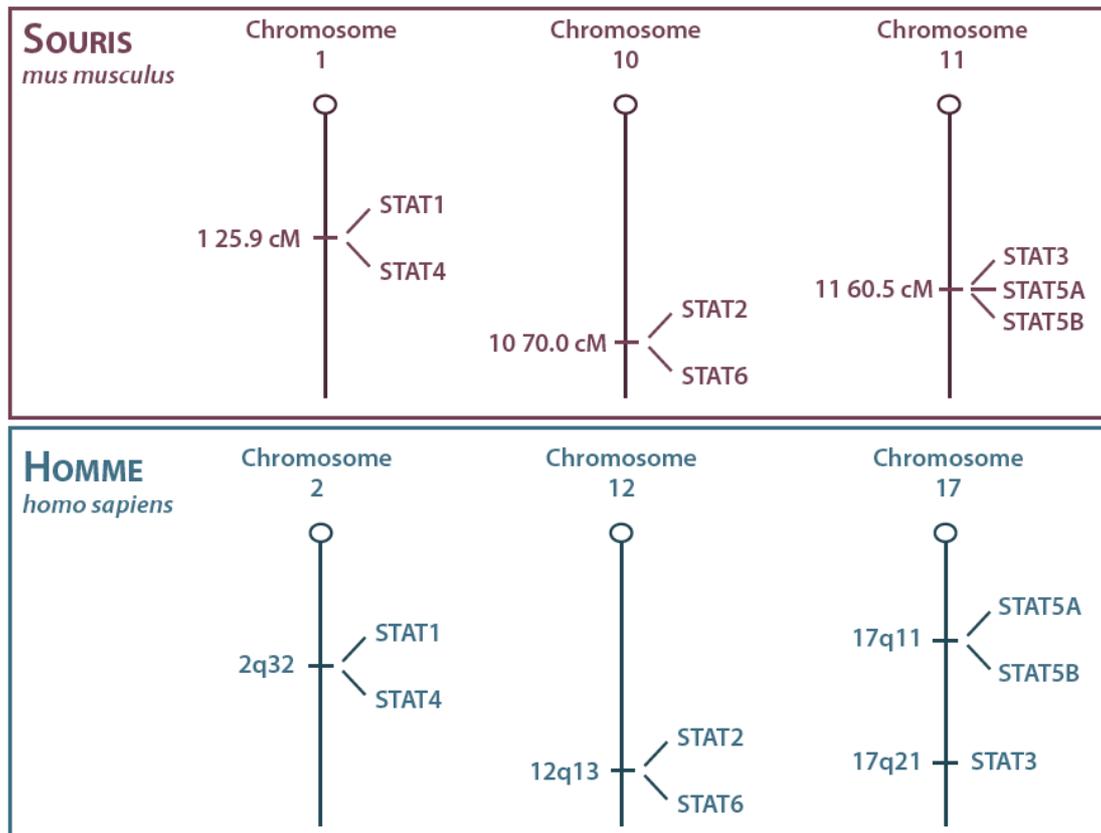


FIGURE 4| Les membres de la famille des facteurs de transcription STATs sont localisés sur trois chromosomes différents. La localisation des STATs est différente chez la souris (*mus musculus*) et chez l'homme (*homo sapiens*).

C. Structure et domaines fonctionnels des STATs

Comme expliqué précédemment, au cours de l'évolution, les protéines STATs ont conservés leurs différents domaines. Des fonctions liées soit à la transduction du signal soit à la régulation des gènes ont été assignées à la plupart des protéines STATs. Ces fonctions communes sont dues aux similarités de séquences retrouvées chez les différents membres de la famille STAT, comme le site de phosphorylation de la tyrosine nécessaire à l'activation et à la dimérisation, le domaine de liaison des résidus phospho-tyrosine (domaine SH2) nécessaire à la dimérisation, le domaine de liaison à l'ADN spécifique d'une séquence et enfin le domaine de transactivation C-terminal (Figure 5).

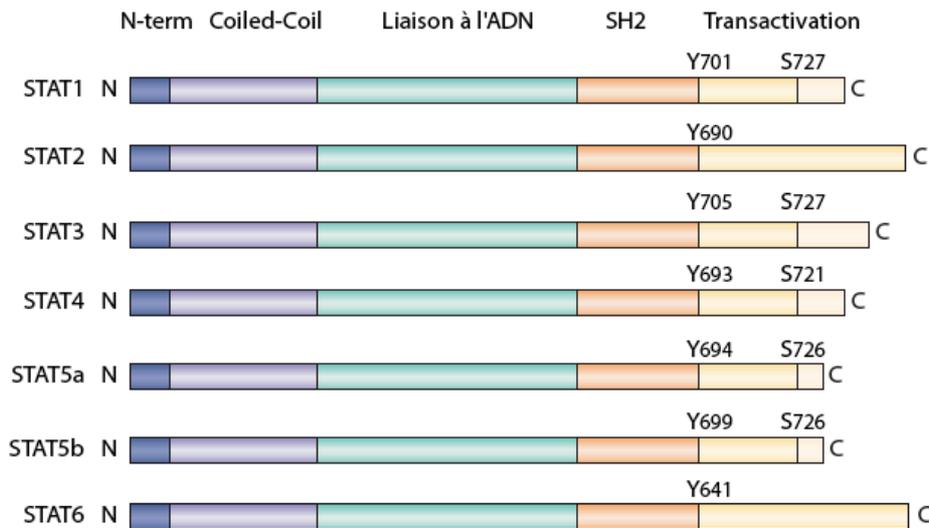


FIGURE 5 | Les protéines de la famille STAT. Les sept membres de la famille STAT présentent des similitudes dans leurs structures protéiques. Le domaine amino-terminal (N-term) permet l'interaction entre deux dimères de STAT pour former un tétramère. Le domaine Coiled-Coil est impliqué dans l'interaction avec des protéines régulatrices ou d'autres facteurs de transcription. Le domaine de liaison à l'ADN se fixe directement sur les promoteurs de gènes au niveau des sites de fixation de STAT reconnaissant une séquence consensus TT_(N₄₋₆)AA. La formation de dimères s'effectue par la reconnaissance par le domaine SH2 (Src Homology 2) d'une protéine STAT d'un résidu tyrosine phosphorylé d'une autre protéine STAT. Cette formation de dimères permet la liaison des STATs à l'ADN. Le domaine de transactivation est impliqué dans l'activation transcriptionnelle des gènes cibles des STATs via l'interaction avec d'autres protéines comme les histones acétyltransférases. Enfin le domaine carboxy-terminal (C) contient un site de phosphorylation sur un résidu sérine qui améliore l'activité transcriptionnelle de certaines protéines STAT.

1. Le domaine Coiled-coil

Le domaine coiled-coil est constitué de quatre hélices α . Il correspond à un domaine d'interaction avec d'autres protéines comme IRF-9/p48 pour STAT1 (Horvath *et al.* 1996). Plusieurs protéines, avec différents rôles, ont été montrées interagissant avec STAT3 au niveau de son domaine coiled-coil, en utilisant un criblage de double hybride réalisé chez la levure. Il a été montré que l'interaction avec c-Jun permet l'activation de la transcription du gène α 2-macroglobuline (Zhang *et al.* 1999), tandis que la protéine StIP1, *STAT3 Interacting Protein 1*, sert de lien entre STAT3 et JAKs. Une fois phosphorylé par les kinases JAKs, STAT3 se dissocie du complexe afin de se transloquer dans le noyau (Collum *et al.* 2000). Contrairement aux deux autres partenaires de STAT3, GRIM-19 a été identifié comme une protéine interagissant spécifiquement avec le facteur de transcription pour réguler négativement son expression (Lufei *et al.* 2003). Enfin, en utilisant la même technique, il a été montré que STAT5a et STAT5b peuvent interagir avec SMRT via le domaine coiled-coil afin de réprimer la transcription médiée par STAT5. SMRT est un corepresseur qui interagit avec des récepteurs nucléaires comme le récepteur de l'acide rétinoïque et le récepteur d'hormones thyroïdiennes. Ces résultats ont suggérés que SMRT module les fonctions

de STAT5 indépendamment de coactivateurs qui interagissent avec le domaine de transactivation. Le groupe de Ihle a alors proposé un nouveau concept expliquant que STAT5 peut être régulé par une balance de co-activateurs et de co-répresseurs (Nakajima *et al.* 2001).

2. Le domaine de liaison à l'ADN et la séquence reconnue par les STATs

Avant de détailler le domaine de liaison à l'ADN, il est important de comprendre comment les facteurs de transcription STATs sont capables de reconnaître et de fixer les séquences consensus des promoteurs de leurs gènes cibles. Comme il a été expliqué ci-dessus dans la partie caractérisation du complexe ISGF-3, les facteurs de transcription activés par l'IFN γ se lient à des séquences d'ADN spécifiques, les éléments GAS. Par la suite il a été montré que les différents facteurs STATs, étaient capables de se fixer sur des éléments d'ADN similaires, nommés SBE (*STAT Binding Elements*). Ces observations ont alors soulevé la question de savoir comment a lieu la spécificité de la liaison à l'ADN de différents gènes. Pour cela, l'équipe de J. Rosen, en collaboration avec J.E. Darnell, s'est intéressée à ces séquences SBE qui déterminent la spécificité transcriptionnelle des facteurs de transcription STATs (Seidel *et al.* 1995). Dans un premier temps, sachant que de nombreuses cytokines activaient différents gènes par l'intermédiaire des STATs, ils ont analysé les éléments GAS de ces différents gènes. Ils ont remarqué que les séquences SBE varient considérablement, néanmoins, une seule marque est fortement conservée et composée de la séquence TT séparée de son homologue en forme de palindrome, AA, par un coeur de 4 à 6 pb qui diffère d'un gène à l'autre : **TT-(N₄₋₆)-AA**. Ils ont alors voulu tester le milieu de cette séquence SBE dans la sélection des cytokines. Pour cela, ils ont conçu différentes séquences d'ADN contenant des motifs fixes (TT-AA) séparés par un nombre défini de paires de base, 4, 5 ou 6 pb. La capacité de ces éléments à se lier à des complexes STAT activés par différentes cytokines a été testée par gel retard. Ils ont alors montré qu'en fonction des cytokines, les STATs se fixent sur des séquences avec un coeur de 4, 5 ou 6 pb, mais les extrémités TT-AA restent toujours les mêmes. Par conséquent, la spécificité de la transcription dirigée par les STATs, en réponse à différentes cytokines, dépend en partie de l'espace et de la séquence au coeur d'un élément de réponse conservé.

Les séquences consensus sont donc reconnues et fixées par les STATs permettant la régulation de leurs gènes cibles. Pour la reconnaissance de cet élément SBE, les STATs contiennent un domaine de liaison à l'ADN. Il s'agit d'un domaine localisé dans le centre de la protéine, approximativement entre les résidus 350 et 500. La séquence du domaine de liaison à l'ADN de chaque membre de la famille STAT a été clonée puis comparée par informatique. Cet alignement a permis de montrer deux séquences consensus retrouvées dans les 7 membres : la séquence VTEEL

et la séquence SLPVVVISN. Ces deux séquences sont présentées dans la figure 6 après avoir effectué un alignement de séquences à partir des 7 STATs.

```

1 403 AEFRLQLKE QKN-AGTRTN-EGPLIVTEE LHSLSFETQLCQPG--LVID LETTSLPVVV ISNVSQLPSP WASILWYNML VAEPRNLSFF 488
2 399 WDFGYLTLVE QRSGGSGKGSNKGPLGVTEE LHIISFTVKYTYQG--LKQE LKTDLPVVI ISNMNQLSIA WASVLWFNLL SPNLQNOQFF 486
3 407 AEFKHLTLRE QRCGNGGRANDASLIVTEE LHLITFETEVYHQG--LKID LETHSLPVVV ISNICQMPNA WASILWYNML TNNPKNVNFF 494
4 398 VEFRLQPKK MKSSAGGKGN-EGCHMVTEE LHSITFETQICLYG--LTIQ LETSPLPVVV ISNVSQLPNA WASIIWYNVS TNDSONLVFF 484
5A 414 AHFRNMSLKR IK-----RADRRGAESVTEE KFTVLFESQFSVGSNELVFQ VKTTLSPVVV IVHGSQDHNA TATVLWDNAF AEPGR--VPF 496
5B 414 AHFRNMSLKR IK-----RSDRRGAESVTEE KFTILFESQFSVGGNELVFQ VKTTLSPVVV IVHGSQDNNA TATVLWDNAF AEPGR--VPF 496
6 358 ALFKNLLKK IK-----RCERKGTESVTEE KCAVLFASFTLGPGLPIQ LQALSPLVIV IVHGNQDNNA KATILWDNAF SEMDR--VPF 440

```

FIGURE 6 | Alignement de séquences des membres de la famille STAT. Une partie de la séquence du domaine de liaison à l'ADN est alignée par rapport aux sept membres de la famille STAT (*Constraint-based Multiple Alignment Tool*, NCBI)

Horvath *et al* ont alors voulu savoir si ces deux séquences consensus étaient essentielles à la fixation des facteurs STATs sur le promoteur (Horvath *et al.* 1995). Pour cela, ils ont réalisé deux mutations dans les régions conservées de STAT3 entre -400 et -500. La séquence VTEEL a été changée en VTAAL (substitution EE→AA), tandis que la séquence SLPVVVISN est mutée en SLPAAAISN (substitution de VVV→AAA). Chaque protéine mutante a ensuite été transfectée dans les cellules COS-1 (cellules dans lesquelles STAT3 est faiblement exprimé). Après une activation à l'EGF, par gel retard, ils ont observé qu'aucun des deux mutants de STAT3 n'est capable de se lier à l'ADN. Ils ont ensuite voulu vérifier si ces substitutions bloquent l'activation du facteur de transcription ou sa dimérisation. En réalisant un western blot avec un anticorps dirigé contre la phosphorylation de la tyrosine de STAT3, ils ont observé que les mutants ne changent pas l'activation du facteur de transcription. En parallèle, avant leurs transfections dans les cellules COS-1 stimulées à l'EGF, les mutants sont étiquetés avec un FLAG afin de les distinguer des STAT3 endogènes. Etant donné que STAT1 forme un hétérodimère avec STAT3, ils ont ensuite coimmunoprécipité les mutants à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'étiquette FLAG puis réalisé un western blot dirigé contre STAT1. Ils ont alors observé que le taux d'expression de STAT1 n'est pas modifié lorsque les cellules sont transfectées avec les mutants. De cette manière, l'équipe de Darnell a mis en évidence que la séquence conservée du domaine de liaison à l'ADN est nécessaire à la liaison du facteur de transcription sur le promoteur de ses gènes cibles sans intervenir dans l'activation des STATs ni dans la dimérisation.

3. Le domaine SH2

Le domaine le plus conservé est le domaine de liaison des résidus phospho-tyrosines ou domaine SH2 (*Src Homology Domain*). L'utilisation de mutations d'acides aminés au niveau du domaine SH2 des protéines c-src ou de Abl a permis de mettre en évidence qu'il est nécessaire à la fixation du résidu phospho-tyrosine. En effet une mutation du résidu Arginine en lysine, résidu qui

reconnait la phospho-tyrosine, diminue la capacité du domaine SH2 à lier les résidus phospho-tyrosines (Mayer *et al.* 1992; Waksman *et al.* 1992). Les principales études concernant ce domaine ont été réalisées en réponse à l'IFN- γ impliquant STAT1. Il a été montré que le domaine SH2 de STAT1 jouait un rôle central dans la reconnaissance du récepteur, plusieurs équipes ont observé une interaction entre le domaine SH2 de STAT1 et le résidu tyrosine 440 du récepteur à l'IFN- γ (Greenlund *et al.* 1995; Heim *et al.* 1995). En parallèle, ce domaine a été impliqué dans le processus de dimérisation. En effet l'ajout d'un phospho-peptide représentant le domaine d'activation de STAT1 ou l'ajout d'une protéine de fusion à STAT1 étiquetée GST-SH2 perturbe l'homodimère de STAT1 (Shuai *et al.* 1993). Puis il a été mis en évidence que le domaine SH2 des STATs pouvait avoir plusieurs fonctions : après sa liaison au motif tyrosine du récepteur, le domaine SH2 change de cible pour se lier au résidu tyrosine de la kinase elle-même. La kinase phosphoryle alors STAT sur son résidu tyrosine favorisant la formation d'un homodimère plus stable (Gupta *et al.* 1996). Ce domaine SH2 peut jouer trois rôles importants. Il est crucial pour le recrutement des STATs. Il est requis pour l'interaction avec les kinases JAKs qui phosphorylent les STATs (Heim, Kerr *et al.* 1995). Enfin, le domaine SH2 est indispensable à la dimérisation des STATs, cette association permet par la suite la liaison à l'ADN du facteur de transcription (Ihle 1996).

4. Le domaine de transactivation (TAD)

Le domaine TAD est localisé à l'extrémité C-terminale de tous les membres de la famille STAT. Ces protéines, à l'exception de STAT2 et STAT6, utilisent la phosphorylation de la sérine dans le domaine de transactivation pour réguler leurs fonctions transcriptionnelles. La première étude portant sur cette phosphorylation a été réalisée sur STAT1 en réponse à l'IFN γ . L'utilisation de l'inhibiteur des sérine-thréonine kinases, H7, avait permis de mettre en évidence une diminution de l'activité transcriptionnelle des STATs en réponse à l'IFN- γ (Schindler, Shuai *et al.* 1992). Puis l'équipe de J.E. Darnell a observé que le résidu sérine 727 de STAT1 est phosphorylé en réponse à une stimulation de l'IFN- γ ou au PDGF. La protéine STAT mutée de ce résidu sérine est normalement phosphorylé sur son résidu tyrosine, dimérisé et se lie à l'ADN. Cependant, les cellules contenant le mutant sérine 727 présentent une activité transcriptionnelle diminuée de 80% en réponse à l'IFN- γ (Wen *et al.* 1995). Ce résidu est hautement conservé dans STAT1, STAT3 et STAT4 avec le motif Leu-Pro-Met-Ser-Pro localisé au centre du TAD. STAT5a et STAT5b présentent le motif Pro-Ser-Pro à une position similaire. Il y a eu plusieurs spéculations quant à la kinase responsable de la phosphorylation de la sérine et plusieurs candidats comme p38, ERK et JNK ont été envisagés (Horvath 2000).

Le site de phosphorylation de la sérine n'est pas indispensable au domaine de transactivation des STATs. En effet, comme le montre la figure 5, STAT2 et STAT6 sont dépourvus de ce résidu phosphosérine, néanmoins, ces deux facteurs de transcription présentent une activité de transactivation qui est corrélée avec la capacité de se lier à un coactivateur transcriptionnel, tels que p300/CBP ou SRC (Bhattacharya *et al.* 1996; Gingras *et al.* 1999).

IV. Voie de signalisation des STATs

A. Mécanisme d'activation des STATs

Les facteurs de transcription STATs sont activés par une multitude de cytokines comme les interférons et les interleukines mais également les facteurs de croissance et les hormones (Bromberg 2001). Cette activation est effectuée par l'intermédiaire de tyrosine kinases telles que les JAKs (*Janus Kinase*), associées avec les récepteurs des cytokines et les récepteurs couplés aux protéines G, ou directement par d'autres tyrosine kinases : Src et Abl. Des récepteurs à tyrosine kinases peuvent également être responsables de l'activation des STATs, comme l'EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) et le PDGFR (*Platelet Derived Growth Factor Receptor*). La voie de signalisation conduisant à l'activation des STATs la mieux décrite est celle passant par les kinases JAK et est nommée la voie JAK/STAT. Les récepteurs des cytokines (par exemple IL-6R et IFN γ R) sont associés de manière constitutive aux JAKs, présents dans la portion intracytoplasmique du récepteur. La liaison du ligand induit la dimérisation du récepteur et l'activation des JAKs qui phosphorylent en *trans* les résidus tyrosines du récepteur. Ces résidus phospho-tyrosines (*p-Tyr*) créent un point d'ancrage pour les STATs latents cytoplasmiques grâce à leurs domaines SH2. Une fois liés aux récepteurs, les STATs sont phosphorylés par les JAKs sur un résidu tyrosine spécifique. L'homo ou hétérodimérisation des STATs s'effectue par la liaison réciproque du résidu p-Tyr d'un monomère STAT avec le domaine SH2 du second monomère STAT (par exemple, en réponse à l'IFN α/β , STAT1 forme un hétérodimère avec STAT2 ou STAT3 (Stancato *et al.* 1996)). Ces dimères de STATs sont libérés du récepteurs puis transloqués dans le noyau, via leurs associations avec des importines. Les facteurs de transcriptions STATs se fixent alors sur des séquences spécifiques de l'ADN (TT-N₄₋₆-AA) et activent les gènes de réponses aux cytokines (Figure 7).

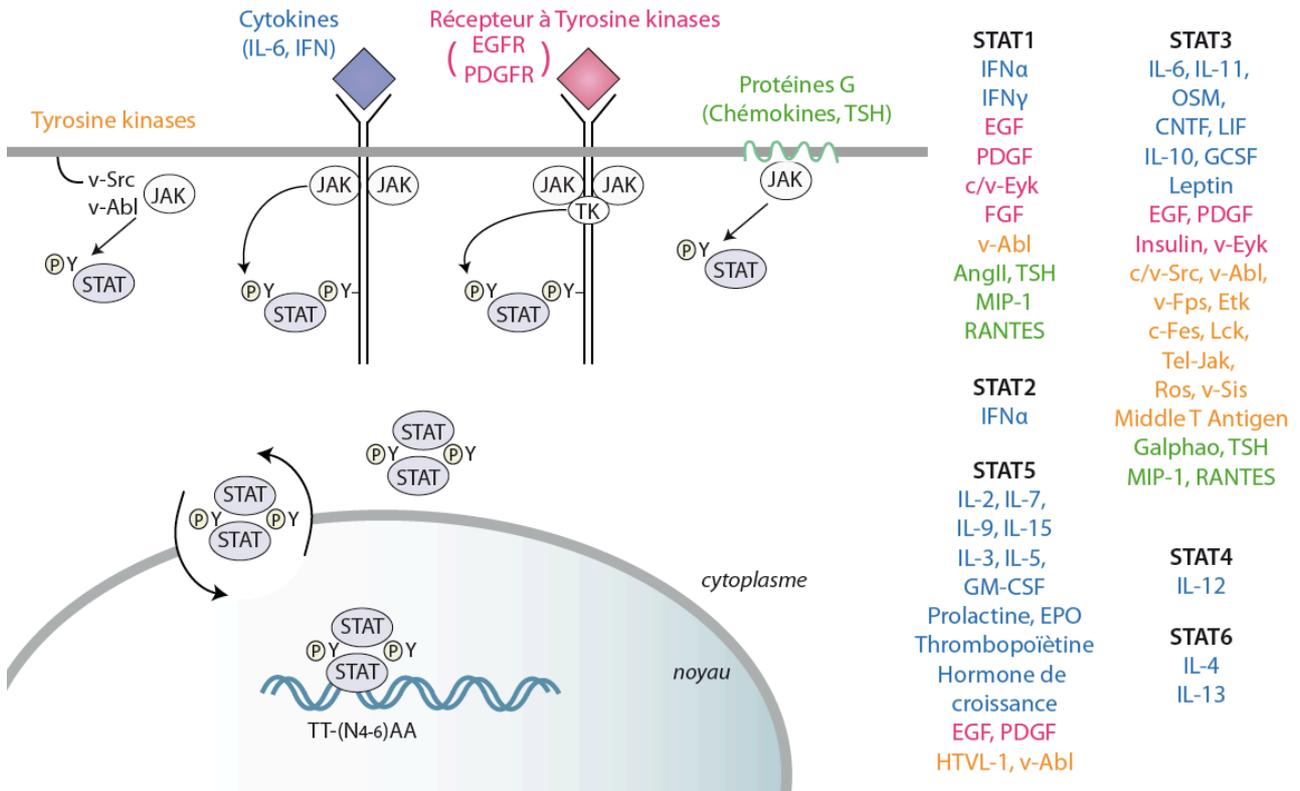


FIGURE 7 | Les protéines STATs peuvent être activées par quatre voies différentes : les tyrosines kinases en orange, l'activation des kinases JAKs en réponse aux cytokines en bleu, les récepteurs à tyrosine kinase en rose et l'activation des JAKs via des protéines G. La phosphorylation du résidu tyrosine des STATs permet leur dimérisation, leur translocation nucléaire et la liaison à l'ADN. Sur la partie de droite, pour chaque STAT de mammifères, sont listés les cytokines, les facteurs de croissance, les kinases et les ligands qui conduisent à l'activation des STATs. Chaque couleur correspond aux quatre mécanismes (Bromberg 2001).

B. Mécanismes de régulation des STATs

1. L'import/export des STATs

L'activation des STATs est un mécanisme rapide avec une accumulation maximale de STAT1 phosphorylé dans le noyau d'environ 30 minutes, représentant entre 20 et 25% de la forme totale, puis STAT1 est rapidement déphosphorylé avec une demi-vie de phosphorylation inférieure à 15 minutes (Haspel *et al.* 1996). En réponse aux cytokines, l'importation nucléaire des STATs implique la liaison de l'importine α , puis après l'inactivation des STATs, l'exportation nucléaire a besoin du complexe CRM1 (*Chromosome Region Maintenance 1*) / Exportin1 (Meyer and Vinkemeier 2004). La navette nucléocytoplasmique de STAT3 a été mise en évidence par la technique de FLAP (*Fluorescence Localization After Photobleaching*). Il a été montré que ce processus est dynamique et que STAT3 non phosphorylé fait continuellement la navette entre le cytosol et le noyau, dans des cellules non stimulées. Cette navette constitutive ne dépend pas de la phosphorylation du résidu

tyrosine 705 parce qu'un mutant Y705F navigue de la même manière que STAT3 non muté. Des expériences de délétion de séquences ont révélées que la moitié N-terminale (1-320) de STAT3 était essentielle à cette navette (Pranada *et al.* 2004).

2. L'inactivation des STATs

Dans les cellules normales, l'activation des STATs en réponse à un ligand est un processus transitoire. L'inactivation est effectuée par des régulateurs négatifs des STATs appartenant à la famille des protéines CIS/SOCS/JAB/SSI (CIS : *Cytokine Inducible SH2 domain containing protein* ; SOCS : *Suppressor Of Cytokine Signaling* ; JAB : *JAK Binding protein* ; SSI : *STAT-induced STAT-inhibitor*). Cette famille compte huit membres comprenant SOCS-1/JAB/SSI-1, SOCS-2, SOCS-3, SOCS-4, SOCS-5, SOCS-6, SOCS-7 et CIS. Leurs expressions sont induites par les ligands et ils inhibent les facteurs STATs en bloquant l'activité kinase des JAKs. SOCS-1 et SOCS-3 bloquent la signalisation des STATs en inhibant directement l'activité enzymatique de JAK. Bien que SOCS-1 interagisse essentiellement avec le résidu p-Tyr localisé dans la boucle catalytique de JAK (résidu Y1007 de JAK2), il a été montré que SOCS-1 pouvait également interagir avec les sous-unités des récepteurs IFN α 1R et IFN γ 1R indépendamment de JAK1. Le domaine SH2 de SOCS-3 peut aussi interagir avec la tyrosine 1007 de JAK2 mais avec une plus faible affinité (Croker *et al.* 2008). Un autre mécanisme, conduisant à l'inhibition des STATs, repose sur une compétition établie entre CIS et les STATs pour le même site d'ancrage sur les récepteurs phosphorylés.

En plus de la régulation négative des JAKs conduisant à l'inactivation des STATs, les dimères de STATs ont besoin d'être inhibés pour éteindre le signal dans le noyau. Cette inactivation peut être réalisée par déphosphorylation grâce à des phosphatases ou bien par dégradation protéolytique (Starr and Hilton 1999). SHP-2 (*SH2-domain containing PTP-2*) et la protéine nucléaire Tc-PTP (*T-cell Protein Tyrosine Phosphatase*) nommée aussi TC45, sont deux phosphatases décrites pour déphosphoryler et inactiver les facteurs de transcription STAT (You *et al.* 1999; Shields *et al.* 2008).

Les PIAS (*Protein Inhibitor of Activated STAT*) sont des régulateurs négatifs identifiés grâce à un criblage de double hybride. PIAS1 a été identifié comme un partenaire spécifique de STAT1 tandis que PIAS3 a été décrit comme étant un partenaire de STAT3 (Chung *et al.* 1997). Ces inhibiteurs bloquent le dimère de STAT empêchant ainsi la liaison à l'ADN du facteur de transcription.

Les trois principales voies d'inactivation des facteurs de transcription de la famille STAT sont représentées dans la figure 8.

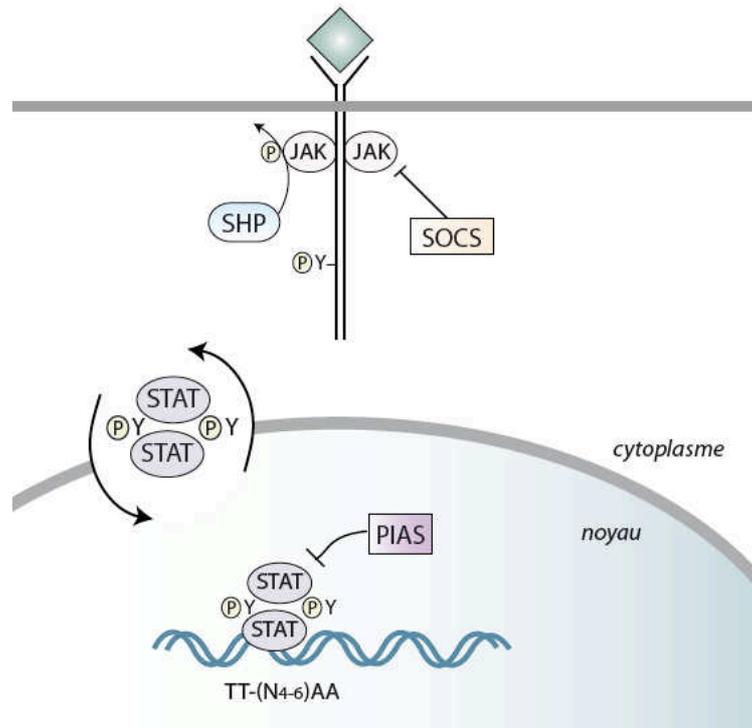


FIGURE 8 | Trois mécanismes conduisant à l'inactivation des facteurs de transcription STATs. Les phosphatases SHP (*SH2 protein tyrosine phosphatases*) déphosphorylent les JAKs. SOCS (*Suppressor Of Cytokines Signaling*) inhibe l'activité des JAKs. Les PIAS (*Protein Inhibitors of activated STATs*) inhibent la liaison à l'ADN des dimères de STAT (Bromberg 2001).

3. L'ubiquitination

Il s'agit d'un mécanisme qui cible les protéines pour la dégradation via la voie du protéasome. Pour cela, le système ubiquitine-protéasome requiert trois enzymes : l'enzyme E1 (*Ubiquitin-activating enzyme*) pour activer l'ubiquitine et l'enzyme E2 (*Ubiquitin-conjugating enzyme*) coopère avec l'enzyme E3 (*Ubiquitin protein ligase*) qui catalysent le transfert de l'ubiquitine sur les groupements amine des résidus lysine de la protéine substrat grâce à ses deux domaines catalytique, un domaine HECT et un doigt RING. La protéine substrat étant ubiquitinylée, elle est alors reconnue par le protéasome pour être dégradée (Pickart 2001).

L'ubiquitination des facteurs de transcription STATs a d'abord été décrit sur STAT1 en réponse à l'IFN- γ . L'équipe de Maniatis a souhaité étudier la régulation négative de STAT1 puisqu'il avait été observé que la phosphorylation de STAT1, en réponse à l'IFN- γ , était un événement très court et que la protéine n'était rapidement plus détectable. Ils se sont alors intéressés à l'éventuelle dégradation de STAT1 par une protéolyse dépendante de l'ubiquitine. En utilisant un inhibiteur du protéasome, MG132, avant une stimulation à l'IFN- γ , ils ont remarqué dans un premier temps que

la liaison et la stabilité de STAT1 sur les éléments GAS était augmentée puis que STAT1 était préférentiellement dégradé par la protéasome lorsqu'il est phosphorylé sur son résidu tyrosine 701. Enfin la transfection des mutants Y701F-S727A a montré que l'ubiquitination de la protéine est réduite en absence de phosphorylation de STAT1 (Kim and Maniatis 1996).

Quelques années plus tard, l'équipe de Ihle J. a mis en évidence que des inhibiteurs du protéasome, tels que le MG132 et la lactacystine, augmentent la stabilité de la forme phosphorylée sur le résidu tyrosine des facteurs de transcription STAT4, STAT5 et STAT6. Cependant, ils ont observé que l'effet était moins important sur les facteurs STAT1, STAT2 et STAT3. En comparant le domaine C-terminal de STAT1 et de STAT5, ils ont identifié, dans le domaine C-terminal de STAT5, une région contenant une hélice α amphipathique. Différentes délétions de cette région leur ont permis d'affirmer qu'elle était nécessaire à l'activité transcriptionnelle de STAT5 mais également à la dégradation par le protéasome via le résidu phosphotyrosine (Wang *et al.* 2000).

Malgré ces études montrant que les facteurs de transcription peuvent être dégradés par la protéasome, peu de travaux ont mis en évidence les protéines E3 ligases impliquées dans ce processus. En 2005, Tanaka *et al* a trouvé que l'ubiquitine E3 ligase SLIM était impliquée dans la dégradation de STAT4. Cette ligase est une protéine nucléaire qui interagit spécifiquement avec STAT4 phosphorylé sur son résidu 693 car le mutant Y693F de STAT4 empêche sa liaison avec SLIM dans le noyau. Cette E3 ligase est alors capable d'ubiquitinyler STAT4 afin de favoriser sa dégradation par le protéasome. Cependant, ils ont également observé que SLIM était également d'inhiber la phosphorylation de la tyrosine 693 de STAT4 sans induire sa dégradation. Ils suggèrent alors deux mécanismes : SLIM peut induire la dégradation de STAT4 à travers l'ubiquitination et la dégradation dépendante du protéasome. Mais il peut aussi empêcher la phosphorylation de la tyrosine de STAT4 par une voie indépendante du protéasome soit en jouant le rôle de protéine adaptatrice pour recruter les phosphatases soit l'ubiquitination induit un changement conformationnel ouvrant un accès aux tyrosine phosphatases (Tanaka *et al.* 2005).

4. La sumoylation

La protéine de modification SUMO (*Small Ubiquitin-related MOdifier*) a été identifiée comme une modification post-traductionnelle des protéines il y a une décennie. Comme l'ubiquitination, la sumoylation résulte dans la formation d'un pont formé d'un isopeptide entre le résidu glycine C-terminal de la protéine "donneur" et le groupement amine du résidu lysine de la protéine "accepteur". Cette modification requiert également une cascade enzymatique constituée de trois enzymes E1-3. Cette dernière enzyme E3 est une ligase essentielle au processus de sumoylation qui reconnaît le motif SP-RING, par conséquent ces E3 ligases sont également nommées SP-RING

ligases (Geiss-Friedlander and Melchior 2007). Chez l'homme, quatre membres appartiennent à cette famille et sont nommés SUMO-1, SUMO-2, SUMO-3 et SUMO-4. Les protéines SUMO1 à 3 semblent être ubiquitaires tandis que SUMO-4 est exprimée principalement dans le foie, la rate et les ganglions lymphatiques. Jusqu'à aujourd'hui, seule la protéine STAT1 a été montrée être sumoylée.

En 2003, deux groupes indépendants ont montré être les premiers à montrer que STAT1 était sumoylée par les protéines PIAS qui agissent comme des E3 ligases pour la modification SUMO-1 (Rogers *et al.* 2003; Ungureanu *et al.* 2003). Cette modification apparaît *in vitro* et *in vivo* uniquement sur le résidu lysine 703. Les membres de la famille PIAS, plus précisément PIAS α , stimulent la sumoylation de STAT1 en réponse à l'IFN- γ . Il a été montré qu'une mutation du résidu lysine 703 en arginine provoque une augmentation de l'activation de STAT1, médiée par l'IFN- γ . Par conséquent, ces travaux ont montré le rôle négatif de la modification SUMO sur STAT1.

Puis l'équipe de Silvennoinen O. s'est intéressée au rôle de la phosphorylation du résidu sérine 727 de STAT1 dans la sumoylation (Vanhatupa *et al.* 2008). Ils ont observé que l'activation des voies de p38MAPK, MKK6 (MAPK kinase-6) ou un stress osmotique conduisent à la sumoylation de STAT1. De plus, cet effet est également observé après une activation de la voie ERK1/2 par Raf-1. Le point commun de ces différentes voies est la phosphorylation de STAT1 sur son résidu sérine 727. Une mutation inhibitrice S727A abolit la sumoylation induite par p38MAPK. En revanche les mutations phosphomimétiques S727E et S727D améliorent la sumoylation basale de STAT1 et l'interaction entre PIAS1 et STAT1. Ces travaux ont permis de montrer que la phosphorylation de la sérine 727 de STAT1 agit comme un régulateur de la sumoylation et souligne le rôle central de la sérine 727 dans la coordination des fonctions de STAT1 dans la réponse cellulaire.

Chapitre 2

Généralités sur le facteur de transcription STAT3

I. Les domaines importants de STAT3

Comme expliqué précédemment, le facteur de transcription de la famille STAT contient quatre domaines essentiels pour sa fonction :

- Le domaine coiled-coil, constitué de quatre hélices α , est impliqué dans l'interaction avec des protéines régulatrices. Il est localisé entre les acides aminés 130 et 320.

- Le domaine de liaison à l'ADN est situé entre les acides aminés 406 et 514. L'interaction de STAT3 avec l'ADN s'effectue grâce aux arginines 414-417 à la suite de la dimérisation du facteur de transcription (Ma *et al.* 2003).

- Le domaine SH2 (entre l'acide aminé 600 et l'acide aminé 700), situé dans une poche à la surface de la protéine, permet la reconnaissance et la liaison des tyrosines phosphorylées. Par conséquent, ce domaine est essentiel à la liaison aux récepteurs membranaires, à la dimérisation de STAT3 et à sa translocation nucléaire.

- Enfin le domaine C-terminal est le plus important pour STAT3 puisqu'il contient le domaine de transactivation et les sites de phosphorylation des résidus tyrosine 705 et sérine 727.

Quatre modifications post-traductionnelles sont essentielles à son activité (figure9) : l'acétylation sur la lysine 685 est effectuée par les histones acétyltransférases telles que CBP/p300. Elle permet la stabilisation du dimère et la liaison à l'ADN ; la phosphorylation sur la tyrosine 705 permet, quant à elle, la formation du dimère de STAT3 ; la phosphorylation sur le résidu sérine 727 réalisée dans le noyau, est nécessaire à l'activité transcriptionnelle de STAT3 ; pour finir, la diméthylation de STAT3 sur le résidu lysine 140 a lieu lorsque le facteur de transcription est fixé sur le promoteur de ses gènes cibles par Set9. Cette modification régule l'expression des gènes cibles de STAT3 : par exemple l'expression de SOCS-3 est diminuée tandis que celle de CDCA1 est augmentée (Yang *et al.* 2010).

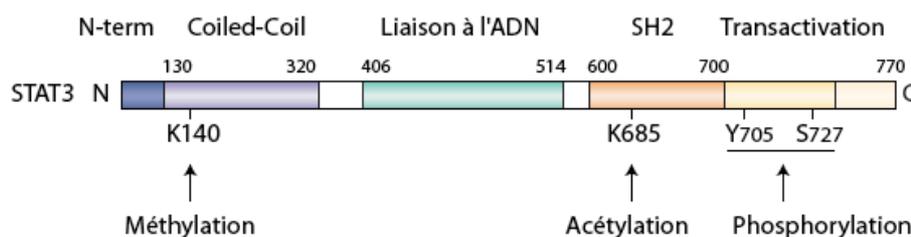


FIGURE 9 | Les quatre modifications post-traductionnelles de STAT3. Le facteur de transcription est méthylé sur son résidu lysine 140 présent dans le domaine coiled-coil, il est acétylé sur son site lysine 685 dans le domaine SH2. Enfin, STAT3 est phosphorylé dans le domaine de transactivation sur ses résidus tyrosine 705 et sérine 727.

II. Les deux isoformes de STAT3

A. STAT3 α et STAT3 β , découverte et structure

Lors de la découverte de STAT3, le groupe de Darnell avait mis en évidence que STAT3 présentait une forme prédominante de 92 kDa et une forme moins exprimée de 89 kDa. Lors de l'identification des protéines interagissant avec le domaine N-terminal de c-Jun, par un système de double hybride réalisé chez la levure, une forme courte de STAT3 de 80kDa a été découverte et nommée STAT3 β . La séquence de STAT3 β diffère de celle de la forme longue de STAT3, STAT3 α , par une délétion de 50 nucléotides proche de la région 3' (Schaefer *et al.* 1995). Il avait été montré que STAT1 β était le résultat d'un épissage alternatif. Basé sur ces résultats, Caldenhoven *et al* ont voulu savoir si cette forme tronquée de STAT3 résultait également d'un épissage alternatif. Pour cela, ils ont effectué une PCR avec des amorces ciblant l'ARNm de STAT3. Comme attendu, l'analyse des produits de PCR a révélé deux fragments de 300 et 250 paires de bases. Par séquençage, il a ensuite été montré que ces fragments correspondaient à la région interne de STAT3 (300 pb) et de STAT3 β (250 pb). Ces résultats ont permis de mettre en évidence que STAT3 β est le résultat d'un épissage alternatif (Figure 10).

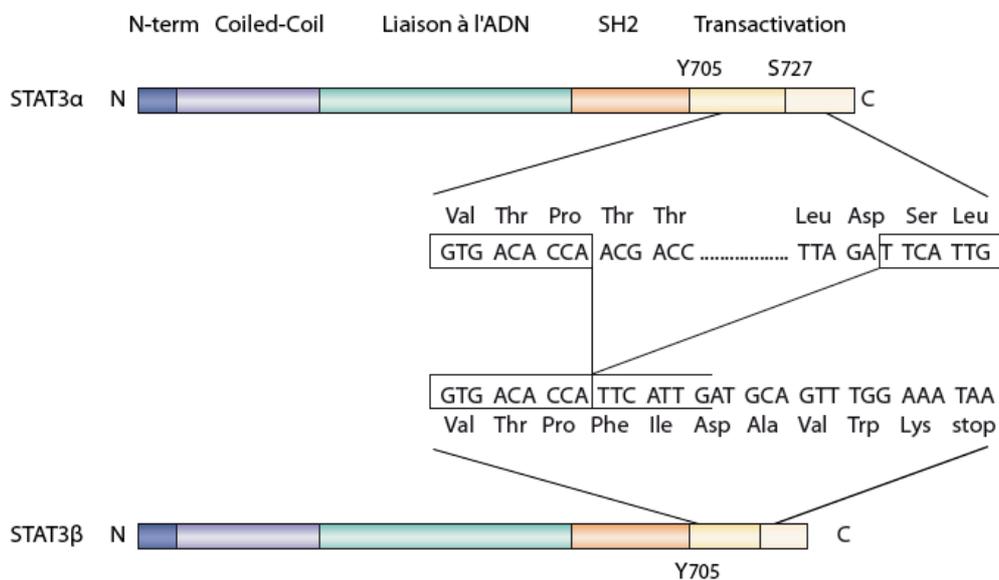


FIGURE 10 | Les deux isoformes de STAT3. Le facteur de transcription STAT3 possède deux isoformes : STAT3 α correspond à une forme entière de 770 acides aminés alors que STAT3 β représente une forme tronquée déletée de 50 pb en COOH terminal.

B. STAT3 β , rôle de dominant négatif ou facteur de transcription ?

Par la suite, cette équipe a montré que les protéines STAT3 et STAT3 β étaient co-exprimées dans différents types cellulaires tels que les éosinophiles, les cellules pro-B (BaF3) mais également des cellules de lymphomes (U937) et de leucémie promyélocytophiles (HL-60). En réponse à une stimulation de l'IL-5 dans les cellules COS, STAT3 β est rapidement phosphorylé sur son résidu tyrosine. Ils ont remarqué que la liaison de STAT3 β à l'ADN, au niveau de la séquence pIRE (*palindromic IL-6/IFN γ Response Element*) du promoteur de ICAM-1 (*InterCellular Adhesion Molecule 1*), était deux à trois fois plus élevée que STAT3. Cependant, cette isoforme est incapable d'activer un promoteur contenant cette séquence. STAT3 β est alors décrit comme un régulateur dominant négatif de la transcription. Deux hypothèses ont alors été émises : La première hypothèse était basée sur le fait que les homodimères STAT3 β ont une plus forte affinité pour les séquences pIRE . Par conséquent, ils occupent ces sites sur l'ADN et empêchent la liaison à l'ADN du dimère de STAT3. La seconde hypothèse résidait dans l'implication d'un hétérodimère STAT3/STAT3 β dans la régulation négative de la transcription. Ils avaient observé que l'activation transcriptionnelle des éléments pIRE était diminuée de 50% avec un hétérodimère STAT3/STAT3 β (Caldenhoven *et al.* 1996).

Cependant, STAT3 β est capable de jouer un rôle important dans la transcription en recrutant, par son domaine coiled-coil, des coactivateurs. Une équipe a montré que STAT3 β coopère avec c-Jun pour activer la transcription des gènes de l' α_2 -macroglobuline et l' α_1 -antichymotrypsine dans des cellules tumorales hépatocytaires. Cette interaction s'effectue au niveau de la région coiled-coil du domaine N-terminal de STAT3 qui est présente dans les deux isoformes (Schaefer, Sanders *et al.* 1995). De cette manière, STAT3 α et STAT3 β sont donc capables d'activer la transcription de même gènes cibles en formant des complexes avec c-Jun.

Bien qu'il ait été montré que les deux isoformes de STAT3 reconnaissent la même séquence d'ADN sur les promoteurs de leurs gènes cibles, le groupe de Desiderio a montré en 2002 qu'une absence de STAT3 β diminue l'expression des gènes cibles de STAT3 après un choc endotoxique (Yoo *et al.* 2002). En réponse à une endotoxine, le foie induit une réaction inflammatoire de phase aiguë. Plusieurs cytokines sont impliquées dans cette réponse comme l'IL-1 β , le TNF α (*Tumor Necrosis Factor*) et l'IL-6. Cette dernière active les gènes de réponse de la phase aiguë par l'intermédiaire de STAT3. Pour connaître le rôle des deux isoformes STAT3 α et STAT3 β , ils ont généré en parallèle des souris déficientes en STAT3 (STAT3 $^{-/-}$) par recombinaison homologue des souris incapables de synthétiser STAT3 β , notées STAT3 β $^{-/-}$. Contrairement à une délétion totale

de STAT3, ils ont observé que la perte sélective de STAT3 β était associée à une production normale d'IL-6, IL-1 β et TNF α dans des macrophages traitées au LPS (*Lipopolysaccharide*), endotoxines présentes dans la membrane externe des bactéries de Gram-. Néanmoins, lors d'une mise en contact des souris STAT3 $\beta^{-/-}$ avec une endotoxine bactérienne, les animaux n'induisent pas de réponse aiguë à l'inflammation, le choc endotoxique est étendu aux reins avec la présence de nécrose tubulaires. *In vitro*, des MEFs STAT3 $\beta^{-/-}$ présentent une surexpression de gènes impliqués dans la réponse aiguë, tels que les marqueurs inflammatoires Crip (*Cysteine-rich intestinal protein*), Fap (*Fibroblast activation protein*), Mmp1 (*Matrix metalloproteinase 1*), Coch (*Coagulation factor C homolog*) et Cf2r (récepteur de la thrombine) en réponse au LPS. Ces résultats pourraient expliquer cette nécrose tubulaire observée chez l'animal. Par conséquent, cette équipe montre un nouveau rôle de l'isoforme STAT3 β dans le contrôle de l'inflammation systémique.

Après que l'équipe de Désidério ait étudié uniquement le rôle de STAT3 β lors de la réponse inflammatoire, via le LPS, le groupe de Poli a souhaité préciser les fonctions des deux isoformes de STAT3 chez la souris. Pour cela, ce groupe a généré des souris déficientes en STAT3 $^{4\beta}$, homozygotes pour l'allèle STAT3 $^{4\beta}$ (noté STAT3 $^{4\beta/4\beta}$). Ces animaux, ainsi obtenus, sont viables et fertiles, tandis que des souris déficientes en STAT3 α (noté STAT3 $^{4\alpha/4\alpha}$) meurent à la naissance (Takeda *et al.* 1997). Cependant, pour préciser le rôle de STAT3 β , ils ont voulu supprimer l'expression de l'isoforme STAT3 α . Donc, pour contourner cette létalité, ils ont utilisé le système de recombinaison Cre/loxP pour générer des souris de quatre génotypes différents : dans les souris *Alb Cre⁺STAT3^{4 α / β}* , l'expression de STAT3 α est abolie mais elles expriment STAT3 β à la place, le génotype *Alb Cre⁻STAT3^{4 α / β}* permet l'expression des deux isoformes STAT3 α et STAT3 β tandis que les souris *Alb Cre⁺STAT3 ^{β / β}* et *Alb Cre⁻STAT3 ^{β / β}* servent de contrôles à la technique.

Dans les souris STAT3 $^{4\beta/4\beta}$ ou STAT3 $^{+/+}$, ils ont injecté du LPS pour induire un choc endotoxique puis ils ont analysé l'effet et extrait les protéines à différents temps de traitements. Ils ont observé que les macrophages des souris n'exprimant que l'isoforme β sont plus résistants au choc endotoxique par rapport à des macrophages ne contenant aucune des deux isoformes. En revanche, les souris STAT3 $^{4\beta/4\beta}$ montrent une augmentation des tissus endommagés par le LPS comparées aux souris STAT3 $^{+/+}$.

L'analyse protéique a révélé que la phosphorylation de STAT3 α et la liaison à l'ADN étaient retrouvées dans les deux génotypes, mettant en évidence qu'en absence de STAT3 β , STAT3 α est suffisante pour activer les gènes cibles. Ils ont également observé que STAT3 β a aussi une fonction anti-inflammatoire. Les souris STAT3 $^{4\beta/4\beta}$ sont hyper réactives au LPS et sont capables d'activer l'expression des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire. STAT3 β exerce donc un effet

négatif sur la synthèse de cytokines inflammatoire. Ils ont montré que les macrophages du péritoine, dans des souris n'exprimant que l'isoforme STAT3 β , produisent moins de TNF et d'IL-6 en réponse au LPS. En revanche, dans les mêmes conditions, les macrophages STAT3 $^{4\beta/4\beta}$ produisent beaucoup plus de TNF et d'IL-6 par rapport au contrôle STAT3 $^{+/+}$. Pour expliquer les fonctions anti-inflammatoires de STAT3 β , ils ont étudié le promoteur de l'IL-10, puisque l'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire et immunosuppressive et qu'il est connu que STAT3 est capable de se lier au promoteur de cette interleukine pour activer son expression (Benkhart *et al.* 2000). Ils ont remarqué que STAT3 β , contrairement à STAT3 α , pourrait être l'isoforme impliquée dans l'activation de l'IL-10. En effet, les macrophages STAT3 $^{4\beta/4\beta}$ présentent une diminution de la production d'IL-10.

L'ensemble de ces travaux ont montré que STAT3 β n'est donc pas une forme dominante négative de STAT3 α mais au contraire cette isoforme est capable d'activer *in vivo* les gènes cibles de STAT3 impliqués dans la réponse anti-inflammatoire (Maritano *et al.* 2004).

III. Les mutations de STAT3

Le facteur de transcription STAT3 est retrouvé muté dans très peu de pathologies. La plus connue est le syndrome d'Immunoglobuline E ou encore appelé syndrome de Job. Cette maladie se traduit par une immunodéficiences et les symptômes sont nombreux comme par exemple un sévère eczéma, un taux élevé d'IgE (*Immunoglobuline E*) dans le sérum ainsi que des infections cutanées et pulmonaires. Il s'agit le plus souvent de cas sporadiques mais ils peuvent être héréditaires et dans ce cas la transmission est autosomique dominante. Les défauts observés lors du syndrome IgE, sont dues à des mutations hétérozygotes, qui se situent pour la plupart d'entre elles sur les séquences codantes du domaine de liaison de l'ADN ou du domaine SH2. La mutation du codon R382 du domaine de liaison à l'ADN est la plus fréquente, elle est retrouvée chez 50% des patients atteints de cette maladie (Kumanovics *et al.* 2010). D'autres mutations ont été détectées, chez différents patients, dans le domaine de liaison à l'ADN sur les acides aminés V463, H437 et T389. Il a été montré que ces quatre mutations diminuent la liaison à l'ADN du facteur de transcription et de cette manière bloque la voie de signalisation induite par l'IFN α , par exemple (Minegishi *et al.* 2007).

Récemment, l'équipe de Zucman-Rossi a montré que STAT3 pouvait également être muté dans une seconde pathologie, l'adénome inflammatoire hépatocellulaire (IHCA *Inflammatory hepatocellular adenomas*) (Pilati *et al.* 2011). Il s'agit de tumeurs du foie bénignes se développant principalement chez la femme. Cette pathologie est fréquemment associée à une obésité et un abus

d'alcool. Ces tumeurs se caractérisent par une surexpression de la phase aigüe de la réponse inflammatoire et par des infiltrats inflammatoires polymorphes. Il avait été montré que 60% des IHCA activent STAT3 via une mutation somatique hétérozygote sur le gène *IL6ST* (*IL6 Signal Transducer*), qui code pour les cytokines de la famille IL-6 (Rebouissou *et al.* 2009). Puis en se focalisant sur STAT3, ils ont identifié sept mutations de STAT3 dans six tumeurs à partir d'un échantillon de 114 adénomes hépatocellulaires. Toutes les mutations de STAT3 sont somatiques et ne sont pas observées dans le tissu hépatique sain adjacent. Quatre des sept mutations de STAT3 sont retrouvées dans le domaine SH2 (entre les résidus 585 et 688). Trois de ces mutations sont localisées dans une région importante du domaine SH2 sur les codons 657 et 658 et la quatrième mutation correspond à une substitution du résidu tyrosine 640 en phenylalanine, appartenant au motif conservé PYTK de STAT1, STAT2 et STAT3. Il avait été montré que la mutation Y631F de STAT2 favorisait la signalisation de l'IFN de type I (Scarzello *et al.* 2007; Constantinescu *et al.* 2008). Les trois autres mutations sont distribuées sur la totalité de la protéine : le résidu leucine 78 qui contribue à la dimérisation, le résidu glutamate 166 correspondant à une partie de l'hélice α du domaine coiled-coil qui interagit avec gp130 et le résidu aspartate 502 proche du domaine de liaison à l'ADN. Pour connaître les conséquences fonctionnelles de ces différentes mutations de STAT3, ils ont introduit les sept mutations dans l'ADN complémentaire des cellules hépatiques Hep3B, HepG2 et Huh7. Ils ont alors observé qu'en absence de cytokine, ces sept mutants de STAT3 sont constitutivement phosphorylés sur le résidu tyrosine 705 et transloqués dans le noyau. Cependant, l'inhibition des tyrosines kinases JAK1 ou Src diminue l'activité constitutive de STAT3 dans l'adénome inflammatoire hépatocellulaire. Ces travaux soulignent le rôle important de l'activation de STAT3 dans cette pathologie et révèle un nouveau mécanisme de l'activation constitutive de STAT3.

IV. L'activation de STAT3

A. La phosphorylation conventionnelle de STAT3 sur la tyrosine 705

STAT3 peut être activé par différentes cytokines comme IL-6, IL-10, IL-11, IL-21, IL-23, LIF et OSM (Yu *et al.* 2009). Parmi celles-ci, IL-6, IL-10, IL-11, LIF et OSM appartiennent aux cytokines de la famille de l'IL-6. Leurs récepteurs sont divisés en deux parties : la chaîne α de 80 kD fixe le ligand et la chaîne β de 130 kD (appelée gp130) permet la transduction du signal. Cette sous-unité gp130 est commune aux récepteurs des cytokines de la famille IL-6 et est associée, au niveau de sa partie intra cytoplasmique, à plusieurs kinases de la famille JAKs telles que JAK1,

JAK2 et Tyk2. A la suite de la fixation de ligands sur son récepteur, les différentes sous-unités dimérisent. Ce rapprochement entraîne une série de phosphorylations de six résidus tyrosine sur le domaine cytoplasmique de gp130 par les tyrosine kinases JAKs. Parmi ces phosphorylations, une phospho-tyrosine (Y759 chez l'homme et Y757 chez la souris) est nécessaire à la fixation de la tyrosine phosphatase 2 (SHP2). Lorsque celle-ci est recrutée, elle conduit à l'activation de la voie de signalisation ERK/MAPK (Extracellular signal-regulated kinase/Mitogen activated protein kinase) via Grb2 et Gab-1/2 (Grb2 associated binder). En parallèle, quatre résidus tyrosines (Y767, -814, -905 et -915 pour l'homme et Y765, -812, -904, -914 pour la souris) de gp130 forment un motif pYXXQ (Gerhartz *et al.* 1996). Ces motifs sont reconnus par la protéine STAT3 et deviennent alors des points d'ancrage pour le facteur de transcription grâce à son domaine SH2. Par la suite, STAT3 est phosphorylé sur son résidu tyrosine 705 par les JAKs favorisant la formation d'un dimère et sa translocation nucléaire (Figure 11).

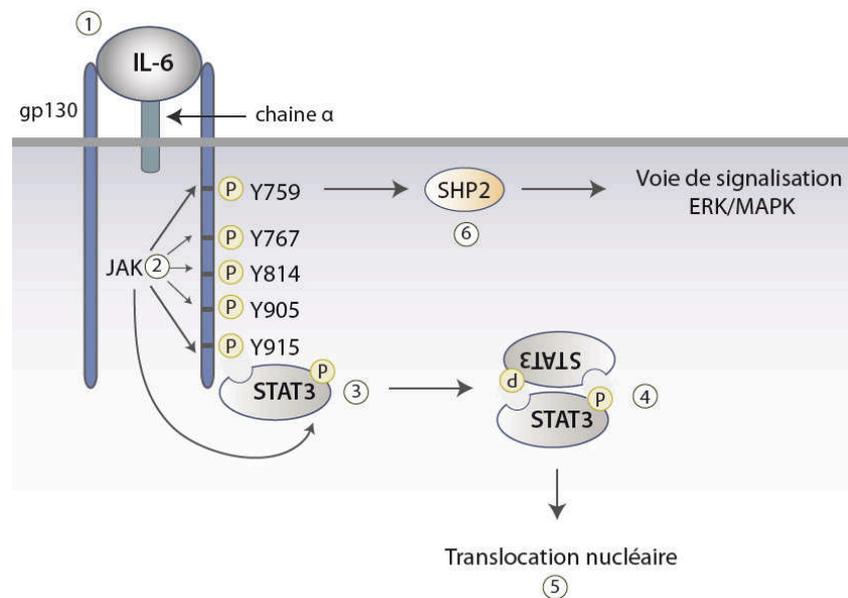


FIGURE 11| STAT3 est activé en réponse aux cytokines de la famille IL-6. 1) Suite à la fixation de cytokine sur son récepteur, gp130 se dimérise. 2) Ce rapprochement permet aux kinases JAKs, présentes sur la partie intracytoplasmique du récepteur, de phosphoryler gp130 sur 5 résidus tyrosines. 3) STAT3, par son domaine SH2, se lie aux tyrosines 767, 814, 905 et 915 puis est phosphorylé par JAK sur la tyrosine 705. 4) Une fois phosphorylé, STAT3 se dimérise grâce à la reconnaissance de la phospho-tyrosine 705 par le domaine SH2, 5) puis est transloqué dans le noyau. 6) En parallèle, SHP2 se fixe à la tyrosine 759 permettant d'activer une autre voie de signalisation, la voie ERK, MAPK.

STAT3 peut être activé par un grand nombre de récepteurs de facteurs croissance comme FGFR (Fibroblast Growth Factor Receptor), IGFR (Insulin-like Growth Factor Receptor), HGFR (Hepatocyte Growth Factor Receptor, connu également sous le nom de Met), PDGFR (Platelet-

Derived Growth Factor Receptor) et VEGFR (Vascular Epidermal Growth Factor Receptor). STAT3 peut également être activé par deux récepteurs de la famille EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) : EGFR1 (ErbB2 ou HER1) et ErbB2 (HER2/Neu). Leurs ligands potentiels sont l'EGF, lui-même, le TGF α , l'amphiréguline ou l'HB-EGF (Heparin-binding EGF).

L'EGFR, ancré dans la membrane cytoplasmique, est préassocié avec les kinases JAK2 (Ren and Schaefer 2002) et les protéines STAT3 non activées. La fixation du ligand EGF sur son récepteur induit sa dimérisation et son autophosphorylation sur les résidus tyrosines 1101 et 845 grâce à son activité tyrosine kinase portée par les JAKs. Ces motifs phospho-tyrosine servent alors de point d'ancrage pour le recrutement des protéines contenant un domaine SH2 telles que la kinase Src, la phospholipase C γ (PLC γ) et le phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3K). La kinase c-Src, recrutée sur la partie cytoplasmique du récepteur, phosphoryle alors STAT3 sur le résidu tyrosine 705. De nombreuses études montrent que cette kinase est nécessaire pour activer la voie de signalisation de STAT3. En effet, l'utilisation d'un dominant négatif de c-Src ou d'inhibiteur dirigé contre la kinase empêche l'activation de STAT3 en réponse aux facteurs de croissance. L'activation des protéines STAT3 repose donc sur le recrutement de la kinase sur l'EGFR (Olayioye *et al.* 1999).

En résumé, en réponse à un facteur de croissance, les tyrosines kinases Src et JAK phosphorylent STAT3 sur son résidu tyrosine 705. Cette phosphorylation entraîne la dimérisation et la translocation nucléaire du facteur de transcription.

Le résidu phospho-tyrosine STAT3 est reconnu par le domaine SH2 de STAT3 ou de STAT1 formant ainsi un homo ou un hétérodimère. Cette dimérisation permet au complexe d'être transloqués dans le noyau. Deux éléments localisés dans le domaine coiled-coil (Arg 214/215) et dans le domaine de liaison à l'ADN (Arg 414/417) sont impliqués dans la translocation nucléaire de STAT3 en réponse à un signal mitogénique. Le groupe de Cao X propose un modèle d'importation nucléaire de STAT3. Sans stimulation de mitogène, STAT3 est présent dans le cytoplasme (Ma and Cao 2006). Son motif NLS dans le domaine coiled-coil est masqué par l'interaction intramoléculaire entre les domaines coiled-coil et C-terminal. En réponse à un ligand, STAT3 est phosphorylé sur son résidu tyrosine 705 puis se dimérise. Ce changement de conformation ouvre le complexe et permet au motif NLS (Arg 214/215) du domaine coiled-coil de se lier avec l'importine α 5. L'importine β interagit avec l'importine α 5 pour transloquer le complexe dans le noyau. Le domaine de liaison à l'ADN comprenant les résidus Arg414/417, quant à lui, n'interagit pas directement avec les importines. Cependant, ces résidus semblent être nécessaires au maintien d'une structure appropriée du dimère de STAT3, favorisant sa fixation avec l'importine α 5. Une

fois dans le noyau, STAT3 se dissocie de l'importine $\alpha 5$ et fixe le promoteur de ses gènes cibles via son domaine de liaison à l'ADN. L'importine $\alpha 5$ est alors exportée vers le cytoplasme en se liant au récepteur d'export nucléaire CAS puis commence un nouveau cycle d'import nucléaire.

La régulation de l'accès des facteurs de transcription au noyau assure un moyen d'activer ou non l'expression de leurs gènes cibles. Cependant, nous le verrons par la suite, de plus en plus d'études décrivent un nouveau rôle transcriptionnel de la forme non phosphorylée de STAT3 (Yang *et al.* 2005; Yang *et al.* 2007; Yang and Stark 2008; Yan *et al.* 2011). En parallèle, l'équipe de Reich NC. a récemment montré que l'importation nucléaire de STAT3 pouvait être indépendante de la phosphorylation du résidu tyrosine 705 mais était dépendant de l'action de l'enzyme Ran GTPase et de l'importine $\beta 1$. La protéine STAT3, sous forme de dimère non phosphorylé, possède un signal de localisation nucléaire accessible aux importines lui permettant sa translocation nucléaire (Cimica *et al.* 2011).

B. Les autres modifications post-traductionnelles de STAT3

La phosphorylation est la modification post-traductionnelle la plus étudiée et qui régule les activités des différentes protéines. Mais il existe beaucoup d'autres modifications telles que l'acétylation, la méthylation, la sumoylation ou l'ubiquitination. Les modifications de STAT3 en réponse à une stimulation par des cytokines ou des facteurs de croissance incluent la phosphorylation sur la tyrosine 705 et la sérine 727. Cependant, STAT3 non phosphorylé ou muté sur la tyrosine 705 forme malgré cela un dimère et induit la transcription. Plusieurs études ont également montré que l'acétylation de STAT3 jouait un rôle important dans l'activation de la transcription de ses gènes cibles.

1. La phosphorylation du résidu sérine 727 augmente l'activité transcriptionnelle de STAT3

Les premiers travaux permettant de comprendre le rôle de la phosphorylation du résidu sérine ont été réalisés sur les deux isoformes α et β du facteur de transcription STAT1. Par la suite, ces données ont été transposées à STAT3 présentant des régions analogues à celles de STAT1. Le groupe de Darnell a montré que STAT1 était constitué de deux isoformes STAT1 α et STAT1 β , pour lequel il manque 38 acides aminés dans le domaine C-terminal. Il a été observé que la lignée cellulaire humaine U3A, qui ne contient pas de STAT1 α et de STAT1 β , ne répond pas aux stimulations de l'IFN α ou de l'IFN γ . Cependant, la transfection de STAT1 α ou STAT1 β dans ces cellules suffit pour restaurer la voie de l'IFN α . En revanche, seul STAT1 α peut restaurer la voie de l'IFN γ . Etant donné que la différence entre ces deux isoformes réside dans les 38 acides aminés du

domaine C-terminal, ils ont porté leur attention sur ces résidus lors d'une stimulation à l'IFN γ . L'utilisation d'un inhibiteur de sérine/thréonine kinase, H7, a montré que la transcription induite par l'IFN γ était bloquée dans ces conditions. En parallèle, il a été mis en évidence que l'incorporation de ^{32}P au niveau des résidus phospho-sérine dans STAT1 α est plus importante que dans STAT1 β . Ces résultats ont alors suggérés la présence d'une sérine essentielle à l'activation des gènes localisés dans le domaine C-terminal. Par un alignement et une analyse de séquences de STAT1 α , STAT3-5, il a été montré qu'une séquence contenant un résidu sérine (Pro-Met-Ser-Pro) était conservée dans ces quatre membres de la famille STAT. Par la suite, en utilisant un mutant de la sérine 727 de STAT1 α (noté STAT1 α s), ils ont mis en évidence que la mutation diminuait l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription par rapport à STAT1 α . Ils ont également montré, par la technique de luciférase, que STAT1 α présentait une activité transcriptionnelle 25 à 30 fois plus important que STAT1 β en réponse à l'IFN γ . Par conséquent le résidu sérine 727 de STAT1 α permet d'augmenter l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription.

Comme STAT3 est un analogue de STAT1, ils ont réalisé les mêmes expériences décrites ci-dessus dans les cellules COS-1 en réponse à l'EGF et à l'IL-6. Ils ont alors noté que la phosphorylation du résidu sérine 727 de STAT3 permettait également d'augmenter considérablement l'activation de la transcription des gènes cibles de STAT3 comme c-fos (Wen, Zhong *et al.* 1995).

Selon l'exposition aux différents stimuli, plusieurs sérine/thréonine kinases peuvent phosphoryler STAT3 sur la sérine 727 :

PKC δ (*Protein Kinase C δ*) appartient à une famille hétérogène de kinases dépendantes de phospholipides. L'activation de récepteurs couplés aux protéines G, de récepteurs à activité tyrosine kinase et de tyrosine kinases peut activer l'expression de PKC, conduisant à long terme à la réponse cellulaire telles que la prolifération, la différenciation et l'apoptose (Newton 1997). Au moins 11 isoformes ont été décrites et classées en trois catégories majeures : les PKC conventionnelles (α , β , et γ) qui requièrent le calcium Ca^{2+} et le Diacylglycérol (DAG), les nouvelles PKC (ϵ , δ , η et θ) qui ont seulement besoin de DAG et les PKC atypiques (ι , λ et ζ) qui sont insensibles au Ca^{2+} et au DAG (Dekker and Parker 1994). Il a été montré que les kinases PKC β , ϵ et δ se lient à STAT3, mais seule l'interaction entre PKC δ et STAT3 est dépendante d'une stimulation à l'IL-6. Une fois liée à STAT3, cette kinase est capable de le phosphoryler sur son résidu sérine 727. Cependant, cette phosphorylation n'active pas STAT3 mais au contraire réprime sa liaison à l'ADN et son activité transcriptionnelle en réponse à l'IL-6. En effet, l'équipe de Cao a montré que l'activité transcriptionnelle de STAT3 est réduite de 50% lorsque des cellules COS-1 sont transfectées avec

PKC δ , contrairement au mutant dominant négatif de PKC δ (Jain *et al.* 1999). Une autre étude réalisée sur différentes lignées cellulaires tumorales (mélanome, gliome, vessie, colon, poumon, pancréas et sein) a montré que l'isoforme PKC ϵ est également capable de phosphoryler STAT3 sur son résidu sérine 727. Etant donné que PKC ϵ est liée à l'induction et à la progression des cancers humains (Griner and Kazanietz 2007) et que l'interaction PKC ϵ -STAT3 est observée dans de multiples cancers, l'équipe de Verma a proposé que la kinase PKC ϵ pourrait être le signal initial de l'activation constitutive du facteur de transcription dans de nombreux cancers (Aziz *et al.* 2010).

Les kinases ERK1 et ERK2 (*Extracellular signal Regulated Kinase*) appartiennent à la famille des MAP kinases qui jouent un rôle important dans la régulation de la croissance cellulaire et la différenciation. Ces kinases phosphorylent STAT3 sur son résidu sérine 727 indépendamment de la phosphorylation du résidu tyrosine 705. Cependant, Chung et son groupe ont indiqué que cette phosphorylation modulait négativement la phosphorylation du résidu tyrosine 705. En réponse à l'EGF, ils ont observé que l'inhibition chimique de sérine kinase par l'inhibiteur H7 ou par le PD098059 (inhibiteur de MEK, activateur de ERK) bloque la phosphorylation de la sérine 727 mais induit également une augmentation de la phosphorylation de la tyrosine 705 (Chung *et al.* 1997).

La kinase JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*), autre membre de la famille des MAPK, est responsable de la phosphorylation de STAT3 sur son site sérine 727 soit en réponse à un stress, soit en réponse à l'activation de kinase en amont de JNK. *In vitro* et *in vivo*, il a été montré que JNK1 était activé par les UV ou par la kinase MEKK1 pour phosphoryler STAT3 sur son site sérine 727. Cependant, dans ces deux conditions, Lim et Cao ont observé que la phosphorylation du résidu tyrosine 705 était diminué. Par conséquent, ces résultats, et ceux obtenus avec la kinase PKC δ , suggèrent que les MAPK et d'autres sérine/thréonine kinases sont capables de réguler négativement la liaison à l'ADN et l'activité transcriptionnelle de STAT3 via la phosphorylation de la sérine 727 (Lim and Cao 1999).

La kinase MEKK-1 (MAPK/Erk kinase kinase-1) est une MAPKinase-Kinase-Kinase. En réponse à l'EGF, cette kinase phosphoryle elle-même la sérine 727 de STAT3. Un dominant négatif de MEKK1 inhibe cette phosphorylation mais aussi celle de la tyrosine 705 dans les cellules COS-1 et HeLa. L'équipe de Cao remarque que MEKK1 phosphoryle directement STAT3 sur son résidu sérine 727 mais induit également la phosphorylation de la tyrosine 705 en modulant l'activité de JAK et Src (Lim and Cao 2001).

Etant le rôle important de la phosphorylation du résidu sérine 727 de STAT3 décrit par JE Darnell, il est important à comprendre comment cette phosphorylation peut augmenter l'activité

transcriptionnelle de STAT3. Pour cela, il a été proposé que cette phosphorylation permettait l'association entre le facteur de transcription et des coactivateurs (Wen, Zhong *et al.* 1995; Zhang *et al.* 1995).

En 2001, W. Kruijer met en évidence que l'association entre STAT3 et l'histone acétyltransférase p300 permet d'augmenter l'activité transcriptionnelle de STAT3 (Schuringa *et al.* 2001). *In vivo*, p300 est associé à STAT3 au niveau de son domaine de transactivation, en réponse à l'IL-6. Ils suggèrent que STAT3 sous forme de monomère n'est pas phosphorylé sur la sérine 727 et que cette phosphorylation nécessite la formation d'un dimère de STAT3 en réponse à l'IL-6. Des mécanismes similaires sont décrits, quelques années auparavant, pour d'autres facteurs de transcription tel que AP-1. Il constitue un homo- ou hétérodimère de c-Fos, c-Jun ou d'autres membres de la famille Jun mais cette dimérisation est l'événement indispensable pour la phosphorylation de la sérine par la kinase JNK-1 (Kallunki *et al.* 1996). De plus, cette phosphosérine de la protéine c-Jun, favorise l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription AP-1.

Pin1 (peptidyl-propyl isomerase (PPIase) peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase 1) est initialement caractérisé comme une protéine qui interagit avec la kinase NIMA. Elle reconnaît spécifiquement un motif d'acides aminés constitué d'une proline précédée par un résidu phosphosérine ou phosphothréonine (motif phosphoSer/Thr-Pro) pour réguler la conformation de ses substrats phosphorylés. Pin1 a un rôle important dans la régulation de la progression du cycle cellulaire. Par exemple, elle inhibe Cdc25 phosphorylé et régule le point de contrôle de la réplication dans le cycle cellulaire. STAT3 possède le motif phosphoSer-Pro reconnu par l'enzyme. De cette manière, Pin1 interagit avec le résidu sérine 727 de STAT3 sous la dépendance d'une stimulation de ligands, et est nécessaire pour la liaison à l'ADN de STAT3 ainsi que le recrutement de son coactivateur p300 (Lufei *et al.* 2007).

2. L'acétylation de STAT3 est nécessaire à sa liaison à l'ADN et à son activité transcriptionnelle

Le rôle important des histones acétyltransférases dans le remodelage de la chromatine et l'activation de la transcription est reconnu depuis longtemps. Plusieurs protéines avec une activité histone acétyltransférase sont identifiées telles que GCN5, p300/CREB-binding protein (CBP) et TAFII250. Ces protéines activent la transcription de différentes manières : ils sont capables de relâcher la structure du nucléosome en acétylant le domaine NH₂-terminal des histones ; ils peuvent directement acétyler les facteurs de transcription et altérer leurs activités transcriptionnelles ; ils permettent de recruter d'autres coactivateurs pour la machinerie

transcriptionnelle ; ils servent de relais pour connecter les facteurs de transcription avec des multiples composants nécessaires à la transcription. L'histone acétyltransférase p300 est requise pour l'activation des gènes cibles de STAT3. Plusieurs études montrent que STAT3 n'est pas seulement le partenaire de p300 mais peut également être son substrat pour l'acétylation sur différents résidus. L'acétylation sur le résidu Lys 685, localisé entre le domaine SH2 et le domaine de transactivation, est nécessaire à la dimérisation de STAT3 et par conséquent à la liaison à l'ADN du facteur de transcription (Yuan *et al.* 2005). STAT3 oscille entre un état acétylé par p300 et un état déacétylé par les histones déacétylases (HDAC1, HDAC2 et HDAC3). L'équipe de Brasier AR identifie deux autres résidus lysines au niveau du domaine NH2 terminal (Lys 49 et Lys 87). Ces lysines sont acétylées par p300 en réponse à l'IL-6 et à l'OSM. Elles n'ont pas d'effet sur l'activité de liaison à l'ADN de STAT3 mais sont essentielles pour son activité transcriptionnelle. Des substitutions K49R et K87R inhibent de manière significative l'expression des gènes cibles de STAT3 (Ray *et al.* 2005). Ces deux résidus lysines 49 et 87 permettent la reconnaissance du domaine NH2 de STAT3 par le bromodomaine de p300. De cette manière, le recrutement de p300 est renforcé sur le promoteur des gènes cibles de STAT3 facilitant l'assemblage des protéines du complexe activateur de la transcription formant l'enhanceosome.

D'autres études montrent que l'acétylation de STAT3 peut être effectuée indépendamment d'une stimulation de cytokines ou de facteurs de croissance. L'équipe de Chen JY étudie le rôle de CD44 dans l'acétylation de STAT3. CD44 est un récepteur qui favorise les réponses de la cellule à son microenvironnement et participe à la régulation de la croissance, de la survie, de la différenciation et de la mobilité. CD44, une fois activé, est internalisé et transloqué dans le noyau. Il fixe alors de nombreux promoteurs comme la cycline D1 conduisant à une reprogrammation transcriptionnelle (Lee *et al.* 2009). Lorsque CD44 est internalisé, il forme un complexe avec STAT3 et l'acétyltransférase p300. Ce complexe permet l'acétylation de STAT3 par p300 sur la lysine 685 et la formation d'un dimère STAT3 indépendamment des cytokines ou des facteurs de croissance. De cette manière, CD44 permet l'association entre STAT3 et p300 pour se fixer sur le promoteur de la cycline D1 conduisant à l'augmentation de l'expression de la cycline D1 et la prolifération cellulaire.

3. STAT3 est méthylé lorsqu'il est lié au promoteur de ses gènes cibles

En réponse à l'IL-6, STAT3 est également méthylé sur son résidu lysine 140 par la H3K4 méthyl-transférase SET9 et déméthylé par la H3K4 déméthylase LSD1 (*Lysine-Specific Demethylase*). Pour mettre en évidence la méthylation de STAT3, l'équipe de G. Stark a travaillé sur deux lignées

cellulaires : les cellules A4 dépourvues de STAT3 par recombinaison homologue et les cellules DLD-1 exprimant STAT3 (Yang, Huang *et al.* 2010). Ces deux modèles sont traités ou non à l'IL-6. Par analyse au spectromètre de masse en tandem, ils ont identifié une forme mono- et di-méthylée de STAT3 localisée entre les résidus 131 et 140. Parce que le résidu Lys140 est le plus logique, ils ont ensuite créé des anticorps dirigés contre la forme monométhylée (K140me1) et diméthylée (K140me2) de ce résidu. Ils confirment alors cette modification, en réponse à l'IL-6, par les techniques de Western blot et d'ELISA.

Par la suite, afin de préciser le rôle de cette méthylation, ils ont réalisé deux mutants du résidu Lys140 (K140R et K140A). Par gel retard, ils ont montré que les deux formes mutantes du résidu lysine 140 de STAT3 augmentent leur capacité à se fixer sur le promoteur de SOCS3, important régulateur négatif de l'activité de STAT3, à la suite d'une stimulation à l'IL-6. En parallèle, dans les mêmes conditions, ils ont observé que la phosphorylation du résidu tyrosine 705 est maintenue plus longtemps dans ces cellules. Puis, ils ont mis en évidence que l'importation nucléaire et la liaison à l'ADN du facteur de transcription sont nécessaires à la phosphorylation de la sérine 727, tandis que la liaison à l'ADN et la phosphorylation du résidu sérine 727 sont deux événements indispensables à la méthylation du site lysine 140.

Pour connaître les enzymes responsables de la méthylation et de la déméthylation de STAT3, ils ont exprimé STAT3 humain étiqueté d'un flag dans *Escherichia coli*, purifié par chromatographie d'affinité puis ils ont incubé STAT3-Flag avec différentes histones méthylases. De cette manière, ils ont découvert que SET9 diméthyle STAT3 sur son résidu lysine 140 en réponse à l'IL-6 et que LSD1 est responsable de la déméthylation de STAT3.

En résumé, STAT3 est diméthylé dans le noyau, et non dans le cytosol, lorsque celui-ci est présent sur la chromatine. L'enzyme SET9 est recrutée sur le promoteur de SOCS3 seulement après STAT3. Ces modifications de facteurs de transcription liés au promoteur permettent probablement de fournir un point d'ancrage à d'autres protéines aux fonctions importantes (Stark *et al.* 2011).

4. L'ubiquitination et la dégradation de STAT3

Peu d'études, jusqu'à nos jours, ont décrit la dégradation de STAT3 par le protéasome via son ubiquitination. Deux études indépendantes ont montré que STAT3 pouvait être ubiquitinylé avant d'être dégradé dans différentes conditions. La première étude a été réalisée en réponse à un virus. Le virus mumps est un paramyxovirus, agent infectieux commun retrouvé chez l'homme causant par exemple des méningites et des encéphalites. Il cible et dégrade STAT1 et STAT3 à travers l'action de sa protéine V. Il empêche la réponse à l'IL-6 et aux signaux de v-Src et peut induire

l'apoptose dans des cellules de myélomes multiples et des fibroblastes transformés de souris dépendants de STAT3 (Ulane *et al.* 2003).

Une seconde étude a montré que STAT3 pouvait être dégradé par une protéine de l'appareil de Golgi, TMF/ARA160. Cette protéine a été initialement décrite comme un facteur se fixant sur l'ADN qui lie préférentiellement les éléments TATA et appelée TMF (*TATA Element Modulatory Factor*). Puis TMF a été caractérisé comme un coactivateur potentiel au récepteur aux androgènes de 160 kDa (ARA160 *Androgen Receptor-co-Activator 160kDa*). Elle a alors été nommée TMF/ARA160. Cette protéine a été ensuite décrite comme pouvant faire partie du complexe E3 ubiquitine ligase (Conaway *et al.* 1998). Il a été montré que, lorsque cette protéine est présente dans le cytoplasme, elle interagit avec STAT3 et la tyrosine kinase Fer sous de faibles conditions de sérum dans des cellules myogéniques (cellules C2C12). Les taux des protéines Fer et STAT3 diminuent considérablement lorsque les cellules sont privées de sérum pendant 72h. En revanche, en présence d'un inhibiteur du protéasome (MG132), cette diminution est abolie. Ces travaux ont donc suggéré que Fer et STAT3 peuvent être dégradées par le protéasome. L'équipe de U. Nir a alors suggéré que TMF/ARA160 peut servir de protéine adaptatrice pour recruter STAT3 vers le complexe ubiquitine ligase et induire la dégradation par le protéasome du facteur de transcription (Perry *et al.* 2004).

5. La forme non phosphorylée de STAT3 possède un rôle important dans la cellule

a) **L'activité transcriptionnelle de la forme non phosphorylée de STAT3**

Depuis quelques années, il est admis que STAT3 joue un rôle important dans l'expression des gènes sans phosphorylation du résidu tyrosine. Stark GR et son équipe ont voulu comprendre le fonctionnement de la forme non phosphorylée de STAT3 (nommé U-STAT3 *Unphosphorylated STAT3*) dans la signalisation cellulaire.

Pour cela, à partir d'embryon de souris, et de la technique Cre/Floxed, ils ont généré des souris STAT3^{-/-}, puis ils ont transfecté la forme non mutée de STAT3 murin ou le mutant Y705F. En réalisant un CHIP sur puces (CHIP on chip) de ces deux formes de STAT3 dans des cellules non traitées, ils ont comparé les gènes cibles de STAT3 par rapport à une forme non phosphorylée (Y705F). Ils ont remarqué que certains gènes cibles de la forme non phosphorylée de STAT3, comme Cdc2, Cycline B1 et M-RAS, sont surexprimés dans le colon et les carcinomes mammaires. Par conséquent, ces travaux ont montré que le facteur de transcription était capable d'activer l'expression de ses gènes cibles par un nouveau mécanisme distinct du dimère de STAT3 formé grâce au résidu phospho-tyrosine (Yang, Chatterjee-Kishore *et al.* 2005).

Plusieurs travaux ont montré une interaction entre STAT3, NF- κ B, plus particulièrement avec la sous unité p65, et p300 en réponse à l'IL-1 ou l'IL-6 (Hagihara *et al.* 2005). Le complexe STAT3-p65 inhibe l'activité transcriptionnelle du gène iNOS (Yu *et al.* 2002). Yoshida et son équipe ont montré que l'homodimère p65 peut coopérer avec la forme non phosphorylée de STAT3 quand il est fixé à des motifs spécifiques de type κ B. Au contraire, la sous unité p50 de NF- κ B peut interagir avec la forme non phosphorylée de STAT3 liée aux éléments GAS des promoteurs (Yoshida *et al.* 2004).

Etant donné que, sans phosphorylation du résidu tyrosine 705, STAT3 est capable d'activer certains gènes cibles mais est également capable de se lier à un autre facteur de transcription, NF- κ B, Stark GR et son équipe ont souhaité connaître le fonctionnement de l'activité transcriptionnelle de la forme non phosphorylée de STAT3 (Yang, Liao *et al.* 2007).

Pour cela, ils ont utilisé la forme non phosphorylée de STAT3 (Y705F) décrites en 2005 (Yang, Chatterjee-Kishore *et al.* 2005) pour réaliser une immunoprécipitation de chromatine. Les fragments d'ADN coimmunoprécipités avec STAT3 sont amplifiés par PCR puis séquencés. Parmi ces séquences, ils ont trouvé des éléments communs reconnus par d'autres facteurs de transcription comme les éléments AP-1, CRE, C/EBP, ETS et κ B. Ils se sont alors intéressés aux éléments κ B et ont montré que la forme non phosphorylée de STAT3 forme un complexe avec les sous unités p65 et p50 de NF- κ B pour lier les éléments κ B du promoteur de RANTES. Cette régulation de RANTES par la forme non phosphorylée de STAT3 peut avoir des répercussions importantes sur la cellule. En effet, des taux élevés de RANTES peuvent empêcher l'entrée dans la cellule de Macrophage-tropic HIV-1 via CCR5 (Simmons *et al.* 2000). En revanche, une concentration trop faible de RANTES peut délivrer des signaux costimulateurs aux cellules T, augmentant la réponse à travers les récepteurs des cellules T (Bacon *et al.* 1995).

b) Le rôle de la forme non phosphorylée de STAT dans la protection de la stabilité du génome chez la drosophile

La formation d'hétérochromatine est essentielle au maintien de la stabilité du génome en contrôlant et supprimant les recombinaisons homologues anormales. L'équipe de Li a montré que STAT, chez la drosophile, sous sa forme non phosphorylée est associée à la protéine HP1 (*Heterochromatin Protein 1*) afin de la stabiliser sur l'hétérochromatine. En effet, la perte de l'expression de STAT92E entraîne le déplacement de HP1 sur la chromatine. Cependant, lorsque STAT92E est activé par les kinases JAK, STAT92E est phosphorylé sur son résidu tyrosine et le taux de STAT92E présent sur l'hétérochromatine est réduit. Dans ce cas, ils ont observé une délocalisation de HP1 entraînant la formation d'euchromatine. De plus, ils ont remarqué que le

taux réduit d'hétérochromatine ou de la forme non phosphorylée de STAT3 favorise un arrêt du cycle cellulaire et une augmentation des dommages de l'ADN. Par conséquent, ces travaux suggèrent que STAT92E s'associe à HP1 afin de maintenir l'hétérochromatine et protéger la stabilité du génome (Shi *et al.* 2008; Yan, Lim *et al.* 2011).

C. Recrutement des coactivateurs de STAT3 nécessaires à son activité transcriptionnelle

Plusieurs événements moléculaires conduisant à l'activation des gènes par les facteurs de transcription ont besoin d'être mis en place. La cellule met en place une construction qui renferme la chromatine dans le nucléosome. Il s'agit d'un complexe qui prend en charge 147 paires de bases de l'ADN enroulé autour d'un octamère d'histones H2A, H2B, H3 et H4 (Luger *et al.* 1997). Les nucléosomes condensent l'ADN dans une structure compactée et ordonnée nommée hétérochromatine. (Pinskaya *et al.* 2009).

La chromatine représente le modèle physiologique de toutes les informations génétiques eukaryotes. Elle est soumise à un large éventail de modifications post-traductionnelles sur les extrémités amino-terminales des histones afin de réguler l'accès à l'ADN. Ces différentes modifications peuvent générer des interactions synergiques ou antagonistes avec des protéines associées à la chromatine permettant de lui dicter un état transcriptionnellement actif ou silencieux. La nature de ce marquage épigénétique révèle ainsi le code des histones qui étend considérablement le potentiel d'information du code génétique (Jenuwein and Allis 2001). Le code des histones prédit que les modifications post-traductionnelles de la queue des histones crée un site de liaison pour des protéines effectrices. Les bromodomaines ont été les premiers domaines des protéines décrits comme interagissant spécifiquement avec les lysines acétylées de l'extrémité N-terminal des histones. Ce bromodomaine est retrouvé dans de nombreux régulateurs transcriptionnels avec une activité histone acétyltransférase (HAT). Les chromodomaines, quant à eux, sont reconnus par les histones méthylées. Il existe également une combinaison de code. Par exemple, l'histone H3 présente plusieurs modifications possibles : la méthylation de la lysine 9 et la phosphorylation de la sérine 10. Cependant, la phosphorylation de la sérine 10 inhibe la méthylation de la lysine 9 mais peut être couplée à l'acétylation de la lysine 9 ou de la lysine 14 durant une stimulation mitogénique ou hormonale.

Les enzymes de modification des histones et les complexes de remodelage de la chromatine travaillent de concert pour réguler ce processus. Les complexes de remodelage de la chromatine

sont réparties en quatre familles selon leur sous-unité ATPase : les familles ISWI (Imitation of Switch), SWI/SNF (Switch/Sucrose Non Fermenting), INO (Inositol) et CHD (Chromodomain helicase/ATPase DNA binding protein) (Vaquero *et al.* 2003). Le complexe SWI/SNF est, lui-même, divisé en deux classes dépendantes des sous-unités ATPase BRG1 ou hBRM. Grâce à leur bromodomaine, les protéines SWI/SNF interagissent avec les lysines acétylés qui jouent un rôle de balise spécifique sur le promoteur. De cette manière, l'accès à la chromatine est augmenté et l'ARN polymérase de type II peut se fixer sur le promoteur. Dès que l'ARN polymérase II est chargée sur l'ADN, elle est phosphorylée sur deux résidus sérine au niveau de son domaine COOH terminal (CTD). Plusieurs kinases peuvent être responsables de cette phosphorylation : la sérine 5 est phosphorylée par Cdk7 et le facteur de transcription TFIIF lors de l'initiation de la transcription tandis que la sérine 2 est phosphorylée par Cdk9 et P-TEFb pendant l'élongation et la terminaison de la transcription.

Lorsque STAT3 est transloqué dans le noyau, il induit la transcription de ses gènes cibles. Pour cela, il recrute directement ses coactivateurs comme les histones acétyltransférases NcoA/SRC1a (Giraud *et al.* 2002) ainsi que les complexes de remodelage de la chromatine tels que BRG1/hBRM (Giraud *et al.* 2004). Les protéines SRC1a et BRG1 interagissent directement avec le domaine TAD de STAT3. Celui-ci est également capable de recruter p300 via ses domaines N-terminal et TAD. p300 acétyle alors STAT3 sur les résidus lysine 49 et 87 permettant de stabiliser et renforcer l'association entre STAT3, p300 et les autres composants de l'enhanceosome (Hou *et al.* 2008). L'acétylation des lysines 9 et 14 de l'histone H3 par CBP/p300 entraîne un relâchement de la chromatine au sein du nucléosome. L'ADN étant décondensé, l'ARN polymérase se fixe sur le promoteur proximal des gènes cibles de STAT3. Pour finir, le facteur de transcription recrute Cdk9 via son domaine COOH terminal. La kinase CDK9, au sein du complexe pTEFb, phosphoryle la sérine 2 du domaine CTD de l'ARN polymérase II permettant la phase d'élongation de la transcription (Majello *et al.* 1999).

STAT3 est également impliqué dans l'inhibition de la transcription. En effet, il permet le recrutement de Tip60 et des histones déacétylases HDAC7 (Xiao *et al.* 2003). De cette manière, STAT3 peut induire la fixation du complexe DNMT1-HDAC1 sur le promoteur de SHP-1 (Zhang *et al.* 2005). Ce complexe induit une méthylation des îlots CpG du gène, ce qui empêche l'activation du gène par d'autres facteurs de transcription. Enfin, STAT3 s'associe avec les protéines du cycle cellulaire Rb (Barre *et al.* 2005) et p21 (Barre *et al.* 2003) pour induire la répression de la transcription (figure 12).

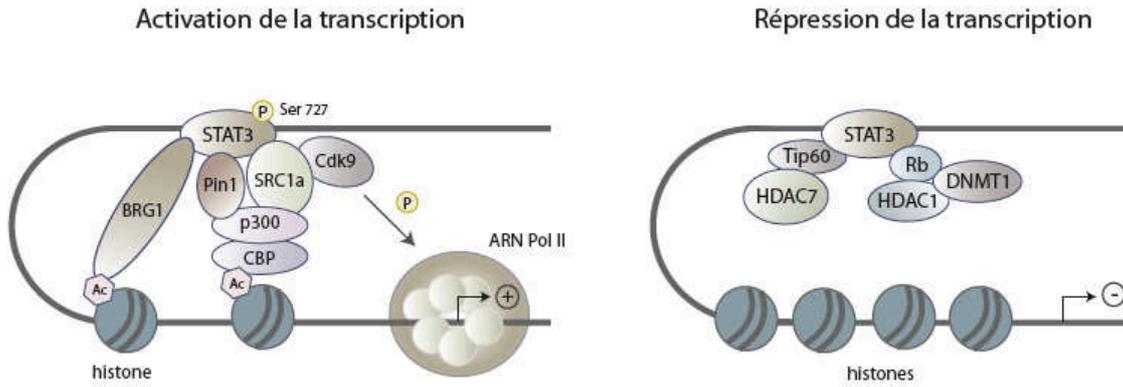


FIGURE 12 | STAT3 régule la transcription de ses gènes cibles. Lorsque STAT3 est phosphorylé sur ses résidus tyrosine 705 et sérine 727 puis transloqué dans le noyau, il recrute des protéines du complexe de remodelage de la chromatine comme BRG1 et des protéines de modification des histones telles que CBP/p300, via Pin1, SRC1a entraînant ainsi une décompaction de la chromatine. L'ADN étant accessible, l'ARN polymérase de type II se fixe sur le promoteur proximal. Puis STAT3 recrute la kinase Cdk9 capable de phosphorylé l'ARN polymérase et permettant ainsi l'élongation de la transcription. Le facteur de transcription joue également un rôle dans l'inhibition de la transcription en recrutant Tip60 et HDAC7 pour déacétyler les histones. Ensuite STAT3 recrute le complexe HDAC1 et DNMT1 pour méthyler les îlots CpG dans le but l'empêcher l'activation du gène par d'autres facteurs de transcription. STAT3 recrute également des répresseurs transcriptionnels connu tel que Rb.

Chapitre 3

Implication de STAT3 dans la transformation cellulaire

I. STAT3 et cancer

A. STAT3 est retrouvé constitutivement actif dans de nombreuses tumeurs

Les facteurs de transcription STAT3 permettent la transduction de signaux provenant de l'environnement extérieur à la cellule vers son noyau. Les voies de signalisation de STAT3 ont, au départ, été découvertes dans un contexte normal de signalisation de cytokines (Chapitre 1). Au milieu des années 1990, le premier lien entre le facteur de transcription STAT3 et l'oncogenèse a été effectué par l'équipe de Jove. Ils observent, de manière inattendue, que STAT3 est constitutivement activé dans les cellules transformées par l'oncoprotéine Src (Yu *et al.* 1995). Dans ces cellules transformées, cette tyrosine kinase, Src, phosphoryle STAT3 sur son résidu tyrosine 705 et l'active. STAT3 est alors transloqué dans le noyau puis se fixe sur l'ADN au niveau des éléments APREs (Acute-phase response element) pour réguler l'expression des gènes impliqués dans l'oncogenèse. Trois mutants sont générés pour confirmer le rôle de STAT3 : Le mutant STAT3Y ne peut pas être phosphorylé sur ce résidu ; Le mutant STAT3DB correspond à un combiné de mutations (VVV461-463AAA et EE434-435AA) permettant la phosphorylation de la tyrosine, une dimérisation et une translocation nucléaire mais ne permettant pas une liaison à l'ADN. Ce mutant est considéré comme un dominant négatif qui se dimérise avec un STAT3 non muté formant un complexe inactif ; Le mutant STAT3S contient une alanine à la place de la sérine 727. Ce mutant peut donc être phosphorylé sur la tyrosine mais son activité transcriptionnelle est réduite. L'utilisation de ces mutants de STAT3 ou des formes dominantes négatives inversent le phénotype de transformation tandis qu'un état constitutivement actif transforme les fibroblastes en culture (Cao *et al.* 1996; Bromberg *et al.* 1998).

Puis plusieurs équipes ont mis en évidence que STAT3 est impliqué, sous une forme constitutivement active, dans l'évolution du cancer de sphère ORL (Grandis *et al.* 2000) mais également dans le myélome (Catlett-Falcone *et al.* 1999). Depuis, de nombreuses équipes l'ont retrouvées dans un état actif dans de nombreuses tumeurs (Germain and Frank 2007; Al Zaid Siddiquee and Turkson 2008). Les différentes tumeurs présentant une forme constitutivement active sont répertoriées dans le Tableau 1.

TABLEAU 1 | Activation constitutive de STAT3 dans les tumeurs primaires et les lignées cellulaires dérivées de tumeurs (Bromberg 2002).**Activation constitutive de STAT3 dans les tumeurs primaires**

<i>Tumeurs solides</i>	<i>Tumeurs liquides</i>
Cancer du sein	Leucémie myéloïde aiguë
Cancer de la sphère ORL	Leucémie lymphoïde chronique
Cancer de la prostate	Mycose fongoïde
Cancer du colon	Lymphome de Burkitt
Cancer ovarien	Leucémie des grands lymphocytes granulaires
Cancer du poumon	Myélome
Tumeurs du cerveau	Lymphome de Hodgkins
Cancer pancréatique	Lymphome à larges cellules anaplastiques
Carcinome rénal	
Mélanome	

Implication de STAT3 dans le phénotype transformant

<i>Lignées cellulaires ou tumeurs primaires</i>	<i>Oncogènes</i>
Cancer du sein	Ick
Cancer de la sphère ORL	Ret
Cancer de la prostate	Erk
Mélanome	Src
Cancer de la thyroïde	
Cancer du colon	
Myélome	
Lymphome de Hodgkins	
Leucémie des grands lymphocytes granulaires	
Carcinome hépatocellulaire	

B. Plusieurs voies d'activation de STAT3 sont responsables de sa phosphorylation constitutive

De multiples activateurs en amont de STAT3 sont responsables de sa phosphorylation constitutive dans les cellules cancéreuses, comme une activation aberrante de récepteurs de facteurs de croissance, de récepteurs de cytokines ainsi que des tyrosines kinases cytoplasmiques.

1. L'activation de STAT3 par les récepteurs de facteurs de croissance dans les cellules tumorales.

L'activation de STAT3 peut être liée à la voie de signalisation de l'EGFR, maillon important de la progression tumorale et des métastases. La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) est un événement important et précoce qui conduit à la formation de métastases dans les cancers. Il a

été montré que la surexpression de l'EGFR est corrélée avec un fort potentiel métastatique (Thomas *et al.* 2003). L'EMT est initiée par une diminution de l'E-Cadhérine, permettant une perte des jonctions d'adhérence (Lu *et al.* 2003). La suppression de la protéine peut être effectuée par des répresseurs transcriptionnels comme le facteur de transcription TWIST, Slug et Snail. Le facteur TWIST est essentiel pour une formation correcte du mésoderme durant la gastrulation, mais également pour la migration de la crête neurale (Chen and Behringer 1995). De plus une surexpression de TWIST coïncide avec l'invasion tumorale et la formation de métastases dans le cancer du sein (Yang *et al.* 2004) ou encore dans le cancer de la prostate (Kwok *et al.* 2005), de l'utérus (Kyo *et al.* 2006), de l'oesophage (Yuen *et al.* 2007) et dans le gliome (Elias *et al.* 2005). Un lien entre toutes ces protéines a pu être effectué pour mieux comprendre l'EMT dans le cancer. L'équipe de Lo montre, en 2008, que les cellules cancéreuses avec une forte activité de l'EGFR subissent une EMT induite par les ligands EGF ou TFG α . La voie de l'EGFR conduit à la phosphorylation et à l'activation de STAT3, puis à la régulation de ses gènes comme E-Cadhérine et TWIST. De cette manière, l'expression de E-Cadhérine est diminuée tandis que celle de TWIST est augmentée permettant de promouvoir la transition épithélio-mésenchymateuse (Lo *et al.* 2007).

Un second membre de la famille EGFR, le récepteur ErbB2 ou HER2/neu, peut également activer STAT3 par l'intermédiaire des tyrosines kinases Src et JAK2 (Ren and Schaefer 2002). Le gène codant pour le récepteur ErbB2 est souvent retrouvé amplifié dans plusieurs cancers, comme le sein, le colon, la prostate, les poumons et les ovaires (Ramieri *et al.* 2010), conduisant à une signalisation et à une activation anormale de Src et de STAT3.

2. Activation par l'oncogène v-src

Le gène v-src est présent dans le génome du virus de sarcome de Rous. Il est découvert en 1976 par les chercheurs Stéhlín, Varmus et Bishop à San Fransisco. Il est appelé oncogène du fait de sa capacité à transformer des cellules saines en cellules tumorales. Un gène très similaire est également découvert dans les cellules saines de poulet, nommé c-src. Ces deux gènes c-src et v-src présentent une séquence nucléotidique similaire mais différent dans leur séquence C-terminale. La protéine v-src est déletée de ce domaine qui inhibe l'activité kinase de la protéine en se repliant (Coffin *et al.* 1978). Cette protéine v-src est donc constitutivement active et induit la transformation des fibroblastes murins qui acquièrent la capacité de proliférer en milieu semi-liquide et induisant des tumeurs chez la souris. En utilisant des dominants négatifs, Bromberg J *et al* montre que STAT3 est nécessaire à v-src pour induire une transformation des cellules (Bromberg, Horvath *et al.* 1998; Bromberg *et al.* 1999). v-Src est une tyrosine kinase qui induit la phosphorylation de STAT3 sur la tyrosine 705, sa dimérisation puis sa translocation nucléaire. STAT3 se fixe alors sur

les promoteurs de ses gènes cibles impliqués dans la prolifération, comme par exemple la cycline D1 ou c-Myc. La cycline D1 est reconnue comme un médiateur important de la tumorigenèse. Plus de 30% des carcinomes mammaires humains surexpriment la cycline D1 (Fu *et al.* 2004). Des souris déficientes en cycline D1 sont résistantes à la transformation des cellules mammaires induites par les oncogènes ras et neu (Yu *et al.* 2001). Cette action transformante est activée en amont par une forme constitutivement active de STAT3.

3. Dérégulation des composants de la voie JAK/STAT3 dans les cellules tumorales

L'activation constitutive de STAT3 survient en réponse à une surexpression ou à une sur-activation du récepteur EGFR et de l'oncogène Src. Cependant, les kinases JAK peuvent également être impliquées dans la dérégulation de STAT3. En effet, en utilisant un inhibiteur sélectif des tyrosine kinases JAK, AG490, l'activité de liaison à l'ADN de STAT3 est fortement diminuée ainsi que la croissance des cellules tumorales mammaires (MDA-MB-468) de manière dose dépendante. De plus, l'inhibition de l'activité kinase de Src et de JAK, bloquant la signalisation de STAT3, est corrélée avec une inhibition de la prolifération cellulaire. Inversement, l'inhibition de l'activité tyrosine kinase de Src et de JAK, dans des cellules ne contenant pas de STAT3 constitutivement actif, n'a pas d'effet sur la croissance cellulaire. Ces résultats mettent en évidence que, en plus de Src, les kinases de la famille JAK ont une fonction importante dans la régulation de l'activité de liaison à l'ADN et dans la croissance tumorale des cellules mammaires. De cette manière, il y a une association entre STAT3 constitutivement actif et la régulation de la croissance par Src et JAK. De plus, STAT3 activé est un effecteur important de la voie oncogénique induite par Src et JAK dans les lignées cellulaires du cancer du sein (Garcia *et al.* 2001).

Comme expliqué précédemment, les tyrosine kinases JAK jouent un rôle essentiel dans le développement et dans l'assemblage des sous unités des récepteurs des cytokines. Il a été montré, dans les cellules T d'enfants atteints de leucémies lymphoblastiques aiguës, qu'une portion de JAK2 en 3' fusionne avec la région 5' de TEL, un gène codant pour un membre de la famille des facteurs de transcription ETS. Cette translocation chromosomique induit une activité tyrosine kinase constitutive de JAK2 et confère une prolifération anormale et indépendante de ces cellules (Lacronique *et al.* 1997). Afin de mieux étudier le rôle de cette activation constitutive des JAK, une protéine chimérique est générée entre le domaine ets du facteur de transcription TEL et la tyrosine kinase JAK2 (Ho *et al.* 1999). Cette protéine de fusion entraîne une phosphorylation constitutive de STAT1, STAT3 et STAT5 sur leur résidu tyrosine.

II. STAT3 et la transformation cellulaire

La transformation cellulaire, selon Hanahan et Weinberg, se traduit par six caractéristiques biologiques conduisant au développement de la tumeur (Hanahan and Weinberg 2011):

- la prolifération cellulaire excessive
- la résistance à la mort cellulaire
- l'induction de l'angiogenèse
- l'immortalité répllicative
- l'activation de l'invasion et les métastases
- l'échappement aux suppresseurs de tumeurs

L'activation des protéines STAT3, via des cytokines ou des facteurs de croissance, est associée à un développement des organes, une prolifération cellulaire et une différenciation. En revanche, une activation constitutive de STAT3 entraîne souvent dans une dérégulation de la croissance cellulaire. Les protéines STAT3 sont souvent retrouvées constitutivement activées dans la plupart des cellules cancéreuses humaines (Bromberg 2002). Plusieurs équipes ont montré le rôle important de STAT3 dans la transformation cellulaire (Bromberg, Wrzeszczynska *et al.* 1999) : des lignées cellulaires transformées par l'oncogène v-Src favorisent l'activation constitutive du facteur de transcription (Yu, Meyer *et al.* 1995; Bromberg, Horvath *et al.* 1998).

A. STAT3 active des gènes permettant la prolifération cellulaire

Contrairement à une cellule normale dans laquelle STAT3 est transitoirement phosphorylé sur la tyrosine 705 en réponse à des cytokines ou des facteurs de croissance, la tyrosine est continuellement phosphorylée dans une grande variété de cancers.

L'équipe de Bromberg J, pour étudier les cibles de STAT3, utilise un dimère forcé de STAT3, qu'ils nomment STAT3-C. Ce dimère est créé grâce à la création d'un pont entre deux monomères STAT3, rendant la molécule capable de se dimériser sans phosphorylation du résidu tyrosine 705. Cette molécule, ainsi créée est capable d'activer la transcription mais également d'induire la transformation cellulaire. Lorsque les cellules 293T sont transfectées avec STAT3-C, l'expression de l'ARN messager de la cycline D1 et de c-Myc est 3 à 5 fois plus importante en réponse à l'IL6. STAT3-C se fixe sur le promoteur de la cycline D1 et augmente sa transcription (Bromberg, Wrzeszczynska *et al.* 1999). Par conséquent STAT3, sous une forme constitutivement

active, peut médier la transformation cellulaire en activant des gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire.

Cdc25a est un deuxième gène décrit comme cible de STAT3 et impliqué dans la transition G1/S du cycle cellulaire (Barre, Vigneron *et al.* 2005). En réponse à l'IL6, STAT3 est recruté sur le promoteur de la phosphatase Cdc25a. Mais l'IL-6 induit également le recrutement de c-Myc sur le promoteur de Cdc25a.

c-Fos se dimérise avec un grand nombre de facteurs de transcription. Le plus souvent, il interagit avec c-Jun pour former le complexe AP-1. Ce complexe est activé par des signaux mitogéniques et induit la transcription des gènes de prolifération comme la cycline D1. De cette manière, le complexe AP-1 est requis pour la progression de la phase G1 du cycle cellulaire. L'équipe de Darnell J.E. montre que, en réponse à l'IL-6, STAT3 se fixe sur le promoteur de c-fos pour induire sa transcription (Yang *et al.* 2003). Mais STAT3 interagit avec d'autres protéines nucléaires, comme c-Jun, déjà présentes sur le promoteur de c-fos au niveau du site AP-1. C-Jun pourrait permettre la stabilisation de STAT3 sur le promoteur pour activer la transcription de c-fos.

Le gène c-myc est un régulateur important pour la croissance cellulaire. Il est activé par différents facteurs de croissance comme l'EGF, PDGF mais également par une variété de cytokines incluant entre autre IL-6 et IL-12. La voie IL-6/gp130 conduit à l'activation de STAT3, qui à son tour se fixe rapidement sur le promoteur de c-Myc. De plus, le site de fixation de STAT3 sur le promoteur de c-Myc se superpose avec le site de liaison de E2F. STAT3 pourrait donc se fixer sur le site E2F du promoteur de c-Myc lorsque les complexes répresseurs, tels que Rb, n'y sont plus. Cependant, il est important de noter que l'action de STAT3, en réponse à l'IL-6, sur l'expression du gène de c-Myc est différent selon les cellules. En effet, il active la transcription de c-Myc dans les cellules hépatiques HepG2 (Kiuchi *et al.* 1999), tandis qu'il réprime la transcription de c-Myc dans les cellules leucémiques M1 (Nakajima *et al.* 1996).

Le gène Pim-1 est une autre cible de STAT3 permettant la progression du cycle cellulaire de la phase G1 vers la phase S. Il coopère avec c-Myc pour phosphoryler Cdc25a et induire son activité phosphatase (Mochizuki *et al.* 1999). Celle ci déphosphoryle et active les complexes cyclines-Cdk de la phase G1. Suite à l'activation de gp130, via la fixation de l'IL-6, STAT3 est activé pour induire la transcription des gènes de Pim-1 et de c-Myc (Shirogane *et al.* 1999). Ainsi, STAT3 régule la transition G1/S du cycle cellulaire.

La caractéristique la plus fondamentale des cellules cancéreuses est la capacité à maintenir une prolifération chronique. En activant des gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire, STAT3, sous une forme constitutivement active, favorise la prolifération excessive de la cellule tumorale

B. STAT3 et l'angiogenèse

L'angiogenèse est associée à la formation de nouveaux capillaires à partir de vaisseaux préexistants. Ce mécanisme est indispensable au processus de développement tumoral, à la croissance en trois dimensions de la tumeur et à la création de métastases. Plusieurs facteurs angiogéniques ont été identifiés. Parmi eux, le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) est l'un des plus importants pour la cellule endothéliale et son rôle a été intensément étudié (Bergers and Benjamin 2003). La production de VEGF a été associée à un taux élevé de la densité des microvaisseaux intratumoraux et à un mauvais pronostic.

Il a été montré que l'activation de STAT3 est corrélée à une expression abondante de VEGF et une augmentation de la densité des microvaisseaux intratumoraux dans le cancer de la sphère ORL (HNSCC *Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*). Puis il a été mis en évidence que STAT3 est capable d'activer directement la production de VEGF en se fixant sur son promoteur (Masuda *et al.* 2007). En revanche, dans les cellules endothéliales (HDMEC *Human Dermal Microvascular Endothelial Cells*) le VEGF induit la translocation nucléaire de STAT3 phosphorylé sur son résidu tyrosine. L'activation de STAT3 par la voie de signalisation du VEGF est nécessaire à la migration et à la formation de vaisseaux sanguins (Yahata *et al.* 2003). Par conséquent, dans le mécanisme de l'angiogenèse, STAT3 semble avoir au moins deux fonctions différentes : STAT3 favorise la production de VEGF dans les cellules HNSCC et ce VEGF, en retour, induit l'activation de STAT3 dans les cellules endothéliales, nécessaire à l'angiogenèse.

C. STAT3 et son implication dans la longueur des télomères

Les extrémités des chromosomes eucaryotes se terminent par un complexe de nucléoporines appelé télomère. La perte des télomères conduit à la fusion des chromosomes par leurs extrémités, facilite l'augmentation de la recombinaison génétique et induit la mort cellulaire par apoptose. Les télomères sont synthétisés par des télomérases composées d'ARN et de sous unités catalytiques nommées hTERT. Ils raccourcissent progressivement jusqu'à ce que la cellule approche de la sénescence répllicative (Masutomi *et al.* 2003). Cependant, il existe une forte corrélation entre l'activité télomérase et la malignité. L'équipe de MO. Robinson a été la première à mettre en évidence que l'activité de la télomérase hTERT est un mécanisme majeur permettant le maintien à long terme de la viabilité des cellules humaines immortelles. La capacité de ces cellules à proliférer avec de long télomères, en absence de télomérases, démontre que l'activité des

télomères n'est pas requise pour leurs fonctions répliquatives. En revanche, l'activité des télomères semble être nécessaire au maintien d'une longueur minimum (Zhang *et al.* 1999).

Il a été montré que STAT3 était un régulateur important de l'expression de hTERT dans des cellules primaires mais également dans des cellules tumorales. En effet, l'équipe de BH. Cochran a, dans un premier temps, observé qu'une absence de STAT3 entraîne une perte de l'expression de hTERT, conduisant à l'apoptose. Ils ont ensuite remarqué que l'activation de hTERT par STAT3 est effectuée en réponse à différents stimuli comme le PDGF, l'IL-6, l'OSM ou encore en réponse à l'H₂O₂. Enfin, ils ont mis en évidence que l'activation de hTERT est due à la fixation de STAT3 sur son promoteur afin d'induire son expression. Ces travaux mettent en évidence que STAT3 régule la longueur des télomères via l'activation de hTERT. Ils renforcent la notion que STAT3 est un médiateur clé de la transformation cellulaire (Konnikova *et al.* 2005).

D. STAT3 et la migration, formation des métastases

Le mélanome est l'une des tumeurs malignes les plus fréquentes. Il est caractérisé par une haute capacité pour l'invasion et la formation de métastases. La dégradation et le remodelage de la matrice extracellulaire par des enzymes protéolytiques, comme les métalloprotéinases de la matrice (MMP *Matrix MetalloProteinases*) sont les étapes clés de ce processus. Plusieurs études ont montré que STAT3 était impliqué dans ce mécanisme :

L'équipe de Huang a montré que l'activité de STAT3 était corrélée à l'expression de MMP-2, à l'invasion de la tumeur et à l'observation de métastases dans des cellules de mélanomes. Pour cela, ils ont utilisé le dimère constitutivement actif de STAT3, décrit par Bromberg et nommé STAT3-C (Bromberg, Wrzeszczynska *et al.* 1999), afin de simuler la forme active de STAT3 retrouvée dans de nombreux cancers. Ils ont alors mis en évidence que cette corrélation est due à la liaison du facteur de transcription sur le promoteur de MMP-2 lui permettant d'induire l'expression de la métalloprotéinase. De plus, en bloquant la forme active de STAT3 par une mutation Y705F, ils ont observé une absence de STAT3 sur le promoteur de MMP-2 et par conséquent une diminution de son expression. Ces travaux ont suggéré que l'activation de la voie de signalisation de STAT3 est impliquée dans l'invasion tumorale et la formation de métastases (Xie *et al.* 2004). En parallèle, une seconde équipe a montré que STAT3, sous une forme constitutivement active, était également capable d'activer l'expression d'une autre métalloprotéinase, MMP-9 dans une lignée cellulaire tumorale mammaire permettant, de la même manière que MMP-2, l'activation de l'invasion tumorale et la formation de métastases (Dechow *et al.* 2004).

En 2007, l'équipe de Bromberg a montré que STAT3 peut également être impliqué dans la tumorigenèse en activant la mobilité cellulaire des cellules épithéliales de la prostate via l'intégrine $\beta 6$. Pour cela, ils ont observé que l'expression de cette intégrine potentialise la migration cellulaire dans des chambres de Boyden. Ils ont ensuite remarqué que les cellules exprimant STAT3-C présentent une diminution des taux de E-cadhérine, un changement morphologique des cellules se traduisant par une augmentation du nombre de lammellipodes et de fibres de stress et une augmentation de la capacité migratoire mais également une augmentation de l'expression de l'intégrine $\beta 6$ et de son ligand, la fibronéctine. En revanche, le blocage de l'expression de l'intégrine $\beta 6$ dans les cellules exprimant STAT3-C induit une inhibition de la migration, une augmentation de l'expression de l'E-cadhérine et une réduction de la formation de colonie en agar (Azare *et al.* 2007).

L'ensemble de ces travaux ont démontré que l'activation constitutive de STAT3 lors de la tumorigenèse dans la prostate, le sein ou dans le mélanome favorise la transformation de ces cellules permettant la migration, l'invasion tumorale et par conséquent la formation de métastases en activant les métalloprotéinases MMP-2 et MMP-9 ainsi que l'intégrine $\beta 6$.

E. STAT3 et la survie cellulaire

Plusieurs études menées sur STAT3 révèlent que la transformation oncogénique des cellules, via Ras ou Src, conduit à l'activation de STAT3. Une fois activé par cette voie, STAT3 active la transcription des gènes de survie. Dans la plupart des cellules, l'activation de STAT3 peut conduire à la suppression de l'apoptose. Ces effets sont dus à l'expression de différents gènes de survie induite par STAT3.

1. Les protéines de la famille Bcl-2

Les membres de la famille Bcl-2 sont des régulateurs clés dans l'apoptose. Ces protéines contiennent entre un et quatre domaines d'homologie, nommés domaines BH1-4. Ces membres de la famille Bcl-2 peuvent être divisés en deux grands groupes selon leurs fonctions : un groupe de protéines de survie, ou anti-apoptotiques, et un groupe de protéines pro-apoptotiques. Ce dernier peut également être subdivisé en trois, selon la structure et la fonction des protéines (Strasser 2005) :

- Les protéines anti-apoptotiques regroupent Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, A1 (ou Bcl-2A1), MCL1 (Myeloid-Cell Leukemia sequence 1) et Boo (Bcl-2 homologue of Ovary, ou DIVA). Toutes ces protéines contiennent les quatre domaines BH, à l'exception de Mcl-1 qui ne présente que deux domaines. Lorsqu'elles sont surexprimées, ces protéines protègent les cellules d'une variété de

stimuli apoptotiques. Différentes études ont montré que Bcl-2 (Nakayama *et al.* 1993; Veis *et al.* 1993), Bcl-xL (Motoyama *et al.* 1995), Bcl-w (Print *et al.* 1998; Ross *et al.* 1998), A1 (Xiang *et al.* 2001) et Mcl-1 (Opferman *et al.* 2003) sont nécessaires à la survie de la cellule dans certains types cellulaires. Par exemple, Bcl-2 et Mcl-1 sont requises pour la survie des cellules B matures et des cellules T (Nakayama, Negishi *et al.* 1993; Opferman, Letai *et al.* 2003), tandis que Bcl-xL est requis pour la survie des progéniteurs érythroïdes dans le foie foetale (Motoyama, Wang *et al.* 1995).

- Les protéines pro-apoptotiques BAX/NAK-like comprennent BAX, BAK, BOK (*Bcl-2 related ovarian killer*) et Bcl-xs et contiennent entre deux et trois domaines BHs. Lorsqu'elles sont surexprimées, chaque protéine active l'apoptose. L'analyse structurale de ces protéines a montré que BAX est similaire à Bcl-xL, mais que ces deux protéines présentent des rôles opposés (Suzuki *et al.* 2000). L'utilisation de souris déficientes en BAX et BAK a permis de montrer que ces deux protéines sont essentielles pour le processus d'apoptose induit par des cytokines ou par un traitement cytotoxique (Lindsten *et al.* 2000; Rathmell *et al.* 2002). La perte combinée de BAX et BAK dans les cellules hématopoïétiques favorise la survie à long terme, en revanche, la perte de APAF-1 ou seulement de la caspase-9 retarde l'apoptose et ne favorise pas la survie des cellules (Ekert *et al.* 2004).
- Les protéines pro-apoptotiques BH3-only correspondent au troisième groupe des protéines de la famille Bcl-2. Ces protéines ne contiennent qu'un court domaine BH3 (de 9 à 16 acides aminés). Des expériences menées chez la souris et chez *C elegans* ont permis de montrer que ces protéines BH3-only sont essentielles à l'initiation du programme de mort cellulaire et à l'apoptose induite par le stress. Ce groupe de protéines renferme les protéines BAD (*Bcl-2 Antagonist of cell Death*), BIK (*Bcl-2 Intercating Killer*), BID, HRK (*HaRaKin*), BIM, (*Bcl-2-Interacting Mediator of cell death*), NOXA, PUMA (*p53-Upregulated Modulator of Apoptosis*) et BMF (*Bcl-2-Modifying Factor*). Toutes ces protéines peuvent fixer avec une forte affinité les protéines de survie Bcl-2-like et induire l'apoptose lorsqu'elles sont surexprimées (Huang and Strasser 2000). L'apoptose induite par la surexpression de ces protéines BH3-only requiert des membres du groupe BAX/BAK-like, indiquant que ces dernières agissent en aval des protéines BH3-only. Cependant, il est aussi possible que les protéines BH3-only et BAX/BAK-like fonctionnent en parallèle et mutuellement. Il a été reporté que des protéines BH3-only, en particulier BID et BIM, peuvent lier non seulement les membres de la famille anti-apoptotique Bcl-2 mais également BAX et BAK (Marani *et al.* 2002). En revanche, BAD ou BIK peuvent seulement lier Bcl-2 et ses homologues mais ni BAX ni BAK (Letai *et al.* 2002).

2. STAT3 régule des protéines de la famille Bcl-2

Depuis 1998, des études montrent que le facteur de transcription STAT3 peut réguler trois membres de la famille pro-apoptotique Bcl-2 : Bcl-xL, Bcl-2 et Mcl-1.

Bcl-2 et Bcl-xL sont localisées à la membrane mitochondriale mais également au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique et de l'enveloppe nucléaire. Bcl-2, sur la membrane du réticulum endoplasmique, peut inhiber directement BAX et/ou BAK, tandis que Bcl-xL inhibe la perméabilisation de la mitochondrie via de multiples mécanismes tels que le recrutement et la liaison des protéines BH3-only (Shamas-Din *et al.* 2011). Ceci empêche la libération du cytochrome c, de la membrane externe mitochondriale vers le cytoplasme. Lorsque le cytochrome c est libéré dans le cytoplasme, il active directement les caspases (Tsujimoto 1998). Mcl-1 (Myeloid cell factor-1) est localisée dans la mitochondrie mais également dans d'autres membranes intracellulaires (Yang *et al.* 1995). Mcl-1 diffère de Bcl-2 et Bcl-xL dans sa structure, dans sa courte demi vie de son ARNm et de sa protéine et dans la régulation de ses promoteurs. Elle est capable de s'associer avec les protéines pro-apoptotique de la famille Bcl-2 comme BAX. L'inhibition de Mcl-1 induit une rapide activation de l'apoptose. L'équipe de Fenton RG montre que cette protéine, avec une durée de vie très courte, est nécessaire pour la survie des cellules du myélome (Zhang *et al.* 2002).

STAT3 est constitutivement activé dans les lignées cellulaires du myélome U266 sous la dépendance de l'IL-6. Ces cellules sont résistantes à l'apoptose médiée par Fas et exprime des taux élevés de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL. Catlett-Falcone *et al.* montrent qu'un blocage de STAT3 inhibe l'expression de Bcl-xL et induit l'apoptose des cellules du myélome. De cette manière ils mettent en évidence que, en réponse à l'IL-6, STAT3 active la transcription de Bcl-xL dans ces cellules et contribue à la progression maligne en favorisant la survie à travers la suppression de l'apoptose (Catlett-Falcone, Landowski *et al.* 1999).

L'équipe de Matsuzawa examine le rôle du facteur de transcription STAT3 dans la régulation des signaux de résistance à l'apoptose dans les cellules épithéliales intestinales de rat induites par l'oncogène Ras. Bcl-2 et Bcl-xL sont importantes dans la progression des tumeurs intestinales. Leur étude a été la première à montrer que l'expression de Bcl-2 mais également de Bcl-xL est régulé et activé par STAT3 dans leur modèle d'étude en réponse au facteur de croissance EGF (Zushi *et al.* 1998).

En plus de Bcl-2 et Bcl-xL, Mcl-1 est également une cible du facteur de transcription STAT3. Dans le myélome multiple, l'IL-6 est un facteur de survie capable de réguler, rapidement et positivement, l'expression de Mcl-1, tandis qu'il n'a aucun effet sur les taux de la protéine Bcl-2.

Une étude publiée en 1999, révèle que la voie JAK/STAT est impliquée dans l'activation de Mcl-1 en réponse à l'IL-6 (Puthier *et al.* 1999).

L'activation de Mcl-1 par STAT3 est observé dans les macrophages de manière indépendante d'une stimulation à l'IL-6. Il est connu que la protéine STAT3 est activée constitutivement dans les cellules tumorales hématopoïétiques transformées par l'oncogène Src (Cao, Tay *et al.* 1996). La protéine est également activée de manière constitutive dans les macrophages. Cette activation est importante pour l'expression de Mcl-1 et la viabilité des macrophages. L'équipe de Pope RM montre que la phosphosérine 727 est importante pour l'expression de Mcl-1, en absence de la phosphorylation sur la tyrosine 705. En effet l'utilisation de l'inhibiteur H7, spécifique des sérine-thréonine kinases PKC, entraîne une diminution de l'expression de Mcl-1 dans les macrophages et cause la mort des cellules. En revanche, et de manière surprenante, les inhibiteurs chimiques dirigés contre ERK et JNK n'inhibent pas la phosphorylation de STAT3 et par conséquent n'induisent pas la mort des macrophages. Ces observations suggèrent un mécanisme d'activation de STAT3, différent de ces voies de signalisation, qui conduit à la régulation de la survie des macrophages via Mcl-1 (Liu *et al.* 2003).

Le programme de mort cellulaire par apoptose permet à la cellule de créer une barrière naturelle contre le développement du cancer. Seulement lors de la transformation cellulaire, la cellule met en place un mécanisme d'échappement à la mort. Ces différentes études ont montré que l'oncogène STAT3 est impliqué dans l'activation des protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-XL et Mcl-1 afin d'échapper à la mort cellulaire par apoptose.

3. STAT3 régule deux protéines de survie de la famille IAP

Lors de la transformation cellulaire, la cellule est également capable de mettre en place un mécanisme de survie lui permettant d'échapper à la mort cellulaire.

a) Les protéines de la famille IAP

Les protéines IAP (Inhibitor of apoptosis) sont des facteurs de survie qui utilisent deux mécanismes différents : soit elles se fixent directement aux caspases, les enzymes effectrices de l'apoptose, entraînant leur inhibition, soit elles entrent en compétition avec les caspases (Salvesen and Duckett 2002). De cette manière, ces protéines inhibent l'apoptose induite par les caspases. Elles forment une famille de 8 membres (X-IAP, ILP-2, ML-IAP, NAIP, Apollon, c-IAP1, c-IAP2

et survivine). Quelques études ont montré que STAT3 est capable de réguler deux de ces membres : la survivine et c-IAP2.

b) Activation de la survivine

La survivine possède deux rôles distincts permettant la survie et la progression de la mitose. Lors de la mitose, la survivine s'associe avec Aurora B, INCENP (Iner centre protein antigen) et la Boréaline pour former le complexe CPC (Chromosomal Passenger Complex) (Honda *et al.* 2003). Ces interactions sont nécessaires pour cibler le complexe sur les kinétochores, corriger le défaut d'alignement, former correctement le fuseau mitotique et elles sont indispensables à une cytokinèse complète. Des publications montrent que la survivine protège de l'apoptose dans des cellules normales ou transformées. Le mode d'action de la survivine est cependant controversé : l'association physique entre la survivine et les caspases est incertaine (Verdecia *et al.* 2000; Shin *et al.* 2001). En revanche, il est reconnu que la survivine est activée par le facteur de transcription STAT3 dans différentes conditions.

L'exposition de la peau aux UV cible la libération de prostaglandines (PG), comme PGE₂, produites par les cyclooxygénases (COX) et les PG synthétases. PGE₂ manifeste son activité biologique en se fixant à quatre récepteurs membranaires couplés aux protéines G, EP1-4. Suite à une exposition aux UVB sur la peau de souris, EP2 active la voie de l'EGFR/STAT3 qui induit la transcription de la survivine et donc la survie des cellules traitées (Chun and Langenbach 2011).

Plusieurs études montrent que le facteur de transcription STAT3 est impliqué dans la survie cellulaire en induisant l'expression de la survivine dans différents types de tumeurs. L'étude de l'activation persistante de STAT3 dans les cellules tumorales mammaires révèle que les gènes cibles du facteur de transcription confèrent une résistance à l'apoptose dans ces cellules. Par analyse des gènes cibles de STAT3 par puces à ARN, l'équipe de Jove R identifie la survivine comme étant régulée par STAT3 dans les cellules tumorales mammaires (Gritsko *et al.* 2006). Cette activation de la survivine est également impliquée dans la transformation maligne des lymphomes des séreuses (ou PEL) (Aoki *et al.* 2003).

c) Activation de c-IAP2

La protéine c-IAP2, avec c-IAP1 et XIAP, inhibe directement certaines caspases (caspase-3 et caspase-7) (Salvesen and Duckett 2002). Une étude, portant sur la régulation de l'apoptose dans les cellules épithéliales intestinales révèle que la phosphorylation de STAT3 sur les résidus tyrosine et sérine est augmentée lorsque ces cellules sont déplétées en polyamines. Les polyamines sont impliquées dans la prolifération, la différenciation, la migration et l'apoptose, induite par le TNF- α ,

dans les cellules épithéliales intestinales (Gerner and Meyskens 2004). Par conséquent une diminution de polyamines active STAT3 qui stimule à son tour des protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2, Mcl-1 et c-IAP2. De cette manière, via l'activation de STAT3, l'activation des caspases est inhibée et les cellules sont protégées de l'apoptose induite par le TNF- α (Bhattacharya *et al.* 2005).

4. STAT3 inactive des gènes apoptotiques pour favoriser la prolifération cellulaire

La voie de mort Fas/Fas ligand (FasL) est un important médiateur de l'apoptose. La dérégulation de cette voie est impliquée dans l'échappement des cellules cancéreuses mammaires et dans la résistance aux traitements anti-cancéreux. Un défaut de cette voie de signalisation apoptotique favorise la survie des cellules cancéreuses pour conduire vers la tumorigenèse (Toillon *et al.* 2002).

L'implication de STAT3 dans l'inhibition de l'expression de Fas est montrée en 2001 par l'équipe de Ronai. Le rôle de STAT3 et de c-Jun dans la suppression de la transcription de Fas et l'apoptose due à l'expression de FasL à la surface de la cellule a été démontré dans plusieurs lignées cellulaires de mélanomes humains et murins. L'utilisation de cellules STAT3^{+/-} et c-Jun^{-/-} a permis d'observer une augmentation de l'expression de Fas, qui peut être ensuite réduite par une réexpression de STAT3 et de c-Jun. Des expériences de CHIP ont ensuite montré qu'en réponse à un traitement UV, il y a une diminution de la liaison de STAT3 et une perte de c-Jun sur le promoteur de Fas, ce qui coïncide avec une augmentation de la transcription de Fas et une induction de l'apoptose. Il a déjà été montré que STAT3 coopère avec c-Jun pour former un hétérodimère et activer l'expression de l' α 2-macroglobuline en se fixant sur son promoteur (Zhang, Wrzeszczynska *et al.* 1999). Ils montrent, dans leur modèle, que la coopération entre STAT3 et c-Jun est nécessaire pour permettre une diminution de la transcription de Fas et donc pour favoriser la survie cellulaire aux dépens de l'apoptose (Ivanov *et al.* 2001). Le facteur de transcription STAT3 est connu pour activer la transcription de ses gènes cibles. Néanmoins cette étude montre qu'il peut également avoir un rôle d'inhibiteur de la transcription afin de favoriser la prolifération cellulaire.

Des études ont donc été menées sur différents inhibiteurs ou des petits ARN interférents (siRNA) dirigés contre STAT3. En 2010, un siRNA dirigé contre le facteur de transcription dans les cellules cancéreuses du sein révèle qu'une perte de STAT3 inhibe la croissance de ces cellules et induit l'apoptose. Plus précisément, cette diminution de l'activité de STAT3 augmente l'expression de Fas et de son ligand, mais également la libération de cytochrome c et de SMAC dans le cytoplasme, activant la mort de la cellule par apoptose et permettant la régression de la tumeur mammaire (Kunigal *et al.* 2009).

Cette partie a donc permis de montrer le rôle essentiel de STAT3 dans la survie de la cellule tumorale. Trois principaux mécanismes lui permettent de jouer ce rôle : l'activation de protéines anti-apoptotiques et des protéines de survie mais également l'inhibition de médiateur de l'apoptose. La mise en place de ces mécanismes par STAT3 permet à la cellule tumorale d'échapper au programme de mort cellulaire par apoptose.

F. Les Fonctions de STAT3 dans la mitochondrie

La transformation cellulaire implique non seulement un contrôle dérégulé de la prolifération cellulaire mais également des ajustements du métabolisme énergétique afin d'alimenter la division et la croissance de la tumeur. Sous des conditions aérobies, la cellule normale transforme le glucose en pyruvate, via la glycolyse dans le cytosol puis en dioxyde de carbone dans la mitochondrie. Sous des conditions anaérobiques, la glycolyse est favorisée et peu de pyruvate est envoyé à la mitochondrie, consommatrice d'oxygène. Otto Warburg a été le premier à observer un métabolisme énergétique anormal dans le cancer (Warburg 1956; Warburg 1956).

Quelques tumeurs peuvent contenir deux sous-populations de cellules cancéreuses qui diffèrent dans leurs voies énergétiques. Une sous-population est constituée de cellules dépendantes du glucose (nommé "Effet Warburg") qui sécrètent le lactate. La seconde sous-population importe et utilise préférentiellement le lactate produit par les cellules voisines comme principale source d'énergie, via le cycle de Krebs (Feron 2009).

Il a également été mis en évidence que STAT3, connu pour favoriser la transformation cellulaire, est capable de promouvoir la phosphorylation oxydative dans la mitochondrie.

Quelques études ont montré que le facteur de transcription STAT3 pouvait être retrouvé dans la mitochondrie (Gough *et al.* 2009; Wegrzyn *et al.* 2009) en réalisant des fractionnements cellulaires et des centrifugations différentielles. Cependant, le mécanisme d'importation nucléaire de STAT3 dans la mitochondrie n'est pas encore connu. Nancy C. Reich a émit deux hypothèses, dans une revue publiée en 2009 (Reich 2009) :

L'import mitochondrial pourrait être médié par un mécanisme non connu d'import d'ARNm ou en association avec une protéine chaperonne comme Hsp70 (*Heat Shock Protein 70*) ou Hsp90, comme l'ont proposé Neupert et Herrmann (Neupert and Herrmann 2007).

La deuxième hypothèse est que STAT3 entrerait dans la mitochondrie avec une sous-unité du complexe I mitochondriale, GRIM-19.

Il a été montré que GRIM-19 était impliqué dans la mort cellulaire dans de nombreuses lignées tumorales mammaires en réponse à l'IFN β et à l'acide rétinoïque (Hofmann *et al.* 1998). D'autres travaux ont mis en évidence que l'homologue bovin de GRIM-19 était co-purifié avec le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale (NADH-Ubiquinone oxydo-réductase) à partir du cœur de l'animal (Fearnley *et al.* 2001). Puis en réalisant un criblage de STAT3 par double hybride réalisé dans la levure, il a été observé que GRIM-19 était une protéine interagissant spécifiquement avec STAT3. Cette protéine a alors été décrite comme un régulateur négatif de l'activité de STAT3 (Lufei, Ma *et al.* 2003). Lufei et son groupe ont précisé que GRIM-19 peut interagir avec différents domaines de STAT3, comme le domaine coiled-coil et le domaine de liaison à l'ADN, cependant aucune interaction n'est détectée entre GRIM-19 et les domaines N-terminal, SH2 et C-terminal de STAT3. Cependant, l'équipe de Kalvakolanu a contredit ces résultats en remarquant que même si GRIM-19 est capable de se fixer au domaine de liaison à l'ADN, il n'empêche ni l'activation ni la liaison à l'ADN de STAT3. En réalisant des mutations des différents domaines de STAT3, ils ont observé que le domaine TAD était nécessaire à la liaison de GRIM-19. De plus, le mutant S727A, résidu présent dans ce domaine, diminue d'environ 95% la capacité de liaison avec GRIM-19. De cette manière, ils ont montré que la phosphorylation de résidu sérine 727 joue un rôle important dans la liaison du facteur de transcription avec GRIM-19 (Zhang *et al.* 2003).

Etant donné que GRIM-19 est un composant de la mitochondrie, et qu'il interagit avec STAT3 pour le réguler négativement, STAT3 pourrait avoir un rôle dans le métabolisme de la mitochondrie.

En 2009, une équipe a montré *in vitro*, sur des lignées cellulaires humaines et *in vivo*, chez la souris au niveau de différents organes (cœur, foie, cerveau et rein), que STAT3 était localisé dans la mitochondrie, et plus précisément au niveau des complexes I et II de la chaîne de transport d'électrons (ETC : *Electron Transport Chain*). Lors de l'utilisation de lymphocytes primaires pro-B STAT3^{-/-}, les activités enzymatiques des complexes I et II sont diminuées de 40 et 85% respectivement, tandis que l'activité enzymatique des trois autres complexes n'est pas modifiée (Wegrzyn, Potla *et al.* 2009).

Afin de mieux comprendre le rôle de STAT3 dans la mitochondrie, les mutants de STAT3 (les mutants phospho-mimétiques Y705F et S727A et le mutant non phosphorylable S727D) ont été transfectés dans les cellules lymphocytaires STAT3^{-/-}. Ces expériences ont révélé que STAT3 joue un rôle de modulateur de la respiration mitochondriale. Les fonctions de STAT3 sur la chaîne

de transport d'électrons, localisée dans la membrane interne de la mitochondrie, ne semblent pas être liées à sa fonction de facteur de transcription.

Un second rapport décrit une fonction de STAT3 mitochondrial dans la transformation cellulaire par l'oncogène Ras en augmentant l'activité de la chaîne de transport d'électrons, en particulier des complexes II et V. Ces deux rôles de STAT3 dans la transformation cellulaire et dans les fonctions de la chaîne respiratoire sont dépendantes de la phosphorylation du résidu sérine 727 (Gough, Corlett *et al.* 2009).

En résumé, ces études proposent que, dans la mitochondrie, STAT3 semble contribuer à la transformation cellulaire dépendante de Ras en augmentant l'activité de la chaîne de transport d'électrons, particulièrement des complexes II et V. La structure requise est complètement différente de celle nécessaire à l'activité transcriptionnelle dans le noyau (figure 13).

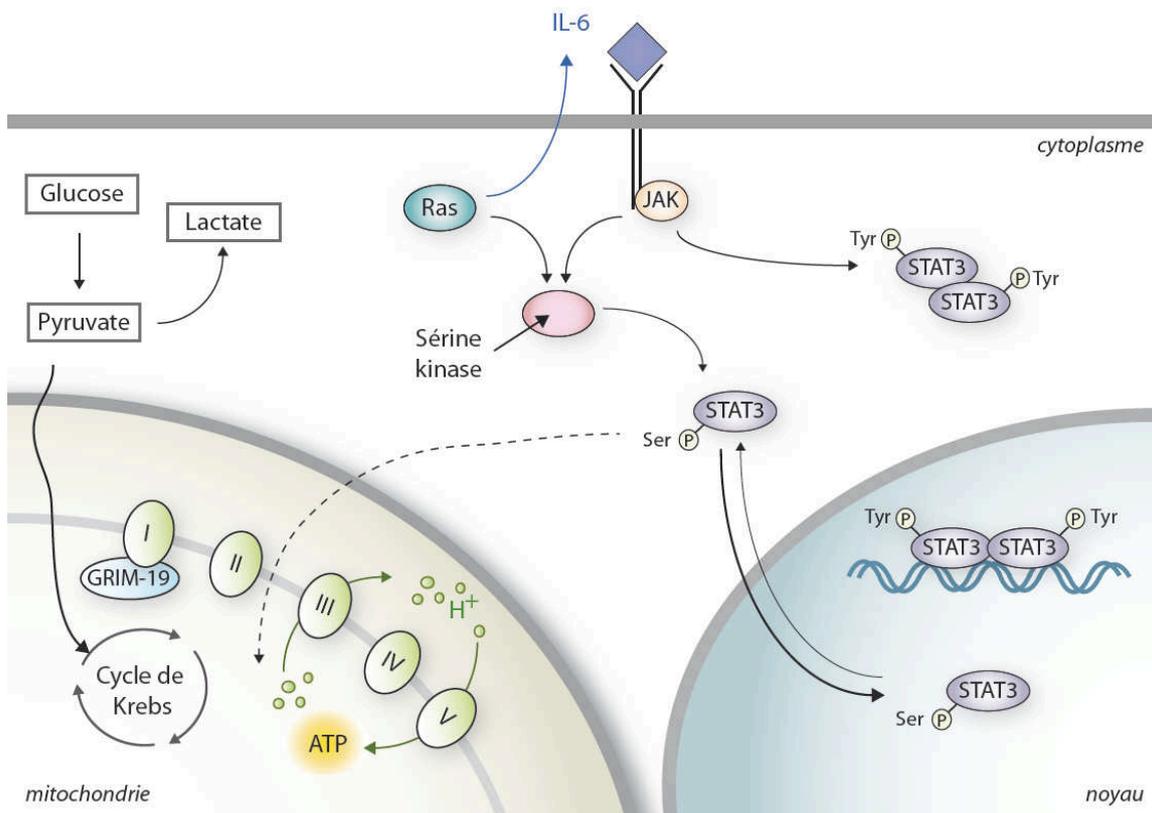


Figure 13 | Représentation de la signalisation de STAT3. STAT3 est continuellement importé et exporté du noyau indépendamment de son état de phosphorylation. L'oncogène Ras peut stimuler la production autocrine d'IL-6. Cette cytokine induit la phosphorylation de la tyrosine 705 de STAT3 permettant sa dimérisation, et sa liaison spécifique à l'ADN. La phosphorylation sur le résidu sérine 727 de STAT3 stimule la chaîne de transport d'électron de la mitochondrie et augmente la transformation par l'oncogène Ras (Reich 2009)

L'altération du métabolisme énergétique, répandue dans les cellules tumorales, se révèle être caractéristique de la transformation d'une cellule normale en une cellule cancéreuse. Ces récentes études suggèrent que l'oncogène STAT3 pourrait également être impliqué dans un cinquième mécanisme favorisant la transformation cellulaire.

RÉSULTATS

BUT DU TRAVAIL



STAT3 est retrouvé constitutivement activé dans de nombreux cancers comme celui de la prostate, du poumon, du cerveau, du sein, de la peau mais également dans le cancer colorectal (Yu and Jove 2004).

L'irinotecan, dont le métabolite actif est le sn38, est souvent utilisé dans le traitement du cancer colorectal en association avec le 5-FU et l'oxaliplatine (Cunningham *et al.* 2004). Il s'agit d'un inhibiteur des topoisomérases de type I qui crée un complexe suicide avec l'ADN et l'enzyme (Pommier 2006). Ce traitement a pour but de bloquer la progression du cycle et induire la sénescence (Hynes and MacDonald 2009). Les traitements génotoxiques entraînant des dommages doubles brins peuvent conduire à une inactivation de p21 et créer une instabilité génétique. Cette instabilité, reconnue par la cellule, peut entraîner une activation du point de contrôle de la phase G2 du cycle cellulaire (Shay and Roninson 2004).

Une étude menée au laboratoire par Arnaud Vigneron, a montré que l'inhibition des topoisomérases de type I par le sn38 activait la voie de signalisation EGFR-Src-STAT3 pour empêcher l'induction de la sénescence mais également pour activer les gènes de réparation des dommages de l'ADN.

Le but de ce travail a été de comprendre le rôle de STAT3 dans la résistance au traitement et dans le cycle cellulaire, plus particulièrement lors de la phase G2 afin d'établir une stratification de STAT3 dans le développement de la tumeur colorectale.

Pour cela, dans un premier temps, nous avons cherché à caractériser la régulation de STAT3, phosphorylé sur son résidu sérine 727, en réponse aux dommages de l'ADN induits par un inhibiteur de topoisomérases de type I, le sn38, dans une lignée cellulaire colorectale.

Dans un second temps, sachant que le traitement au sn38 induit un blocage des cellules pendant la phase G2 du cycle cellulaire, nous nous sommes intéressés à l'activation et au rôle de STAT3 durant cette phase G2 et son point de contrôle. Puis, nous avons déterminé de nouveaux gènes cibles de STAT3.

Pour finir, nous avons souhaité étudier l'état d'activation de STAT3 à différents stades du cancer colorectal, à partir de coupes de tumeurs.

Chapitre 1

La kinase Cdk5 régule le facteur de transcription STAT3 pour empêcher les dommages de l'ADN induits par une inhibition des topoisomérases I

I. Une inhibition des topoisomérases de type I induit la phosphorylation de STAT3 sur son résidu Sérine 727

Afin de savoir si le facteur de transcription STAT3 est activé en réponse à l'inhibition des topoisomérases de type I, les cellules colorectales HT29 sont traitées au sn38, le métabolite actif de l'Irinotecan, puis les deux phosphorylations sont étudiées par la technique de Western blot. Nous observons que STAT3 est phosphorylé sur son résidu sérine 727 en réponse au sn38 (figure 14A, ligne 3 et 4).

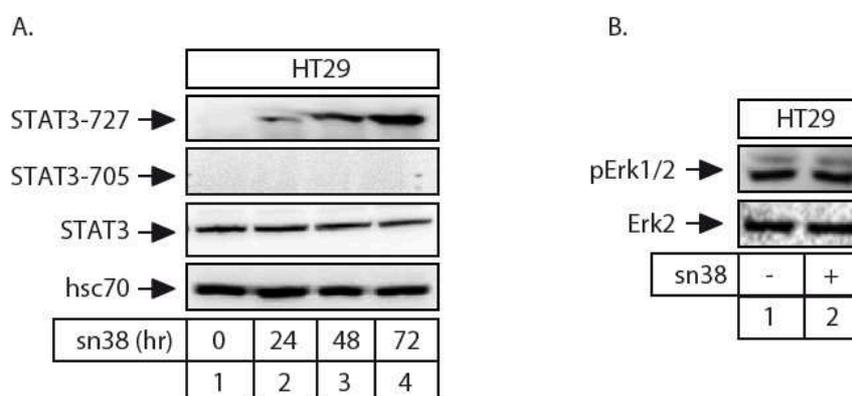


FIGURE 14 | STAT3 est phosphorylé sur son résidu sérine 727 à la suite d'une inhibition des topoisomérases de type I. **A.** Les cellules HT29 sont traitées au sn38 (5ng/mL) pendant les temps indiqués puis les extraits totaux sont analysés par Western blot en utilisant des anticorps dirigés contre les formes phosphorylées sérine 727 et tyrosine 705 de STAT3. Les membranes sont réutilisées pour la forme totale de STAT3 ainsi que pour hsc70, représentant le contrôle de charges (n=3). **B.** Les cellules HT29 sont traitées au sn38 pendant 48h. A partir des extraits cellulaires totaux, l'expression de p-Erk1/2 et de sa forme totale est analysée par Western blot en utilisant des anticorps polyclonaux dirigés contre ces protéines (n=3).

La lignée HT29, utilisée pour notre étude, présente une mutation homozygote sur le codon 273 du gène de p53 conduisant à la substitution de l'acide aminé arginine en histidine et à la modification du domaine de liaison à l'ADN de p53. Du fait de cette mutation, la phosphorylation observée sur la sérine 727 de STAT3 ne semble pas être liée au gène suppresseur de tumeur, p53. Nous avons alors voulu savoir si cette phosphorylation sur le résidu sérine 727 de STAT3 était due à l'activation de la voie des MAPK en réponse au sn38. Nous avons donc, pour cela, traité les cellules HT29 au sn38 puis étudié par Western blot les formes actives de Erk1/2, sérine-thréonine kinases appartenant à la voie des MAPK (figure 14 B, ligne 2). Nous avons constaté que l'expression protéique de Erk1/2 n'est pas modifiée à la suite d'une inhibition des topoisomérases de type I. Par conséquent, la phosphorylation de STAT3 sur la sérine 727 observée après traitement au sn38 n'est due ni au gène suppresseur de tumeur p53, ni à la voie des MAPK.

Néanmoins, nous n'avons pas été capables de détecter la phosphorylation sur le résidu tyrosine 705 en réponse à une inhibition des topoisomérase I. Cette phosphorylation a seulement été observée après une stimulation de 30 minutes à l'IL-6 (Figure 15).

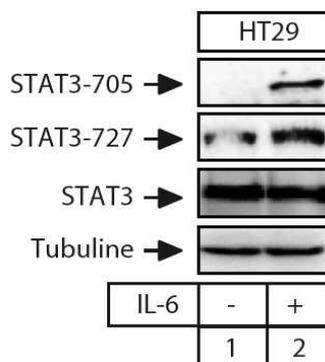


FIGURE 15 | Une stimulation à l'IL-6 induit la phosphorylation des résidus tyrosine 705 et sérine 727 de STAT3. Les cellules HT29 sont privées de sérum pendant 2 jours puis sont stimulées à l'IL-6 (20ng/mL) pendant 30 minutes. L'activation de STAT3 est analysée par Western blot en utilisant des anticorps dirigés contre les formes phosphorylées de la protéine ou contre la forme non phosphorylée de STAT3. Les membranes sont réutilisées pour la tubuline, servant de contrôle de charges (n=5).

Ces résultats nous indiquent, de manière inattendue, que STAT3 est activé en réponse aux dommages de l'ADN, à la suite d'une inhibition des topoisomérase de type I. Or la phosphorylation de STAT3 est principalement connue pour avoir lieu durant la phase G1 du cycle cellulaire et en réponse à une stimulation de cytokines ou de facteurs de croissance.

Nous nous sommes alors intéressés sur l'effet de ce traitement sur la lignée cellulaire HT29. Par des études de clonogénicité, nous avons montré que le traitement au sn38 inhibe la prolifération des cellules (Figure 16A). En parallèle, une analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux, en marquant l'ADN à l'aide de l'iodure de propidium, met en évidence que cet arrêt de prolifération est dû à un blocage du cycle cellulaire pendant la phase G2 après 48h de traitement. Cependant, nous avons observé qu'une fraction des cellules meurent par apoptose. Cette population est caractérisée par la quantité de cellules présentes en subG1 (Figure 16B).

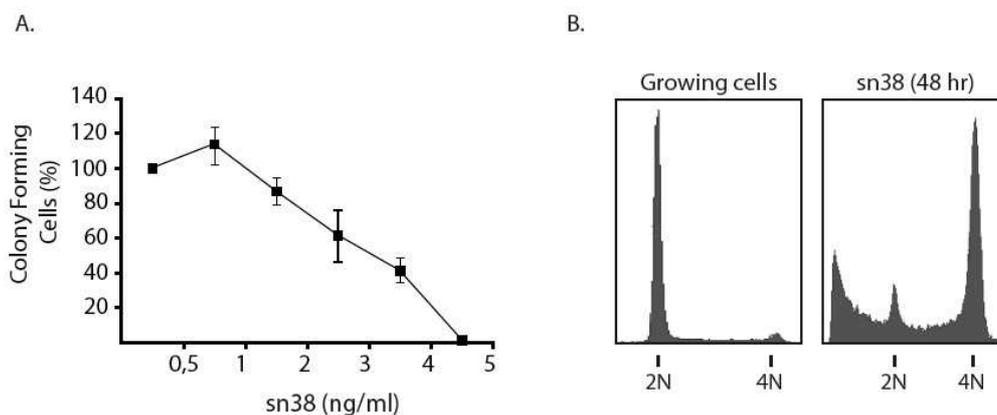


FIGURE 16 | STAT3 est phosphorylé sur son résidu sérine 727 durant un arrêt en phase G2 du cycle cellulaire. **A.** Les cellules HT29 sont traitées ou non avec différentes concentrations de sn38 pendant 12 jours. Les colonies formées sont comptées à l'aide d'un microscope inversé et la croissance des cellules non traitées est établie à 100%. La survie des clones est ensuite obtenue de manière relative par rapport aux cellules en croissance ($n=5 \pm SD$). **B.** Les cellules HT29 sont traitées au sn38 (5ng/mL) pendant 48h puis le contenu en ADN et l'apoptose sont analysés par cytométrie en flux ($n=5$).

Afin de déterminer si la phosphorylation de STAT3 sur son résidu sérine 727 est due à l'induction de l'apoptose, nous avons étudié cette phosphorylation dans les cellules HCT116, une lignée colorectale différente dont la voie p53-p21^{waf1} n'est pas inactivée. Etant donné que cette voie de p53 est intacte, ces cellules sont capables d'entrer en sénescence. Nous avons donc tout d'abord vérifié par cytométrie en flux que les cellules HCT116 présentaient un blocage en phase G2 du cycle cellulaire, en réponse à une inhibition des topoisomérases de type I (figure 17A). Puis nous avons cherché à comprendre l'effet de ce blocage sur ces cellules. Pour cela, nous avons étudié la sénescence et la catastrophe mitotique à la suite d'un traitement au sn38 (figure 17B). La sénescence est caractérisée par un biomarqueur, la SA- β -Gal (Senescence Associated- β -Galactosidase). Par un test enzymatique, nous comptons le nombre de cellules sénescents présentant une activité β -Galactosidase. La catastrophe mitotique est mise en évidence par comptage du nombre de cellules présentant des micronoyaux. Ces deux techniques nous permettent d'affirmer que les cellules HCT116, en réponse au sn38 et à un arrêt pendant la phase G2, entrent en sénescence mais présentent également une catastrophe mitotique plus importante.

Ces résultats confirment que l'inhibition des topoisomérases de type I dans les cellules HCT116 n'induit pas l'apoptose, mais la sénescence et la catastrophe mitotique. Par conséquent, nous avons voulu savoir si la phosphorylation de la sérine 727 de STAT3 est due au traitement utilisé et non à l'apoptose. Nous avons donc réalisé un Western blot de cette forme phosphorylée dans les cellules HCT116. La figure 17C montre que l'inhibition des topoisomérases de type I induit la phosphorylation de STAT3 sur son résidu sérine 727.

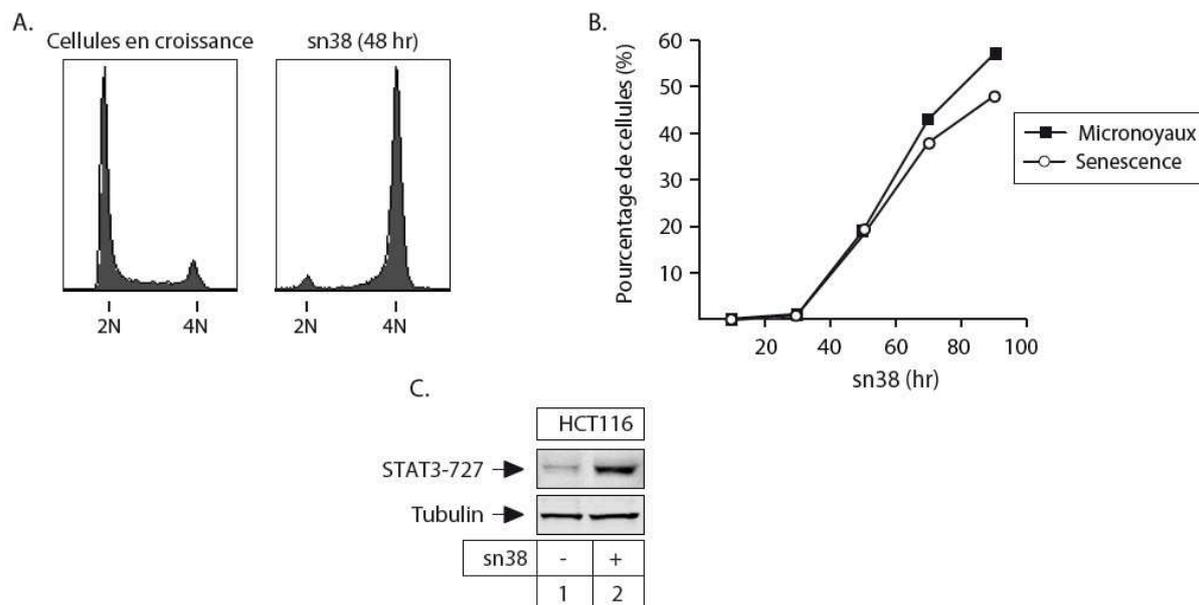


FIGURE 17 | STAT3 est phosphorylé sur la sérine 727 pendant un arrêt en phase G2 du cycle cellulaire dans la lignée cellulaire HCT116. **A.** Le contenu d'ADN des cellules HCT116 est analysé par cytométrie en flux en réponse au sn38. **B.** En parallèle, les cellules HCT116 sont traitées ou non au sn38 pendant les temps indiqués. Le pourcentage de cellules sénescents est évalué par le nombre de cellules exprimant une activité SA-β-Gal et présentant des micronoyaux. **C.** Les cellules HCT116 sont traitées au sn38 puis l'expression de STAT3 phosphorylé sur la sérine 727 est analysée par Western blot en utilisant un anticorps polyclonal dirigé contre la protéine. La tubuline est utilisée en contrôle de charge.

Ainsi, cette étude suggère que la phosphorylation de STAT3 sur son résidu sérine 727 n'est pas due à l'apoptose et indique que cette modification n'est pas spécifique d'une lignée cellulaire. De plus, ces expériences mettent en évidence que le facteur de transcription est phosphorylé sur la sérine 727 en réponse à une inhibition des topoisomères I.

II. L'expression de la kinase Cdk5 est augmentée à la suite d'une inhibition des topoisomères I.

À la vue des résultats obtenus précédemment, nous avons alors voulu savoir quelle kinase est responsable de la phosphorylation de STAT3 sur le résidu 727 en réponse à une inhibition des topoisomères I. Après une recherche bibliographique, nous avons sélectionné la kinase Cdk5. En effet, il a été montré que cette kinase Cdk5 est impliquée dans le processus de sénescence (Yang and Hinds 2003; Mao and Hinds 2010) mais également dans la réponse aux dommages de l'ADN (Tian *et al.* 2009; Huang *et al.* 2010). De plus l'équipe de Ip NY a montré en 2004, que Cdk5 régule STAT3, dans les neurones et les muscles (Fu *et al.* 2004).

Cdk5 appartient à la famille des Cdk5 sérine/thréonine kinases. Comme les autres Cdk5, Cdk5 a besoin de s'associer à un partenaire pour son activation. Deux activateurs de Cdk5, p35 et p39, ont été identifiés. La simple interaction avec ses partenaires permet d'induire son activité kinase. Néanmoins, l'activité maximale de Cdk5 nécessite la phosphorylation du résidu thréonine 160 au niveau de sa boucle d'activation. Une deuxième phosphorylation du résidu tyrosine 15 augmente l'activité kinase de Cdk5 (Dhavan and Tsai 2001).

Nous avons donc voulu savoir, dans un premier temps, si Cdk5 était activée à la suite d'une inhibition des topoisomérases I. Pour cela nous avons réalisé un Western blot pour étudier l'expression protéique de Cdk5 et de son coactivateur p35. De cette manière, nous avons remarqué qu'une inhibition de topoisomérases I induit une augmentation de l'expression de Cdk5, sans modifier l'expression de p35 (figure 18).

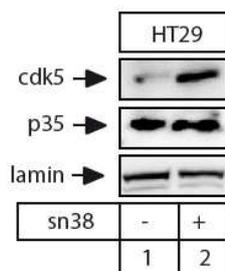


FIGURE 18 | La kinase Cdk5 est activée après une inhibition des topoisomérases I. Les cellules HT29 sont traitées ou non au sn38 (5ng/mL) pendant 48h. Un extrait total est ensuite utilisé pour analyser par Western blot l'expression de Cdk5 et de p35 en utilisant des anticorps polyclonaux dirigés contre ces protéines. La lamine est utilisée en contrôle de charge.

Dans un second temps, nous avons voulu préciser l'activation de Cdk5 à la suite d'une inhibition des topoisomérases I : soit par interaction avec son coactivateur p35, soit par phosphorylation sur son résidu tyrosine 15. Pour cela, nous avons étudié l'interaction entre Cdk5 et p35 en réponse au sn38 avec une coimmunoprécipitation réalisée avec un anticorps dirigé contre p35 ou contre une immunoglobuline de contrôle. Les protéines interagissant avec p35 sont révélées par Western blot avec un anticorps dirigé contre Cdk5. Dans ces conditions, nous avons montré que Cdk5 interagissait avec p35 (figure 19A, ligne 2 comparée à la ligne 4). Il est important de remarquer qu'une faible interaction est détectée dans les cellules en croissance (figure 19A, ligne 1 comparée à la ligne 3), condition pour laquelle Cdk5 n'est pas surexprimé, suggérant le fait que cette interaction n'est pas suffisante pour initier l'activité kinase de Cdk5.

Etant donné que la phosphorylation de Cdk5 sur son résidu tyrosine 15 permet d'augmenter son activité kinase, nous avons réalisé un Western blot de la forme phosphorylée de la

tyrosine 15 de Cdk5 sur une cinétique de traitement au sn38. Nous avons observé que Cdk5 était phosphorylé sur son résidu tyrosine 15 après 48 et 72h de traitement (figure 19B, ligne 3 et 4).

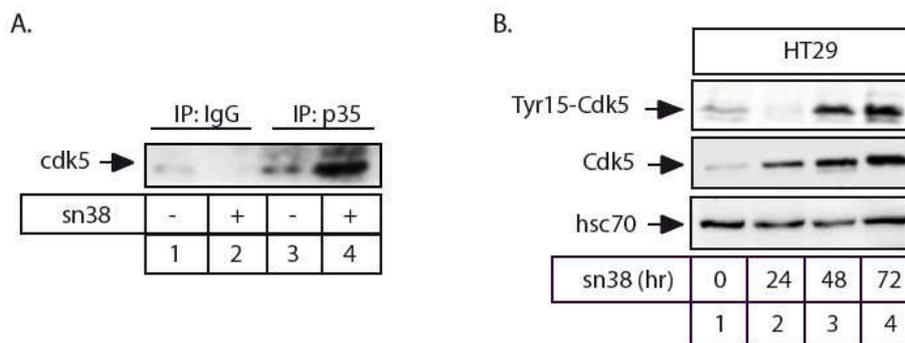


FIGURE 19 | L'inhibition des topoisomérases I induit l'activation de Cdk5 via son coactivateur p35 et par phosphorylation sur son résidu tyrosine 15. **A.** Les cellules HT29 sont traitées ou non au sn38 (5ng/mL) pendant 48h, les extraits sont immunoprécipités avec un anticorps polyclonal dirigé contre p35 ou contre une immunoglobuline contrôle. Les échantillons sont ensuite analysés par Western blot utilisant un anticorps polyclonal dirigé contre Cdk5. **B.** Les cellules HT29 sont traitées au sn38 (5ng/mL) pendant les temps indiqués. Un extrait total est ensuite utilisé pour analyser par Western blot l'expression de Cdk5 et de sa forme phosphorylée en utilisant des anticorps polyclonaux dirigés contre ces protéines. hsc70 est utilisée en contrôle de charge.

L'ensemble de ces résultats ont donc montré que Cdk5 était exprimé et activé après inhibition des topoisomérases I. Cette kinase pourrait, par conséquent, être responsable de la phosphorylation de STAT3 sur son résidu sérine 727.

III. La kinase Cdk5 interagit avec STAT3 et le phosphoryle sur la sérine 727 à la suite d'une inhibition des topoisomérases I.

A. Cdk5 interagit directement avec STAT3 au niveau de son domaine de transactivation

Pour savoir si Cdk5 est la kinase qui phosphoryle STAT3 sur son résidu sérine 727 en réponse à une inhibition des topoisomérases I, nous avons dans un premier temps voulu savoir si Cdk5 était capable de se lier à STAT3.

Pour cela nous avons traité les cellules HT29 au sn38 pendant 48h, puis nous avons réalisé une coimmunoprécipitation de STAT3 accompagné d'un Western blot dirigé contre Cdk5. Dans ces conditions, nous avons remarqué que la kinase Cdk5 interagissait avec STAT3 (Figure 20A). Pour confirmer cette interaction, nous avons réalisé un Pull-Down à partir de STAT3 contenant une étiquette de six histidines produits en système procaryote, avec production de la forme totale de la protéine ou de la forme tronquée de STAT3 (des acides aminés 716 à 770) correspondant au

domaine de transactivation de STAT3 et nommé STAT3 Δ 1-716 (Figure 20C). Ces protéines STAT3 sont immobilisées sur des billes de nickel-agarose et incubées avec un extrait total de HT29 traitées ou non au sn38. De cette manière, nous avons trouvé que la kinase Cdk5 endogène interagissait aussi bien avec la forme totale de STAT3 qu'avec la forme tronquée (STAT3 Δ 1-716) (Figure 20B, lignes 3 et 4). De plus, il est important de noter que cette interaction n'est possible qu'après une inhibition des topoisomérases I (Figure 20B, en comparant les lignes 1-2 avec les lignes 3-4).

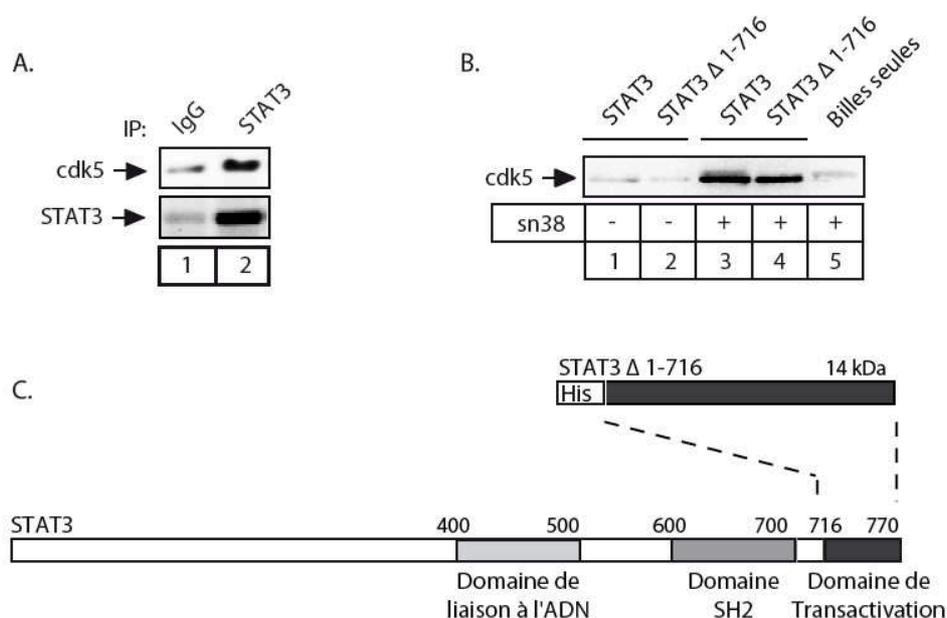


FIGURE 20 | L'inhibition des topoisomérases I induit l'interaction de Cdk5 avec STAT3 au niveau de son domaine de transactivation. **A.** Les cellules HT29 sont traitées au sn38 (5ng/mL) pendant 48h, les extraits sont immunoprécipités avec un anticorps polyclonal dirigé contre STAT3 ou contre une immunoglobuline contrôle. Les échantillons sont ensuite analysés par Western blot utilisant un anticorps polyclonal dirigé contre Cdk5. **B.** Un extrait total (300 μ g) traité ou non au sn38 (5ng/mL) pendant 48h, est incubé avec la forme totale de STAT3 ou sa forme tronquée (STAT3 Δ 1-716) ou encore avec des billes de nickel-agarose (400 ng). Le Cdk5 fixé à STAT3 est révélé par un Western blot en utilisant un anticorps polyclonal dirigé contre la protéine. **C.** Représentation schématique de la protéine de fusion utilisée pour la technique de Pull Down.

B. Cdk5 phosphoryle STAT3 sur son résidu sérine 727 en réponse à une inhibition des topoisomérases de type I.

Etant donné, qu'il a déjà été montré, par l'équipe de Ip NY en 2004, que la kinase Cdk5 était responsable de la phosphorylation de STAT3 sur la sérine 727 dans les neurones et les fibres musculaires, et ayant montré précédemment que cette kinase était activée en réponse à une inhibition des topoisomérases I, nous avons voulu déterminer si la kinase Cdk5 était capable de phosphoryler STAT3 sur son résidu sérine 727 dans notre modèle. Pour cela, nous avons utilisé un siRNA dirigé contre Cdk5 puis traité les cellules HT29 avec le sn38.

Nous avons ainsi observé qu'une perte de la kinase Cdk5 entraînait une diminution de la phosphorylation de STAT3 sur la sérine 727, à la suite d'une inhibition des topoisomérase I (Figure 21A, comparer les lignes 3 et 4).

Pour confirmer les résultats obtenus, nous avons réalisé un kinase assay. Pour cela, dans un extrait total de cellules traitées au sn38, nous avons immunoprécipité la kinase Cdk5 et une immunoglobuline de contrôle, puis nous avons incubé cet extrait avec le domaine de transactivation de STAT3 (STAT3 Δ 1-716), contenant une étiquette de six histidines, en présence d'ATP froid, permettant à la kinase de phosphoryler la protéine purifiée. Avec cette technique nous avons mis en évidence que STAT3 est phosphorylé sur son résidu sérine 727 par la kinase Cdk5 (Figure 21B).

Cependant, il est important de remarquer qu'une perte de Cdk5 ne supprime pas la totalité de la phosphorylation du résidu sérine 727 de STAT3. Il est donc probable que d'autres sérine-thréonine kinases soient impliquées dans la phosphorylation de STAT3.

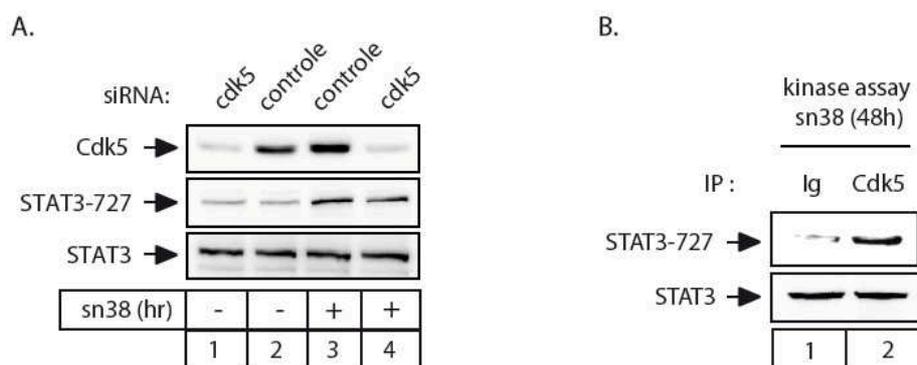


FIGURE 21 | Cdk5 phosphoryle STAT3 sur son résidu sérine 727. **A.** Les cellules HT29 sont transfectées avec un siRNA dirigé contre Cdk5 puis les cellules sont traitées avec le sn38 (5ng/mL) pendant 48h. L'expression de Cdk5, de STAT3 et de sa forme phosphorylée est analysée par Western blot utilisant des anticorps polyclonaux dirigés contre ces protéines. **B.** Un extrait total traité au sn38 (5ng/mL) pendant 48h est incubé avec un anticorps polyclonal dirigé contre la kinase Cdk5 ou une immunoglobuline contrôle, puis incubé avec la forme tronquée de STAT3 (STAT3 Δ 1-716) pendant 10 min à température ambiante en présence d'ATP froid. La phosphorylation de STAT3 sur le résidu sérine 727 est analysée par Western blot en utilisant un anticorps polyclonal dirigé contre la protéine.

IV. La kinase Cdk5 régule l'activation des gènes cible de STAT3 en réponse à une inhibition des topoisomérases de type I.

A. Cdk5 régule l'activation des gènes cibles de STAT3 impliqués dans la prolifération cellulaire.

De nombreuses études ont montré que le facteur de transcription STAT3 est fortement impliqué dans la progression du cycle cellulaire, par l'intermédiaire de l'activation de ses gènes cibles comme la cycline D1 et c-Myc. Nous avons montré précédemment, qu'à la suite d'une inhibition des topoisomérases I, les cellules sont bloquées durant la phase G2 du cycle cellulaire. Nous nous sommes alors intéressé au rôle de Cdk5 sur les gènes cibles de STAT3, en réponse au traitement.

Pour cela, nous avons d'abord étudié l'expression de l'ARN messager de la cycline D1, ainsi que son expression protéique à la suite d'une inhibition des topoisomérases I. Les figures 22A et 22B montre qu'en réponse au sn38, l'expression de la cycline D1 est diminuée tant au niveau transcriptionnel que traductionnel, néanmoins la phosphorylation de STAT3 sur son résidu sérine 727 est augmentée.

Nous avons mis en évidence précédemment que la kinase Cdk5 phosphoryle STAT3, par conséquent, nous nous sommes demandé si Cdk5 pouvait réguler les gènes de cibles de STAT3 impliqués dans la prolifération cellulaire, à la suite d'une inhibition des topoisomérases I. Nous avons donc étudié l'expression de l'ARN messager de la cycline D1 et c-Myc après un siRNA dirigé contre Cdk5. Dans la figure 22C et 22D, nous avons montré que l'inhibition des topoisomérases I entraînait une diminution de l'expression des ARN messagers de la cycline D1 et de c-Myc. Cependant une perte de l'expression de Cdk5 restaure l'expression de ces deux protéines.

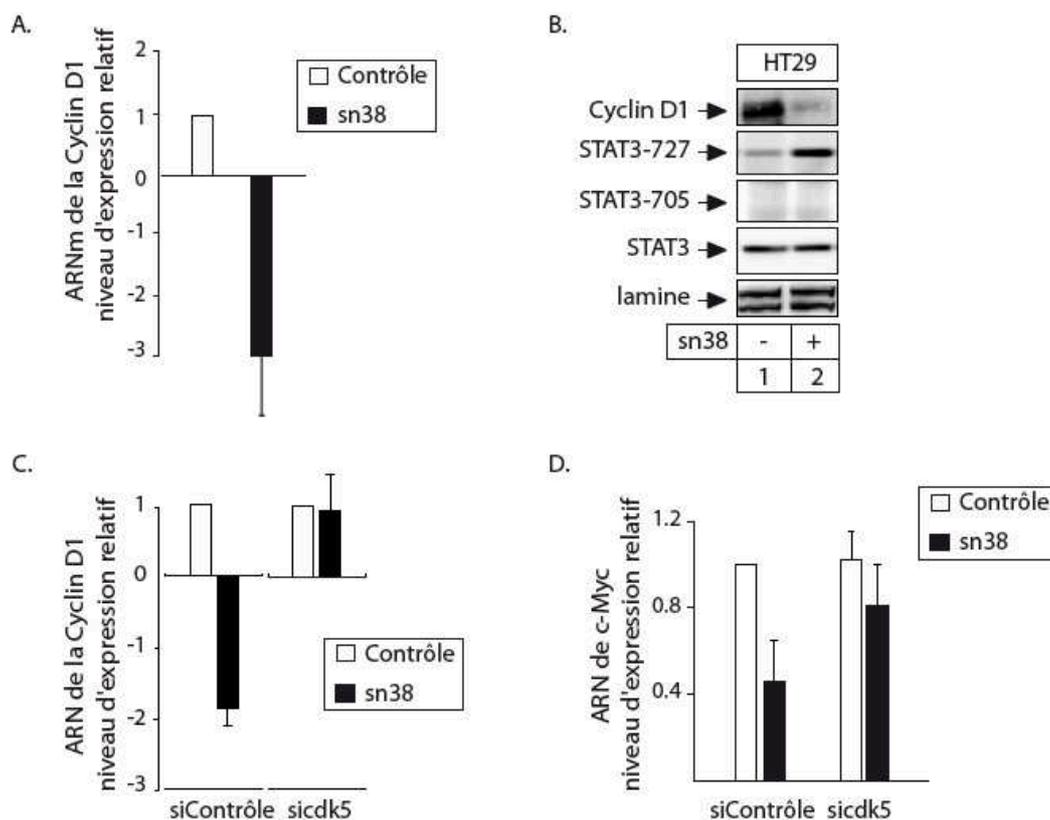


FIGURE 22 | Cdk5 régule les gènes cibles de STAT3 impliqués dans la prolifération cellulaire en réponse à une inhibition des topoisomérases I. **A.** Les cellules HT29 sont traitées ou non avec le sn38 (5ng/mL) pendant 48h puis l'expression de l'ARN messager de la Cycline D1 est étudiée par PCR quantitative en temps réel ($n=3 \pm$ S.D.). **B.** En parallèle l'expression protéique de la Cycline D1, de STAT3 et de sa forme phosphorylée est analysée par Western blot utilisant des anticorps polyclonaux dirigés contre ces protéines. La lamine est utilisée en contrôle de charge ($n=3$). **C et D.** Les cellules HT29 sont transfectées avec un siRNA dirigé contre Cdk5 ou contre une séquence contrôle pendant 48h puis les cellules sont traitées ou non avec le sn38 (5ng/mL) pendant 48h. Enfin l'expression des ARN messagers de la Cycline D1 (**C**) de c-Myc (**D**) est étudiée par PCR quantitative en temps réel ($n=3 \pm$ S.D.).

En réponse au traitement, nous avons donc remarqué que l'expression de la Cycline D1 et de c-Myc est diminuée et que Cdk5 régule, au moins en partie, ces expressions.

Des expériences d'immunoprécipitation de chromatine (ChIP) ont été réalisées pour analyser la fixation de STAT3 sur les promoteurs de la Cycline D1 et de c-Myc. Nous avons confirmé que STAT3 se fixe sur ces promoteurs dans les cellules en croissance, permettant la progression du cycle cellulaire (figure 23A et 23B, lignes 5). Cependant, en réponse à une inhibition des topoisomérases, nous avons observé que STAT3 n'est plus présent sur les promoteurs de la Cycline D1 et de c-Myc (figure 23A et 23B, lignes 5 comparée à la ligne 6). Ceci peut s'expliquer par l'arrêt du cycle cellulaire pendant la phase G2 à la suite d'un traitement au sn38.

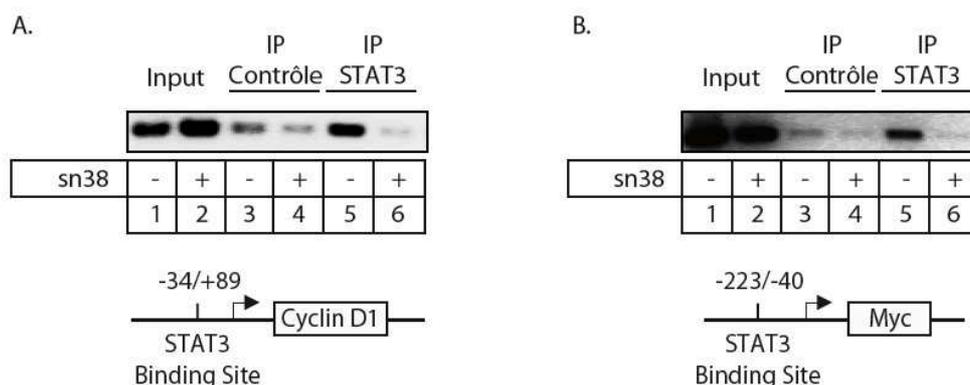


FIGURE 23 | A la suite d'une inhibition des topoisomérases I, STAT3 n'est plus présent sur les promoteurs de la Cycline D1 et de c-Myc. A et B. Les cellules HT29 sont traitées ou non avec le sn38 (5ng/mL) pendant 48h. Une immunoprécipitation de chromatine de STAT3 et d'un anticorps contrôle, Gal4, en utilisant des anticorps polyclonaux dirigés contre ces protéines. Une PCR classique est ensuite réalisée sur les promoteurs de la Cycline D1 (**A**) et de c-Myc (**B**) puis les échantillons sont déposés sur gels d'agarose (n=4).

B. Cdk5 régule l'expression de Eme1 en réponse à l'inhibition des topoisomérases de type I.

Les figures 22 et 23 ont donc montré que la kinase Cdk5 est impliquée dans la régulation des gènes de prolifération, comme la Cycline D1 et c-Myc, en réponse à une inhibition des topoisomérases I et que, dans ces conditions, STAT3 n'est plus présent sur ces gènes. Arnaud Vignerou avait trouvé, au laboratoire, que l'inhibition des topoisomérases I entraînait l'activation de protéines de réparation impliquées dans la recombinaison homologue, comme l'endonucléase Eme1. Il avait également mis en évidence, par immunoprécipitation de chromatine, que STAT3 était impliqué dans cette activation, en réponse au sn38. Nous nous sommes alors demandés si, de la même manière que la Cycline D1 et c-Myc, Cdk5 régulait également l'expression de Eme1 et par voie de conséquence les dommages de l'ADN engendrés par le sn38.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'expression de l'ARN messager de Eme1 et l'implication de Cdk5 dans cette expression, en réponse au sn38 (Figure 24).

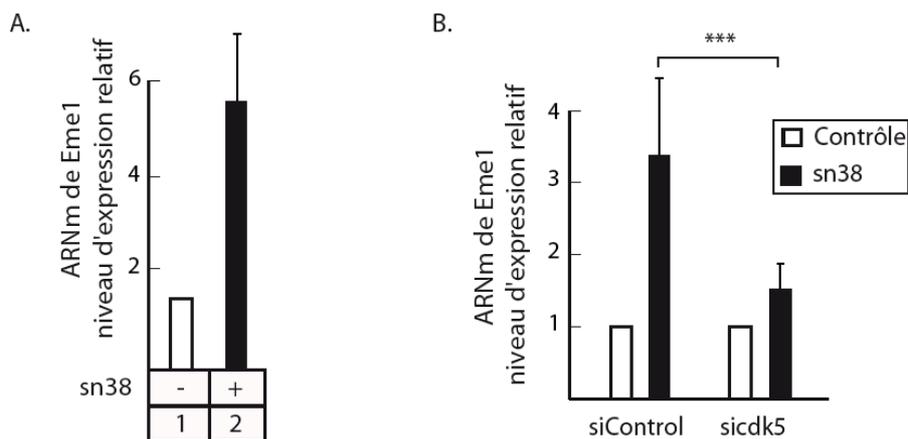


FIGURE 24 | Cdk5 régule l'expression de Eme1 en réponse à l'inhibition des topoisomérases I. **A.** Les cellules HT29 sont traitées ou non avec le sn38 (5ng/mL) pendant 48h puis l'expression de l'ARN messager de Eme1 est étudiée par PCR quantitative en temps réel ($n=3 \pm$ S.D.). **B.** Les cellules HT29 sont transfectées avec un siRNA dirigé contre Cdk5 ou contre une séquence contrôle pendant 48h puis les cellules sont traitées ou non avec le sn38 (5ng/mL) pendant 48h. Enfin l'expression de l'ARN messager de Eme1 est étudié par PCR quantitative en temps réel ($n=3 \pm$ S.D.).

Dans la figure 24A nous avons confirmé les résultats obtenus par Arnaud Vigneron, c'est à dire que l'inhibition des topoisomérases I entraînait une augmentation de l'expression de l'ARN messager de l'endonucléase Eme1. Cependant, dans la figure 24B nous avons montré que cette induction de Eme1 est réprimée en l'absence de la kinase Cdk5. Ces résultats suggèrent que Cdk5 participait à l'activation du système de réparation de la cellule en régulant l'expression de Eme1. Nous avons donc pensé que l'activation de Eme1 dépendait de la voie Cdk5-STAT3. Pour cela, nous avons réalisé une immunoprécipitation de chromatine de STAT3, en utilisant un anticorps dirigé contre la protéine, sur le promoteur de Eme1, au niveau du site de liaison du facteur de transcription (Figure 25).

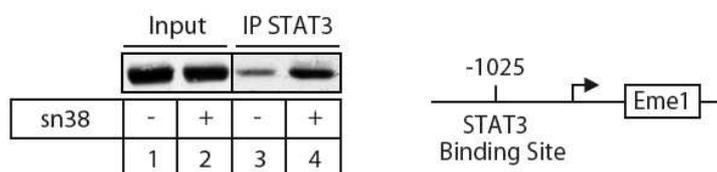


FIGURE 25 | A la suite d'une inhibition des topoisomérases I, STAT3 se fixe sur le promoteur de Eme1. Les cellules HT29 sont traitées ou non avec le sn38 (5ng/mL) pendant 48h. Une immunoprécipitation de chromatine de STAT3, en utilisant un anticorps polyclonal dirigé contre cette protéine. Une PCR classique est ensuite réalisée sur le promoteur de Eme1 ($n=3$).

Nous avons observé que, à l'inverse des gènes de la cycline D1 et de c-Myc, STAT3 est faiblement présent sur le promoteur de l'endonucléase de réparation dans les cellules HT29 en croissance. Mais en réponse à une inhibition des topoisomérases, le facteur de transcription se fixe sur le promoteur de *Eme1* pour induire son expression.

Nous avons ensuite étudié les dommages de l'ADN induits par le sn38 à la suite d'une perte de *Cdk5* ou de *STAT3*. Pour cela, nous avons choisi d'étudier la phosphorylation de l'histone H2AX par cytométrie en flux (Figure 26). En effet, il a été montré que cette histone H2AX est phosphorylée sur le résidu sérine 139 par les kinases ATM-ATR en réponse à des cassures doubles brins induites par des traitements génotoxiques (Burma *et al.* 2001).

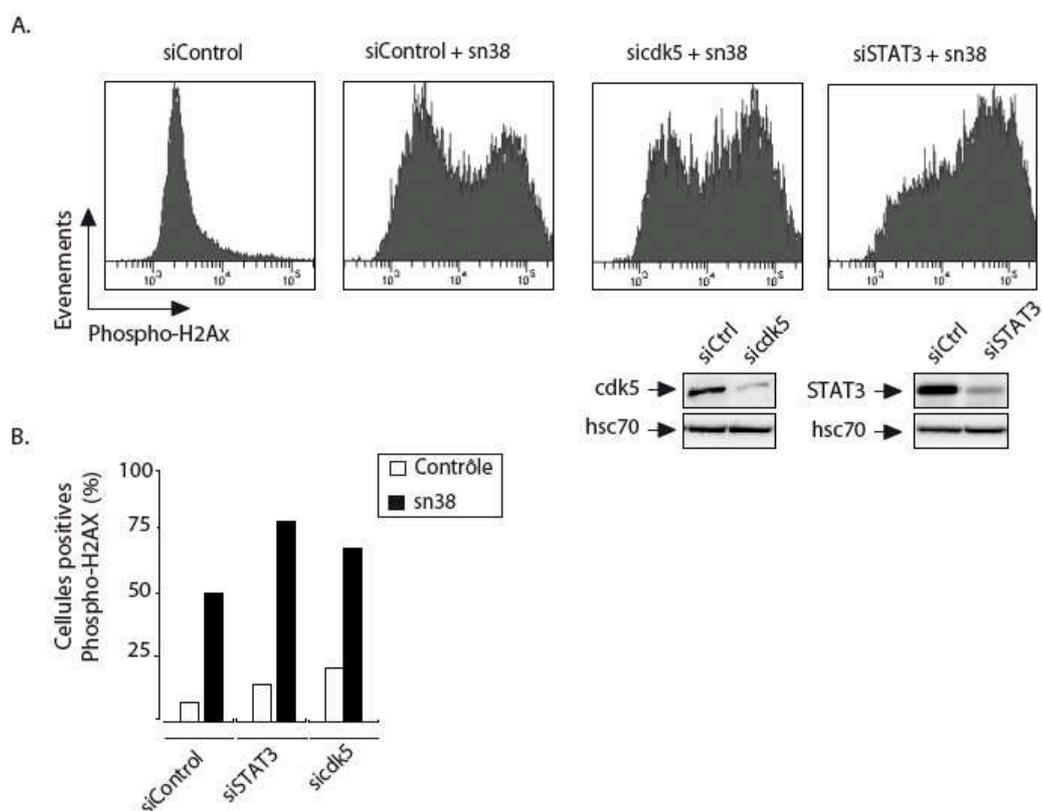


FIGURE 26 | La voie STAT3-Cdk5 réduit les dommages de l'ADN à la suite d'une inhibition des topoisomérases I. A et B. Les cellules HT29 sont transfectées avec un siRNA dirigé contre *Cdk5*, *STAT3* ou contre une séquence contrôle pendant 48h puis les cellules sont traitées avec le sn38 (5ng/mL) pendant 48h. Les cassures doubles brins générées sont quantifiées par cytométrie en flux en utilisant un anticorps dirigé contre la phosphorylation de la sérine 139 de l'histone H2AX (une expérience représentative de trois).

Dans la figure 26, nous avons donc quantifié les cassures doubles brins générées par un traitement au sn38 par analyse de la phosphorylation de l'histone H2AX par cytométrie en flux. Nous avons confirmé, dans un premier temps, qu'un traitement au sn38 induisait des cassures doubles brins. En parallèle, nous avons réalisé un siRNA dirigé contre *Cdk5* ou *STAT3*, puis nous

avons traité les cellules HT29 avec le sn38 afin d'induire les cassures doubles brins. Nous avons observé qu'une perte de la kinase Cdk5 ou du facteur de transcription STAT3 augmentait le nombre de cassures doubles brins.

Ces derniers résultats suggèrent que la voie Cdk5-STAT3-Eme1 permet la réparation des cassures doubles brins induites par une inhibition des topoisomérases I.

V. STAT3 se fixe sur le promoteur de Eme1 lorsqu'il est phosphorylé sur la sérine 727 mais pas sur la tyrosine 705.

En réponse à une inhibition des topoisomérases I, la kinase Cdk5 interagit et phosphoryle STAT3 sur son résidu sérine 727. Nous avons montré que STAT3 se fixe sur le promoteur de Eme1 afin de réparer les cassures doubles brins. Ces observations suggèrent que STAT3 peut fonctionner comme un régulateur transcriptionnel, à la suite de la phosphorylation de son résidu sérine 727 néanmoins sans phosphorylation sur son résidu tyrosine 705. Pour confirmer cette seconde hypothèse, nous avons réalisé des immunoprécipitations de chromatine des deux formes phosphorylées de STAT3 sur le promoteur de Eme1 (Figure 27). Ces expériences sont réalisées dans deux conditions différentes : soit les cellules HT29 en croissance, sont traitées ou non au sn38 pendant 48h (figure 27, lignes 1-4), soit les cellules sont stimulées ou non pendant 30min avec de l'IL-6 après avoir été privées de sérum durant 24h (figure 27, lignes 5-6).

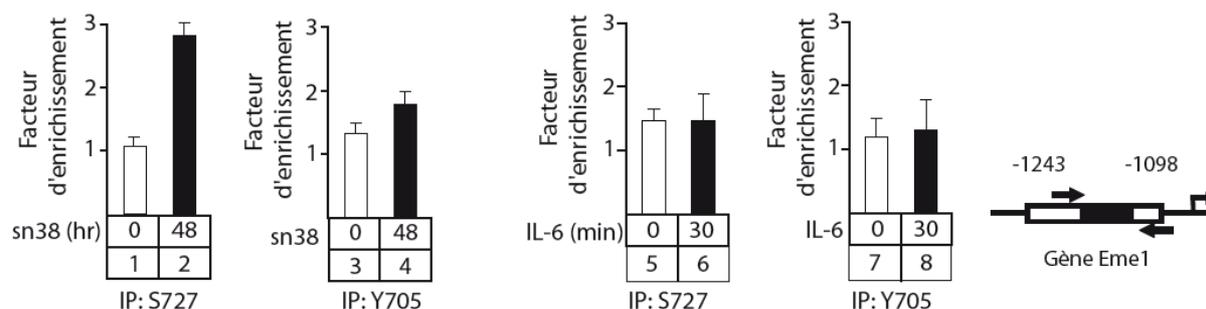


FIGURE 27 | STAT3 est recruté sur le promoteur de Eme1 lorsqu'il est phosphorylé sur son résidu sérine 727. Les cellules HT29 sont traitées ou non avec le sn38 (5ng/mL) pendant 48h. La chromatine soluble est préparée et immunoprécipitée avec des anticorps dirigés contre les formes phosphorylées sur les résidus sérine et tyrosine de STAT3 (lignes 1-4). En parallèle, les cellules sont privées de sérum pendant 24h puis stimulées avec de l'IL-6 pendant 30min. La chromatine est immunoprécipitée dans les mêmes conditions. L'ADN est amplifié en utilisant des amorces couvrant le site de liaison de STAT3 sur le promoteur de Eme1. L'analyse de ChIP est effectuée par PCR quantitative en temps réel en comparant par rapport à une immunoglobuline contrôle et une région contrôle (n=3)

Comme nous l'attendions, nous avons observé dans les cellules en croissance qu'aucune des deux formes phosphorylées de STAT3 n'est présente sur le promoteur de Eme1 (Figure 27, ligne 1 et 3). Néanmoins, après un traitement au sn38, seule la forme phosphorylée sur le résidu sérine 727 est liée au promoteur de Eme1 au niveau du site de liaison de STAT3 (Figure 27, lignes 2 et 4). Lorsque les cellules sont stimulées à l'IL-6, aucune des formes phosphorylées de STAT3 n'est retrouvée sur le promoteur de Eme1. Les mêmes résultats sont obtenus en réalisant une immunoprécipitation de chromatine à partir d'un anticorps dirigé contre la forme totale de STAT3 dans les mêmes conditions. Ces observations suggèrent donc que la forme phosphorylée sur la sérine 727 de STAT3 peut être associée à un gène cible, comme Eme1, sans phosphorylation sur le résidu tyrosine 705. De plus, le promoteur de Eme1 n'est pas une cible du facteur de transcription en réponse à une stimulation de cytokines.

Etant donné que la Cycline D1 et c-Myc sont des gènes cibles connus de STAT3, nous avons alors voulu savoir, de la même manière que Eme1, quelles formes phosphorylées de STAT3 se fixaient sur les promoteurs de ces gènes cibles. Pour cela, nous avons réalisé des immunoprécipitations de chromatine dans les mêmes conditions que la figure 26. La figure 26A est réalisée sur le promoteur de la Cycline D1 tandis que la figure 26B est effectuée sur le promoteur de c-Myc.

Les résultats obtenus sur les promoteurs des gènes de la Cycline D1 et de c-Myc sont totalement différents de ceux obtenus sur le promoteur de Eme1. Dans les cellules HT29 en croissance (Figure 28A et 28B, lignes 1 et 3), STAT3 est phosphorylé sur son résidu tyrosine 705 et est présent sur les promoteurs de ces gènes impliqués dans la prolifération cellulaire. En revanche, lorsque les cellules sont traitées au sn38 (Figure 28A et 28B, lignes 2 et 4), nous n'observons aucune fixation de STAT3 sur ces promoteurs. En parallèle, dans des cellules privées de sérum (Figure 28A et 28B, lignes 5 et 7), STAT3 n'est pas lié aux promoteurs de la Cycline D1 et de c-Myc. Seule une stimulation à l'IL-6 permet la fixation de la forme phosphorylée sur la tyrosine 705 de STAT3 sur ces deux promoteurs (Figure 28A et 28B, lignes 6 et 8).

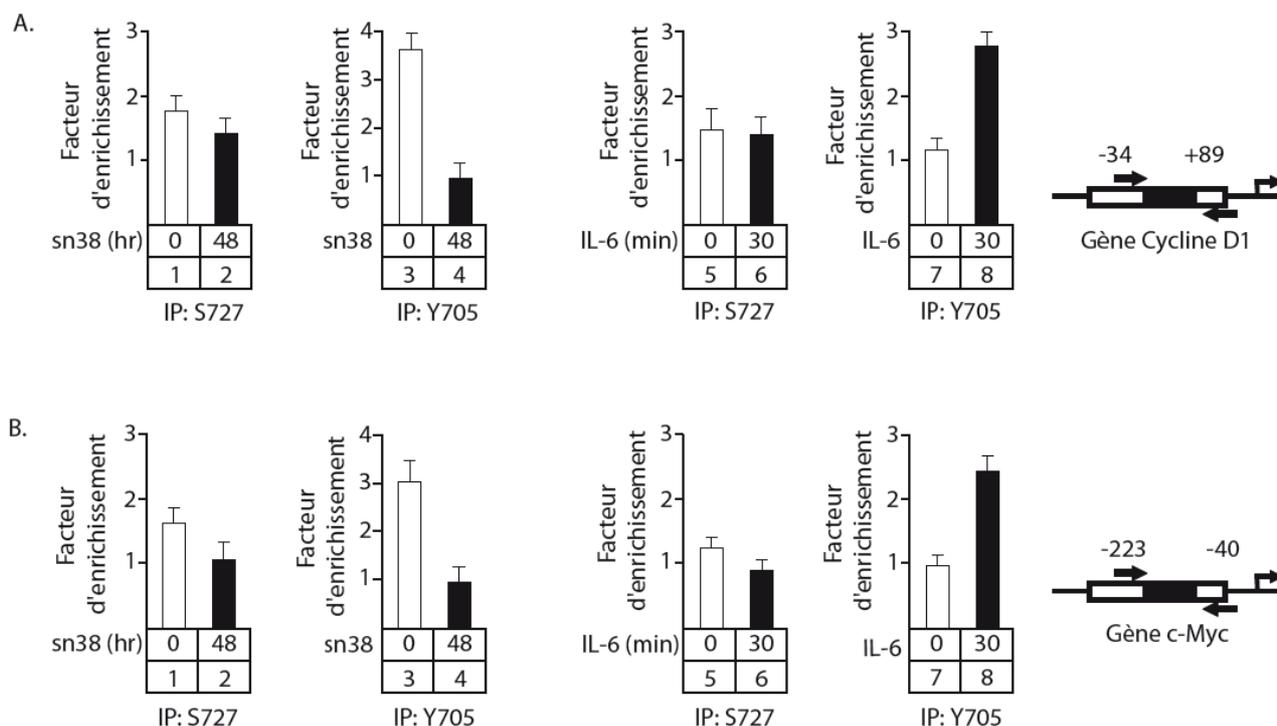


FIGURE 28 | STAT3 est recruté sur les promoteurs de la Cycline D1 et de c-Myc lorsqu'il est phosphorylé sur son résidu tyrosine 705. A et B. Les cellules HT29 sont traitées ou non avec le sn38 (5ng/mL) pendant 48h. La chromatine soluble est préparée et immunoprécipitée avec des anticorps dirigés contre les formes phosphorylées sur les résidus sérine et tyrosine de STAT3 (lignes 1-4). En parallèle, les cellules sont privées de sérum pendant 24h puis stimulées avec de l'IL-6 pendant 30min. La chromatine est immunoprécipitée dans les mêmes conditions. L'ADN est amplifié en utilisant des amorces couvrant le site de liaison de STAT3 sur le promoteur de la Cycline D1 (**A**) et de c-Myc (**B**). L'analyse de CHIP est effectuée par PCR quantitative en temps réel en comparant par rapport à une immunoglobuline contrôle et une région contrôle (n=3).

L'ensemble de ces résultats confirme ceux publiés précédemment par notre laboratoire et par d'autres équipes. Ils ont montré que STAT3 peut activer les gènes de la Cycline D1 et de c-Myc à la suite d'une phosphorylation sur son résidu tyrosine 705 effectuées par les kinases JAK. STAT3 peut alors recruter ses cofacteurs tels que CBP et SRC. Cependant, nous ne sommes pas capables de détecter la forme phosphorylée de la sérine 727 sur ces deux promoteurs. En revanche, en réponse à une inhibition des topoisomérases de type I, seule la phosphorylation sur le résidu sérine de STAT3 est détectée sur le promoteur de Eme1.

Nous savons que, pour être transloqué dans le noyau, STAT3 doit former un dimère. En réponse à des cytokines ou des facteurs de croissance, STAT3 est phosphorylé sur son résidu tyrosine entraînant une modification de sa conformation. Dans les cellules en croissance nous n'avons détecté aucune phosphorylation sur le résidu tyrosine 705 par western blot. En revanche, nous avons réussi à observer la phosphotyrosine 705 en utilisant la technique de CHIP sur les gènes

de la cycline D1 et de c-Myc dans des cellules en croissance, mais cette fixation est perdue à la suite d'une inhibition des topoisomérases de type I. En réponse à des dommages de l'ADN, STAT3 est phosphorylé sur son résidu sérine 727 et pourrait alors s'associer avec un partenaire, lui permettant de se transloquer dans le noyau, de lier le promoteur de Eme1 et d'activer sa transcription. Des explications et des hypothèses concernant ces résultats seront émises lors de la discussion.

VI. Conclusion : La kinase Cdk5 régule le facteur de transcription STAT3 pour empêcher les dommages de l'ADN à la suite d'une inhibition des topoisomérases I.

Dans cette étude nous proposons qu'il existe, dans la cellule, différentes formes de STAT3. L'homodimère, formé par la phosphorylation du résidu tyrosine 705, participe à la formation de l'enhanceosome pour la transcription de gènes impliqués dans la progression de la phase G1 du cycle cellulaire, tandis qu'un dimère formé de STAT3 phosphorylé sur son résidu sérine 727 est impliqué dans la réparation des dommages de l'ADN.

La figure 29 résume l'implication du facteur de transcription dans la prolifération cellulaire en réponse à une stimulation de cytokines mais également dans la réparation des dommages de l'ADN à la suite d'une inhibition des topoisomérases I.

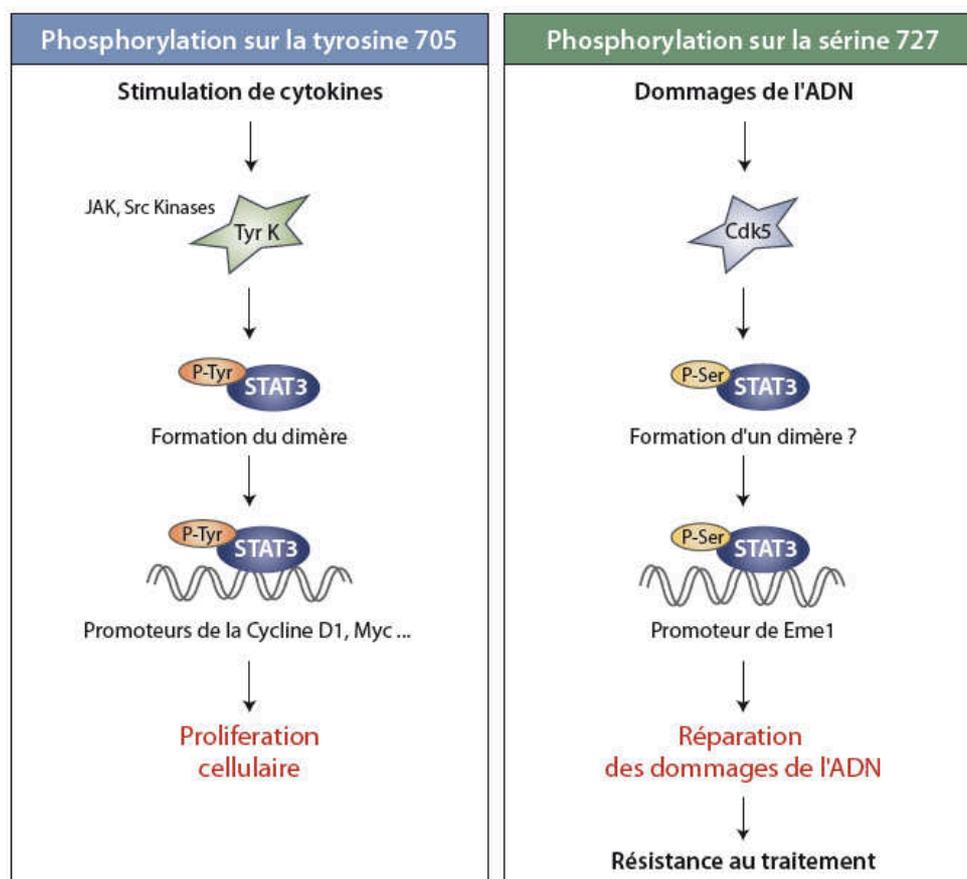


FIGURE 29 | La voie Cdk5-STAT3-Eme1 prévient les dommages de l'ADN en réponse à une inhibition des topoisomérases de type I. Les deux phosphorylations du facteur de transcription lui confère des rôles différents. En réponse à des cytokines, STAT3 est phosphorylé sur son résidu tyrosine 705 puis se fixe sur des gènes impliqués dans la progression de la phase G1 vers la phase S du cycle cellulaire. Parallèlement, des dommages de l'ADN activent la kinase Cdk5 responsable de la phosphorylation de la sérine 727 de STAT3. Le facteur de transcription se lie alors au promoteur de Eme1 pour induire la réparation des dommages entraînant ainsi une résistance au traitement.

The *cdk5* Kinase Regulates the STAT3 Transcription Factor to Prevent DNA Damage upon Topoisomerase I Inhibition*

Received for publication, December 7, 2009, and in revised form, May 10, 2010. Published, JBC Papers in Press, June 1, 2010, DOI 10.1074/jbc.M109.092304

Sandy Courapied¹, H l ne Sellier¹, Sophie de Carn  Tr cession, Arnaud Vigneron, Anne-Charlotte Bernard, Erick Gamelin, Benjamin Barr , and Olivier Coqueret²

From the Paul Papin Cancer Center, INSERM U892, 2 rue Moll, 49933 Angers, France

The STAT3 transcription factors are cytoplasmic proteins that induce gene activation in response to growth factor stimulation. Following tyrosine phosphorylation, STAT3 proteins dimerize, translocate to the nucleus, and activate specific target genes involved in cell-cycle progression. Despite its importance in cancer cells, the molecular mechanisms by which this protein is regulated in response to DNA damage remain to be characterized. In this study, we show that STAT3 is activated in response to topoisomerase I inhibition. Following treatment, STAT3 is phosphorylated on its C-terminal serine 727 residue but not on its tyrosine 705 site. We also show that topoisomerase I inhibition induced the up-regulation of the *cdk5* kinase, a protein initially described in neuronal stress responses. In co-immunoprecipitations, *cdk5* was found to associate with STAT3, and pull-down experiments indicated that it associates with the C-terminal activation domain of STAT3 upon DNA damage. Importantly, the *cdk5-STAT3* pathway reduced DNA damage in response to topoisomerase I inhibition through the up-regulation of *Eme1*, an endonuclease involved in DNA repair. ChIP experiments indicated that STAT3 can be found associated with the *Eme1* promoter when phosphorylated only on its serine 727 residue and not on tyrosine 705. We therefore propose that the *cdk5-STAT3* oncogenic pathway plays an important role in the expression of DNA repair genes and that these proteins could be used as predictive markers of tumors that will fail to respond to chemotherapy.

Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)³ proteins are cytoplasmic transcription factors that translocate into the nucleus following growth factor stimulation. In contrast to normal cells where its phosphorylation is only transient, constitutive activation of STAT3 has been reported in several primary cancers and tumor cell lines (1–3). This abnormal activation is due to oncogenic kinases such as epidermal growth

factor receptor, Her2/Neu, src, or bcr-abl, which induce STAT3 activation through phosphorylation of its tyrosine 705 residue (4). This phosphorylation allows the nuclear translocation and DNA binding of the STAT3 dimer and the up-regulation of several genes involved in cell-cycle and cell survival such as *cyclin D1*, *Myc*, or *bclxl*. The up-regulation of these cancer genes mediates the oncogenic activity of STAT3 and its ability to transform cells (5).

A second phosphorylation occurs on the serine 727 residue of the C-terminal activation domain. It has been proposed that this phosphorylation is necessary for maximal gene activation, because its mutation prevents STAT3 transcriptional function (6). It is believed that this modification favors the recruitment of transcriptional cofactors such as CBP, NcoA, or P-Tefb that binds to the C-terminal domain of the transcription factor (7–10). However, it remains to be determined if the association of STAT3 with its coactivators is a direct consequence of Ser-727 phosphorylation.

Although it was initially believed that the tyrosine phosphorylation is essential for STAT3 activity, several groups have recently reported that specific forms of the transcription factor, which are only phosphorylated on its Ser-727 residue, can induce gene activation. In prostate cancer, Ser-727 phosphorylation is sufficient to activate STAT3 and drive tumorigenesis in the absence of tyrosine 705 activation (11). Elegant results have shown that tyrosine 705 mutants can associate with NF- B and induce the expression of genes such as *mdm2* or *met*, which are likely to play an important role in cell transformation by STAT3 (12–14). These results lead to the important conclusion that the influence of STAT3 on cell transformation can be independent of the tyrosine 705 phosphorylation and that this site should not be considered as a unique marker of STAT3 oncogenic activity.

This conclusion also leads to the hypothesis that STAT3 can induce different transcriptional programs, depending on which sites are phosphorylated and certainly on the type of stimulation. Although STAT3 activation is well characterized in response to growth factor stimulation, little is known about its regulation in response to other stimulation such as DNA damage and chemotherapy treatment. Interestingly, several studies have suggested that an abnormal activation of this transcription factor is associated with intrinsic drug resistance (15). STAT3 expression has been associated with resistance to radiation-induced apoptosis (16–18), and it can also confer resistance to Fas or paclitaxel-mediated apoptosis in multiple myeloma and ovarian cancer (19, 20). Most of the time, escape to drug treatment is related to the STAT3-mediated expression of survival

* This work was supported by fellowships (to S. C. and A. V.), by a grant (Equipe Labelis e) from the Ligue Contre le Cancer and Institut du Cancer, and a fellowship from Inserm-Pays de Loire (to S. C. T.), and by the Minist re de la Recherche (to H. S.).

¹ Both authors contributed equally to this work.

² To whom correspondence should be addressed: Centre R gional de Lutte Contre le Cancer Paul Papin, INSERM U892 2 rue Moll, 49033 Angers, France. Tel.: 33-2-41-35-29-14; E-mail: olivier.coqueret@univ-angers.fr.

³ The abbreviations used are: STAT3, signal transducers and activators of transcription 3; ChIP, chromatin immunoprecipitation; CBP, CREB-binding protein; cdk, cyclin-dependent kinase; siRNA, small interference RNA; PBS, phosphate-buffered saline; RT, reverse transcription; IL-6, interleukin-6; FACS, fluorescent-activated cell sorting.

The *cdk5-STAT3-Eme1* Pathway Prevents DNA Damage

proteins such as bcl-xl or survivin (21, 22). In addition, we have recently shown that the epidermal growth factor receptor-src-STAT3 pathway can prevent senescence induction (23) and activate DNA repair genes (24) to confer resistance to chemotherapy treatments.

In this study, we have further characterized the regulation of STAT3 during DNA damage. In colorectal cell lines, we have found that the transcription factor is phosphorylated on its serine 727 residue following topoisomerase I inhibition and that tyrosine 705 phosphorylation is not modified. In addition, we have also observed that this phosphorylation is due to the binding of the *cdk5* kinase to the transcription factor. *cdk5* is a serine/threonine kinase, which was initially characterized in postmitotic neurons. Once associated with its specific activators p35/p25, this protein plays an important role in neuronal survival, neurite outgrowth, and cytoskeletal functions (25–27). In response to topoisomerase I inhibition, we have observed that *cdk5* is activated and that it interacts with STAT3 to induce its serine phosphorylation. *Cdk5* appeared to be involved in the STAT3-mediated regulation of the *cyclin D1*, *myc*, and *Eme1* genes. Importantly, ChIP analysis showed that the transcription factor can be found associated with the *Eme1* promoter when phosphorylated only on serine 727. We therefore propose that *cdk5* regulates the STAT3-*Eme1* pathway and that this is an important step in the response of colorectal tumors to topoisomerase I inhibition.

MATERIALS AND METHODS

Cell Lines—The human colorectal cell lines HT29 (HTB-38) and HCT116 (CCL-247) (ATCC, Manassas, VA) were cultured in RPMI 1640 medium (Lonza, Walkersville, MD). Cell lines were supplemented with 10% fetal bovine serum (PAA Laboratories GmbH, Austria).

Materials—sn38 came from Pfizer (New York, NY). Polyclonal anti-STAT3 (C20), anti-phospho-STAT3-Ser-727 (ser727-R), anti-*cdk5* (C8), anti-*cdk5* Y15, anti-Erk2 (C14), anti-phospho-Erk1/2 (E4), anti-p35 (C19), anti-lamin A/C (346), anti- β -tubulin (H-235), and hsc70 (B-6) were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). The anti-H2Ax Alexa fluor was obtained from BD Biosciences, and the anti-phospho-STAT3-Tyr 705 was from Cell Signaling. The *cdk5* and STAT3 siRNAs have been obtained from Dharmacon Inc. (Lafayette, CO) and transfected using the Dharmafect 4 (Dharmacon) method. Three different siRNAs were used for each transfection.

Cell Treatment—Cells grown in 3% FBS medium were immediately treated with sn38 (5 ng/ml) for 48 h. Note that this treatment should be done before complete cell adhesion so that every cell can incorporate the drug before entering the next S phase. For siRNA experiment, cells were transfected with the appropriate siRNA using the Dharmafect 4 method and grown up for 48 h in 6-well plates. In 3% FBS medium, cells were then divided into two wells and again immediately treated with sn38 (5 ng/ml) for 48 h.

Immunoprecipitation and Western Blot Analysis—After two washings with cold PBS, cells were lysed in 100 μ l (Western blot) or 1 ml (immunoprecipitation) using ice-cold lysis buffer (25 mM HEPES, pH 7.9, 300 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 10% gly-

cerol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 2 μ g/ml leupeptin, 5 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml pepstatin A, 0.5 M NaF, 100 mM Na_3VO_4). After a 30-min incubation at 4 °C, total extracts were clarified by centrifugation at 12,000 rpm for 10 min.

Immunoprecipitations were performed overnight at 4 °C with whole cell extracts (2–4 mg) in the presence of 0.1 or 1% Nonidet P-40 (CA-630, Sigma). Cell extracts were precleared with 75 μ l of protein G-agarose (Sigma-Aldrich, 50% slurry in phosphate-buffered saline) for 2 h at 4 °C, and cleared extracts were immunoprecipitated with 4 μ g of the indicated antibodies overnight at 4 °C followed by the addition of 50 μ l of protein G-agarose for 1 h at 4 °C. Immunoprecipitated proteins were washed two times in lysis buffer and one time with 10 mM Tris, pH 8, 100 mM EDTA, prior to the addition of sample buffer. Following electrotransfer, membranes (Millipore Corp., Billerica, MA) were blocked for 45 min at room temperature in Tris-buffered saline buffer, 5% bovine serum albumin, 0.05% Tween. Membranes were then incubated overnight with the indicated antibodies diluted in Tris-buffered saline buffer, 1% bovine serum albumin, 0.05% Tween at 4 °C. After three washings, blots were incubated with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody for 45 min. Proteins were detected using an enhanced chemiluminescence system (ECL, Bio-Rad).

Quantitative PCR—RNA was extracted using the TRIzol method (Invitrogen), and complementary DNA was synthesized from 2 μ g of RNA by random hexamer priming using Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Promega, Madison, WI). For cDNA quantification, PCR was performed with 4 μ l of 20 \times diluted cDNA, 5 μ l of Qiamix (Qiagen), and 1 μ l of 5 μ M primers. Accumulation of fluorescent products was monitored on the ABI PRISM 7300 real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA). The relative quantification of gene expression was performed using the comparative C_T method, with normalization of the target gene to the endogenous housekeeping gene RPLPO. RT-PCR primers were as follows: RPLPO (5'-AACCCAGC-TCTGGAGAACT-3' and 5'-CCCCTGGAGATTTTAGTGGT-3'), CD1 (5'-CAGTAACGTCACACGGACTAC-3' and 5'-ACAGGAGCTGGTGTTCAT-3'), *cdk5* (5'-AGCGACA-AGAAGCTGACTTT-3' and 5'-AGAATCCCAGCCCTTTT-AGT-3'), and *Eme1* (5'-AACGCTTCAGGGCTTTGTAA-3' and 5'-GCTCCCTGTTCCCTCTTCT-3').

ChIP—Attached cells were washed twice with cold PBS, cross-linked with 1% formaldehyde at room temperature for 10 min, and then washed twice with 10 ml of cold PBS. Cells were lysed with 500 μ l of lysis buffer (1% SDS, 10 mM EDTA, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.1, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 2 μ g/ml leupeptin, 5 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml pepstatin A, 0.5 M NaF, 100 mM Na_3VO_4), and extracts were sonicated six times for 15 s each. Supernatants were recovered by centrifugation at 12,000 rpm for 10 min at 4 °C, diluted one time in dilution buffer (1% Triton X-100, 20 mM Tris-HCl, pH 8.1, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 2 μ g/ml leupeptin, 5 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml pepstatin A, 0.5 M NaF, 100 mM Na_3VO_4), and subjected to one round of immunoclearing for 2 h at 4 °C using protein-G-agarose coated with salmon sperm DNA (Millipore). Immunoprecipitations were

The *cdk5-STAT3-Eme1* Pathway Prevents DNA Damage

performed overnight with specific antibodies, then 20 μ l of protein G-agarose-coated beads with salmon sperm DNA (50%) was added for 1 h at 4 °C. Beads were then washed for 10 min in TSE1 (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.1, and 150 mmol/NaCl), TSE2 (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.1, and 500 mmol/NaCl), and TSE3 (0.25 M LiCl, 1% Nonidet P-40, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, and 10 mM Tris-HCl, pH 8.1). Beads were washed once with TE buffer (10 mM Tris, pH 8, 100 mM EDTA) and eluted with 500 μ l of elution buffer (1% SDS and 0.1 M NaHCO₃) for 1 h. Eluates were heated at 65 °C overnight, and DNA was precipitated using classic procedures. For PCR, 5 μ l from a 100- μ l DNA preparation was used for 25–30 amplification cycles. The following primers were used: region –34/+89, 5'-CCGGGCTTTGATCTTTGCT-3' and 5'-GACTCTGCTGCTCGCTGCTA-3' of the cyclin D1 promoter; region –2760/–2486, 5'-TTGTGCCACTGCTGACTTTGTC-3' and 5'-AGCCTGAAGAAGGAGGATGTGAGG-3' of the p21 promoter. Myc and Eme1 primers have been described before (24, 28).

Flow Cytometry—For DNA content analysis, 1.5×10^6 cells were washed twice with PBS and fixed in 70% ethanol. Cells were treated with 100 units/ml RNase A for 20 min at 37 °C, then diluted in PBS/propidium iodide (50 μ g/ml), and immediately analyzed by flow cytometry (BD Biosciences). For phospho-H2Ax analysis, 1×10^6 cells were recovered by centrifugation with their supernatant at 1500 rpm for 5 min at room temperature. Cells were fixed with 2% paraformaldehyde at room temperature for 10 min. Cells were then washed twice with PBS and centrifuged at 1500 rpm for 5 min at 4 °C. Cells were incubated with a PBS-2% bovine serum albumin-0.2% Triton solution for 2 min. The primary antibody was diluted at 1/50, and 4',6-diamidino-2-phenylindole (5 μ g/ml) was diluted 500 times. Cells were incubated for 1 h at room temperature and then analyzed by flow cytometry.

Colony Formation Assay—For colony formation assays, 1000 cells were plated per well in 6-well plates, treated with sn38 the next day and allowed to form colonies. After 10–14 days cells were washed twice with PBS and treated with crystal violet for 10 min at room temperature, and then washed five times with water. The percentage of colony-forming cells was calculated as compared with non-treated cells.

Pulldown Assay—Bacteria were grown up in 5 ml of LB medium overnight. 200 ml of ampicillin-LB was inoculated with 2 ml of the overnight culture and grown up until optical density reached 0.6–0.8. Isopropyl 1-thio- β -D-galactopyranoside was then added at 1 mM for 2 h, bacteria were recovered by centrifugation at 4000 rpm for 20 min at 4 °C, resuspended in 8 ml of lysis buffer (50 mM Na₂HPO₄, pH 8, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mg/ml lysozyme), incubated on ice for 30 min and sonicated 6–8 times for 20 s. Triton X-100 was added to the final concentration of 1% and incubated on ice for 15 min. Extracts were recovered by centrifugation at 4000 rpm for 15 min at 4 °C, and supernatants were transferred to a 15-ml conical tube. 250 μ l of beads (nickel-nitrilotriacetic acid-agarose, Qiagen) was added for every 200 ml of initial culture, and extracts were incubated for 1 h at 4 °C. Beads were then washed three times with washing buffer (50 mM Na₂HPO₄, pH 8, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, 1 mM

phenylmethylsulfonyl fluoride). Beads (400 ng of fusion protein) were then incubated for 20 min at 4 °C with cell extracts (300 μ g) and washed three times with lysis buffer (25 mM HEPES, pH 7.9, 300 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 10% glycerol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 2 μ g/ml leupeptin, 5 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml pepstatin A, 0.5 M NaF, 100 mM Na₃VO₄) prior to the addition of sample buffer and Western blot analysis.

Kinase Assay—His- Δ 1–716 STAT3 proteins were produced as described above and eluted from the beads. In parallel, *cdk5* was immunoprecipitated from sn38-treated cells (total extracts, 100 μ g), and 15 μ l of beads was incubated with 1 μ g of His- Δ 1–716 STAT3 at room temperature for 10 min with 10 μ M cold ATP. The reaction was stopped by the addition of 50 μ l of sample buffer. Samples were analyzed by Western blot as described above using a polyclonal antibody directed against the serine-phosphorylated form of STAT3.

RESULTS

STAT3 Is Phosphorylated on Its Serine 727 Residue following Topoisomerase I Inhibition—To determine if the STAT3 transcription factor is involved in the response to DNA damage, growing HT29 colorectal cells were treated with sn38, the active metabolite of irinotecan. Using Western blot analysis, we observed that topoisomerase I inhibition induced the phosphorylation of STAT3 on its serine 727 C-terminal residue (Fig. 1A, lanes 3 and 4). As a control, topoisomerase I inhibition did not affect the expression or phosphorylation of the Erk1/2 kinases (Fig. 1B, lanes 1 and 2). Because p53 is mutated in the HT29 cell line, this effect does not appear to rely on the tumor suppressor gene. Under these conditions, we were not able to detect a significant activation of the tyrosine 705 phosphorylation site, whereas this site was normally phosphorylated upon IL-6 stimulation. When HT29 cells were serum-starved for 2 days and then stimulated with this cytokine for 30 min, a significant activation of the two phosphorylation sites was detected as expected (Fig. 1C, lanes 1 and 2). In addition, when the transcription factor was immunoprecipitated using antibodies directed against its tyrosine 705-phosphorylated form, we observed that STAT3 was phosphorylated on its two sites following IL-6 stimulation. However, we were not able to detect any tyrosine phosphorylation following topoisomerase I inhibition (Fig. 1C, compare lanes 4 and 5). Using Western blot analysis, we observed that this phosphorylation remained non-detectable during the 3 days of treatment, whereas the serine 727 phosphorylation was easily detected and declined at 96 h (Fig. 1D, lanes 1–4 and data not shown). Note, however, that we were able to detect a weak constitutive phosphorylation of the tyrosine 705 site when 600 μ g of total extract was used. By contrast, 50–60 μ g of proteins were used in this study to detect all protein expression and STAT3 serine 727 phosphorylation. Therefore, in our experimental model, the tyrosine-phosphorylated forms of STAT3 are not highly expressed as compared with the ones presenting a phosphorylation on the serine 727 residue.

The activation of STAT3 was surprising, because its phosphorylation theoretically occurs in the G₁ phase of the cell cycle and in response to growth factor stimulation. Under the conditions used in this study, clonogenic assays indicated that sn38

The cdk5-STAT3-Eme1 Pathway Prevents DNA Damage

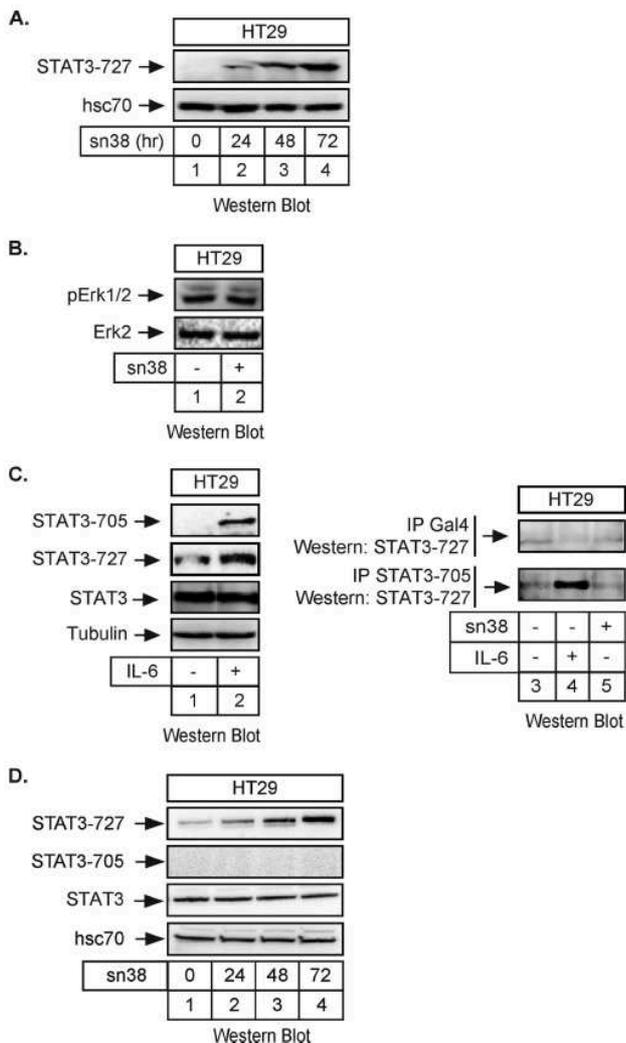


FIGURE 1. STAT3 is phosphorylated on its serine 727 residue following topoisomerase I inhibition. *A*, HT29 cells were treated with sn38 (5 ng/ml) or not for the indicated times. Following stimulation, total cell extracts were prepared, and serine 727 phosphorylation was analyzed by Western blot using polyclonal antibodies directed against the phosphorylated form of the protein. The membrane was reprobed with an antibody directed against hsc70 as a loading control ($n = 5$). Note that, in every experiment, sn38 was added to the cell culture just after cell plating to get an optimal inhibition of cell cycle progression. *B*, HT29 cells were treated with sn38 (5 ng/ml) for 48 h. Following stimulation, cell extracts were prepared and p-Erk1/2 and Erk2 expression was analyzed by Western blot with polyclonal antibodies directed against these proteins ($n = 3$). *C*, HT29 cells were serum-starved for 2 days and stimulated with IL-6 (20 ng/ml) for 30 min. STAT3 activation was analyzed by Western blot using antibodies directed against the different phosphorylated forms of the proteins or against its non-phosphorylated form ($n = 2$). In parallel, whole cell extracts were immunoprecipitated with polyclonal antibodies directed against the tyrosine-phosphorylated form of STAT3 (-705) or control antibodies (Gal4), and samples were then analyzed by Western blot using polyclonal antibodies directed against STAT3 Ser727 ($n = 2$). *D*, HT29 cells were treated with sn38 (5 ng/ml) or not for the indicated times. Following stimulation, total cell extracts were prepared, and the serine 727 and tyrosine 705 phosphorylations were analyzed by Western blot using polyclonal antibodies directed against the phosphorylated forms of the protein. The membrane was reprobed with an antibody directed against STAT3 and then hsc70 as a loading control ($n = 3$).

treatment inhibited cell proliferation, and FACS analysis showed that HT29 cells were arrested in the G₂ phase of the cell cycle after 48 h (Fig. 2A). Because STAT3 phosphorylation is

maximal at 72 h, this event is probably not driving G₂ arrest. To confirm that STAT3 was activated during the G₂ phase of the cell cycle upon DNA damage, FACS experiments were performed using propidium iodide staining conjugated with intracellular staining using phospho-serine 727 antibodies. Cells were treated with sn38 or starved and stimulated with IL-6 as a control. As expected, upon cytokine stimulation, the two main STAT3 phosphorylation sites, serine 727 (and tyrosine 705, data not shown) were detected mainly in cells present in the G₁ phase of the cell cycle. By contrast, serine phosphorylation following sn38 treatment was detected essentially in the G₂ phase of the cell cycle (Fig. 2B).

We noticed that a fraction of HT29 cells died by apoptosis following sn38 treatment as shown by the reproducible presence of a subG₁ propidium iodide staining (Fig. 2A, right panel). This escape to G₂ arrest has been previously reported and is due to the inactivation of the p53-p21^{waf1} pathway in this cell line (29). To determine if STAT3 phosphorylation was due to the induction of apoptosis, we used HCT116 cells, because topoisomerase I inhibition induces senescence in this cell line due to intact p53 signaling. Results presented in Fig. 2C confirm that sn38 induced G₂ arrest and the appearance of cells with multiple micronuclei and an increase in the number of β-galactosidase-positive cells, two hallmarks of senescence induction and mitotic catastrophe. Under this condition, Western blot analysis showed that STAT3 was phosphorylated on its serine 727 residue to the same extent as compared with HT29 cells (Fig. 2C, lanes 1 and 2). This result suggests that the phosphorylation of the transcription factor is not due to apoptosis. Importantly, it also indicates that this effect is not cell line-specific. Altogether, these results indicate that the STAT3 transcription factor is phosphorylated on its serine 727 residue in response to topoisomerase I inhibition.

The cdk5 Kinase Is Up-regulated upon Topoisomerase I Inhibition—We then wanted to determine which kinase is involved in STAT3 phosphorylation upon genotoxic treatment. During the course of these experiments, we have noticed that the expression of the cdk5 kinase was increased in response to topoisomerase I inhibition. Although cdk5 has been essentially characterized in neurons (25), it has been recently shown that this protein is also involved in the response to DNA damage and in the induction of senescence programs (30–33). Interestingly, this kinase has also been shown to regulate STAT3 in neuronal cells (34). Using total cell extracts, Western blot experiments showed that cdk5 expression was significantly enhanced in response to sn38 (Fig. 3A, lanes 2 and 3). As a control, we did not detect any significant activation of p38, although it was phosphorylated as expected in response to the rasV12 oncogene (Fig. 3A, lanes 4–6). To determine if the increased expression of the kinase was regulated at the transcriptional level, cells were treated with sn38, and the level of the cdk5 mRNA was analyzed by quantitative RT-PCR experiments. Results presented Fig. 3B showed that topoisomerase I inhibition had no effect on this mRNA, suggesting that the expression of cdk5 was mainly regulated at the translational level. In neuronal cells, it has been shown that cdk5 is activated following its association with its p35/p25 coactivator (25). Western blot experiments showed that p35 was constitutively expressed in HT29 cells and

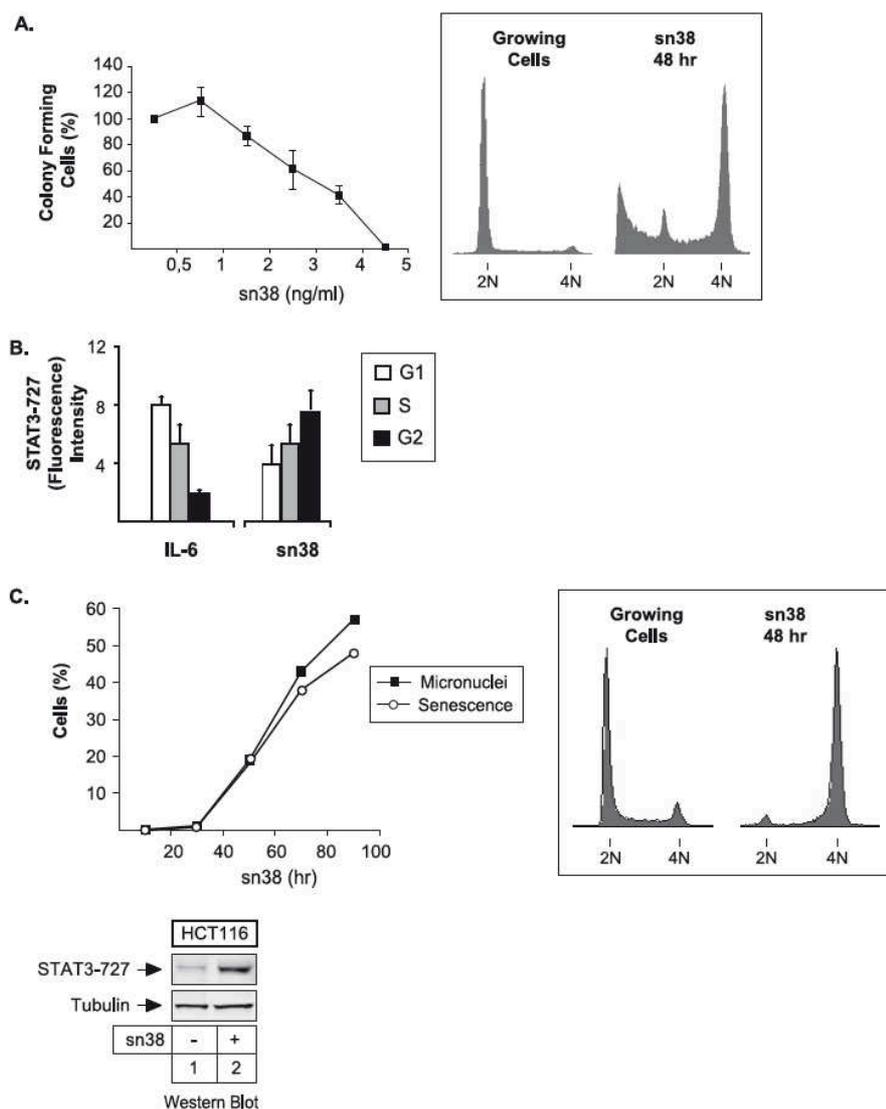
The *cdk5-STAT3-Eme1* Pathway Prevents DNA Damage


FIGURE 2. STAT3 is phosphorylated on serine 727 during G₁ arrest. A, HT29 cells were treated or not with different concentration of sn38 for 10–14 days. Colony formation was then counted using an inverted microscope, and the growth of non-treated cells was set up at 100%. Clonogenic survival was then plotted as a fraction relative to these untreated cells ($n = 5 \pm S.D.$). In parallel, growing HT29 cells were treated with sn38 (5 ng/ml) for 48 h, and DNA content and apoptosis were then evaluated by flow cytometry ($n = 5$). B, HT29 cells were treated with sn38 (5 ng/ml) or IL-6 (20 ng/ml) as indicated, and DNA content and serine phosphorylation were then analyzed by flow cytometry analysis using polyclonal antibodies directed against the serine 727-phosphorylated form of STAT3 ($n = 3$). C, growing HCT116 cells were treated or not with sn38 for different times as indicated. The percentage of senescent cells was evaluated as the number of cells expressing SA- β -gal activity and micronuclei (left part, $n = 3$). In parallel, DNA content was evaluated by flow cytometry after 48 h (right part), and the phosphorylation of STAT3 on its serine residue was analyzed by Western blot as described above ($n = 3$, bottom).

that sn38 did not affect its expression level (Fig. 3C, lanes 1 and 2). We were not able to detect p25. We then asked whether *cdk5* interacts with p35 upon drug treatment. To this end, HT29 cells were treated with sn38, total cell extracts were recovered, and co-immunoprecipitations were performed with polyclonal antibodies directed against p35 or nonspecific antibodies (Fig. 3C, lanes 3–6). Proteins present in the immunoprecipitates were revealed by immunoblotting with anti-*cdk5* antibodies. Under these conditions, *cdk5*

was found to co-immunoprecipitate with p35 proteins (Fig. 3C, compare lane 6 and 4). Note that these co-immunoprecipitations were carried out using non-transfected cells, so that the association does not require the proteins to be overexpressed. It has been recently proposed that the binding to p35 is not sufficient to initiate *Cdk5* kinase activation, which is also dependent on the phosphorylation of the kinase on its tyrosine 15 residue (35). We thus determined using total cell extracts whether sn38 also modulates *Cdk5* phosphorylation. As shown in Fig. 3D, lanes 1–4, we found that phosphorylation of *Cdk5* at tyrosine 15 was also increased in response to topoisomerase I inhibition. Note that, using total cell extracts, we were not able to detect a significant activation of the kinase before 48 h of treatment (see below). Therefore, we concluded from these results that the *cdk5* kinase is activated following topoisomerase I inhibition.

Cdk5 Interacts with STAT3 and Induces Its Serine 727 Phosphorylation upon Topoisomerase I Inhibition—To determine if *cdk5* is involved in STAT3 serine phosphorylation following sn38 treatment, we first asked if the kinase could bind to the transcription factor. To this end, HT29 cells were treated with sn38, total cell extracts were recovered, and immunoprecipitations were performed with polyclonal antibodies directed either against STAT3 or nonspecific antibodies (Fig. 4A, lanes 1 and 2). Proteins present in the immunoprecipitates were revealed by immunoblotting with the reciprocal *cdk5* or STAT3 antibodies. Under these conditions, STAT3 was found to co-immunoprecipitate with *cdk5*.

These interactions were specific, because almost no interaction was observed using a control IgG antibody (Fig. 4A, compare lanes 1 and 2). Importantly, these co-immunoprecipitations were performed with extracts from non-transfected cells; therefore, the association between STAT3 and *cdk5* did not rely on the overexpression of the two proteins.

To confirm this observation, *in vitro* pulldown experiments were performed using bacterially produced 6 \times histidine-tagged STAT3 containing either the full-length protein or the

The cdk5-STAT3-Eme1 Pathway Prevents DNA Damage

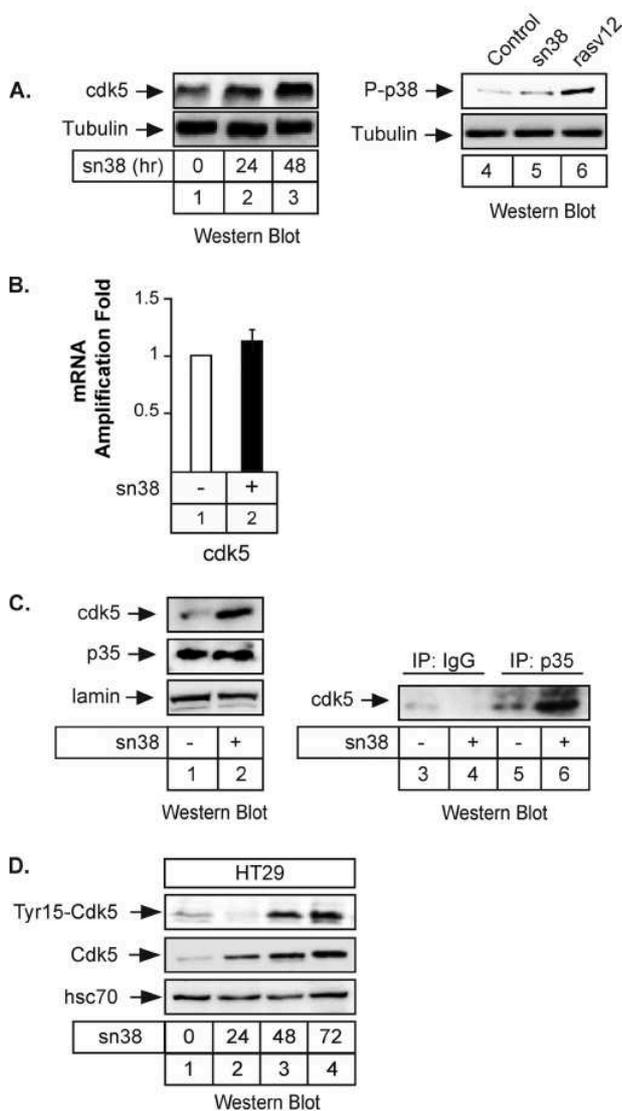


FIGURE 3. The cdk5 kinase is activated following topoisomerase I inhibition. *A*, growing HT29 cells were treated or not with sn38 (5 ng/ml) for 24 or 48 h. Following stimulation, total cell extracts were prepared, and cdk5 expression was analyzed by Western blot using polyclonal antibodies directed against the kinase (*lanes 1–3*, $n = 5$). Under the same conditions, the phosphorylation of the p38 kinase was investigated. As a control, cells were transfected with the *rasv12* oncogene to induce p38 activation (*lanes 4–6*, $n = 3$). The membranes were reprobed with an antibody directed against tubulin as a loading control. *B*, growing HT29 cells were incubated with sn38 (5 ng/ml) for 48 h, and the expression of the cdk5 mRNA was analyzed by quantitative RT-PCR experiments ($n = 3$). *C*, growing HT29 cells were treated as described above, and after 48 h, whole cell extracts were prepared and Western blot analysis was performed with polyclonal antibodies directed against cdk5, p35, or lamin as a loading control (*lanes 1 and 2*). In parallel, extracts were immunoprecipitated with polyclonal antibodies directed against p35 (*lanes 5 and 6*) or a control serum (*lanes 3 and 4*). Samples were then analyzed by Western blot using polyclonal antibodies directed against cdk5 ($n = 3$). *D*, HT29 cells were treated with sn38 as described previously, and the expression and phosphorylation of cdk5 on its tyrosine 15 residue were analyzed by Western blot ($n = 3$).

716–770 amino acids corresponding to the activation domain of STAT3 (Fig. 4B, STAT3 or STAT3Δ1–716). His-tagged STAT3 proteins were immobilized on beads and incubated

with total cell extracts prepared from cells treated or not with sn38. As previously shown using extracts from neuronal cells (34), we found that the endogenous cdk5 kinase was retained by the full-length his-STAT3 protein as well as by the STAT3Δ1–716 fusion protein immobilized on beads. By contrast, the kinase was not retained by the beads alone (Fig. 4C, compare *lanes 3–5*). We also noticed that this interaction was dependent on sn38, because almost no signal was observed using extracts from non-treated cells (Fig. 4C, compare *lanes 1–2* with *3–4*).

We then determined if cdk5 was involved in the serine phosphorylation of STAT3 in response to genotoxic treatment. To this end, cells were transfected with a pool of three siRNA directed against cdk5 or the corresponding control siRNA, cells were treated or not, and STAT3 phosphorylation was then investigated by Western blot. Following siRNA transfection, we observed as expected that the expression of cdk5 was down-regulated (Fig. 4D, *lanes 1 and 4*, *top panel*). Interestingly, we also noticed that STAT3 serine phosphorylation was reduced upon genotoxic treatment in the absence of the kinase (Fig. 4D, compare *lanes 3 and 4*, *middle panel*). Note, however, that we were not able to completely down-regulate STAT3 phosphorylation, suggesting either that the S727-phosphorylated form of STAT3 has an increased half-life or that other kinases are also phosphorylating STAT3. To further confirm that cdk5 was able to phosphorylate STAT3, the kinase was immunoprecipitated from sn38-treated cells and incubated *in vitro* in the presence of cold ATP and a purified preparation of STAT3Δ1–716. Western blot analysis confirmed that the transcription factor was effectively phosphorylated on its serine 727 residue under these conditions (Fig. 4D, *lanes 5 and 6*). In addition, we also determined if cdk5 was involved in STAT3 phosphorylation in other experimental conditions. To this end, cells were transfected with siRNA as described above, serum-starved, and then stimulated with IL-6 for 30 min. Results indicates that cdk5 was not involved in the activation of STAT3 by this cytokine (Fig. 4D, *lanes 7–9*).

It is well known that STAT3 is present in the cytoplasm and in the nucleus. In addition, it has also been reported that cdk5 is localized in the cytoplasm to regulate the neuronal architecture. To determine the localization of these proteins following topoisomerase I inhibition, fractionation experiments have been performed (Fig. 4E, *lanes 1–12*). Results showed that both STAT3 and cdk5 were present in the nucleus and on the chromatin following sn38 treatment (Fig. 4E, *lanes 6, 7, and 12*). As observed in Fig. 1, STAT3 phosphorylation was maximal at 72 h. Both proteins were also activated in the cytoplasm; however, cdk5 activation occurred first in the nucleus, suggesting that the initial activation event might occur in this compartment between 24 and 48 h. Interestingly, we were also able to detect cdk5 on chromatin but only its non-phosphorylated form. However, ChIP experiments indicated that cdk5 was not associated with STAT3 on its target genes (see below). These fractionation experiments also indicated that p35 was not present in the nucleus. Because p35 and cdk5 interact, we then asked whether p35 binds to STAT3 in response to sn38. As described above, total cell extracts were recovered, and immunoprecipitations were performed with polyclonal antibodies directed either against p35 or nonspecific antibodies (Fig. 4E,

The cdk5-STAT3-Eme1 Pathway Prevents DNA Damage

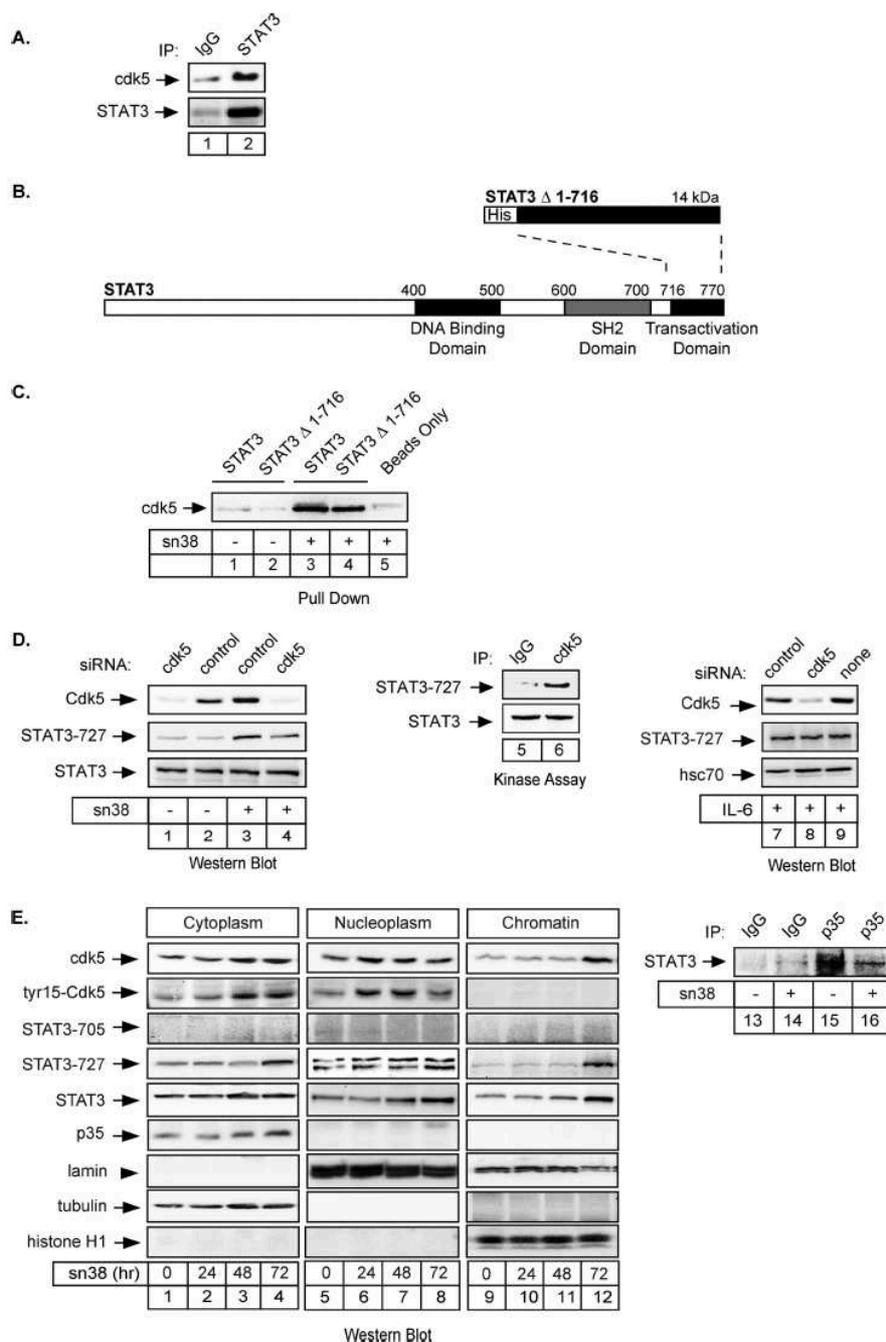


FIGURE 4. Cdk5 interacts with STAT3 to induce its phosphorylation on Serine 727. A, HT29 cells were treated with sn38 for 48 h, and whole cell extracts were then immunoprecipitated with polyclonal antibodies directed against STAT3 proteins (lane 2) or a control serum (lane 1), separated by SDS-PAGE, transferred to a nitrocellulose filter, and probed with polyclonal antibodies directed against STAT3 or cdk5 proteins as indicated. B, representation of the fusion proteins used in the pull-down experiments. C, total cell extracts (300 μ g) were incubated with histidine, with His-tagged STAT3Cter (STAT3 Δ 1-716), or with the full-length STAT3 (his-STAT3) immobilized on nickel-agarose beads (400 ng). Samples were then separated on polyacrylamide gels, and cdk5 binding was detected by Western blot using anti-cdk5 polyclonal antibodies (lanes 1-4). D, growing HT29 cells were either transfected with cdk5-specific siRNA oligonucleotides or control oligonucleotides as indicated. Cdk5 expression and phosphorylation of STAT3 on its serine residue were monitored after treatment with sn38 for 48 h (lanes 1-4, $n = 4$). In parallel, cdk5 was immunoprecipitated from sn38-treated cells and incubated with STAT3 Δ 1-716 for 10 min at RT in the presence of cold ATP. The phosphorylation of STAT3 on its serine 727 residue was analyzed by Western blot as described above (lanes 5 and 6). In parallel, growing HT29 cells were either transfected with cdk5-specific siRNA or control siRNA as indicated, serum-starved, and then stimulated with IL-6 for 30 min. Cdk5 expression and STAT3 phosphorylation were monitored as above ($n = 2$, lanes 7-9). E, HT29 cells were treated with sn38 for the indicated times and cytoplasmic, nuclear, or chromatin extracts were prepared and analyzed by Western blot analysis using antibodies directed against the indicated proteins ($n = 2$, lanes 1-12). Lamin, tubulin, and histone expression were used as loading controls for each compartment. In parallel, HT29 cells were treated or not with sn38 for 48 h, and whole cell extracts were then immunoprecipitated with polyclonal antibodies directed against p35 (lanes 15 and 16) or a control serum (lanes 13 and 14), separated by SDS-PAGE, transferred to a nitrocellulose filter, and probed with polyclonal antibodies directed against STAT3 proteins as indicated.

The *cdk5-STAT3-Eme1* Pathway Prevents DNA Damage

lanes 13–16). Proteins present in the immunoprecipitates were revealed by immunoblotting with the reciprocal STAT3 antibodies. Under these conditions, STAT3 was found to co-immunoprecipitate with p35. Interestingly, this association was inhibited following sn38 treatment (Fig. 4E, compare lanes 15 and 16). This was expected if these proteins localized in two different compartments following topoisomerase I inhibition. Taken together, these results suggest that *cdk5* binds to STAT3 upon topoisomerase I inhibition to induce its phosphorylation on serine 727.

The *cdk5* Kinase Regulates the Activation of STAT3 Target Genes following Topoisomerase I Inhibition—We then wanted to determine if *cdk5* is involved in the regulation of STAT3 target genes following sn38 treatment. It is well known that STAT3 regulates the expression of cyclin D1 in growing cells to induce cell cycle progression (36). Because sn38 treatment induced growth inhibition (see Fig. 2), we then determined if topoisomerase I inhibition prevented cyclin D1 expression and if this was linked to *cdk5* activation. To this end, cells were treated or not with sn38, and the expression of the cyclin was evaluated by quantitative RT-PCR and Western blot experiments. As expected, results indicated that genotoxic treatment down-regulated the expression of the cyclin D1 mRNA and protein (Fig. 5A). STAT3 was phosphorylated as expected on the serine 727 under these conditions. To determine if STAT3 is associated with the cyclin D1 promoter and if this binding is regulated in response to SN38, ChIP experiments were then performed using STAT3 antibodies and primers encompassing the proximal promoter where a binding site for the transcription factor has been recently described (37). Antibodies directed against the Ras protein were used as negative controls. As previously shown, ChIP experiments confirmed that STAT3 was present on the proximal cyclin D1 promoter in growing cells. Importantly, the association of the transcription factor with DNA was significantly inhibited following sn38 treatment (Fig. 5B, lanes 5 and 6). As a control, PCR analysis did not detect any occupancy of the –2760/–2486 region of the *p21^{waf1}* gene by STAT3 (data not shown). The ChIP result was obtained by semi-quantitative PCR (Fig. 5B, compare lanes 5 and 6) and quantified by quantitative-PCR (Fig. 5B, lanes 7 and 8). We then determined if *cdk5* was involved in the inhibition of the *cyclin D1* gene upon sn38 treatment. As described above, cells were transfected with a pool of three siRNA directed against *cdk5* or the corresponding control siRNA, and the expression of cyclin D1 was then investigated following sn38 treatment by quantitative RT-PCR analysis. As expected, genotoxic treatment reduced the expression of the cyclin D1 mRNA, and the same effect was observed when cells were transfected with control siRNA (Fig. 4C). Interestingly, the sn38-mediated inhibition of cyclin D1 was not observed anymore in the absence of *cdk5*.

Besides cyclin D1, we and others have also shown that the Myc-cdc25a pathway is also an important target of the STAT3 oncogene (38–41). To extend our results, we therefore determined if *cdk5* was involved in the regulation of the *myc* gene upon genotoxic treatment. As expected, ChIP experiments indicated that STAT3 was associated with the proximal promoter of the *myc* gene in growing HT29 cells (Fig. 5D, compare

lanes 3 and 5). As described above for the *cyclin D1* gene, the association of the transcription factor with the *myc* promoter was significantly inhibited following sn38 treatment (Fig. 5D, lanes 5 and 6). The expression of the Myc mRNA was then investigated following sn38 treatment and transfection with a pool of three siRNA directed against *cdk5* or with the corresponding controls. As previously shown (23, 28), Myc expression was down-regulated following topoisomerase I inhibition. Interestingly, results showed that this inhibition was reduced in the absence of *cdk5* (Fig. 5D, right panel). Although this does not rule out the participation of others regulators, these results suggest that *cdk5* also regulates the STAT3-mediated activation of *myc* following DNA damage.

To further extend this observation, we then determined if *cdk5* was only involved in the regulation of proliferative genes such as *cyclin D1* or *myc*, or if its effects could also be observed on other genes regulated by STAT3. We have recently shown that STAT3 can bind to the promoter of the *Eme1* gene to induce its expression (24). *Eme1* is an endonuclease that is implicated in the rescue of broken replication forks in response to topoisomerase I inhibition (42–44). Using quantitative PCR analysis, we confirmed in HT29 cells that *Eme1* expression was increased in response to sn38 (Fig. 6A, lanes 1 and 2). In addition, ChIP experiments also indicated that STAT3 effectively bound to the *Eme1* promoter following DNA damage (Fig. 6A, lanes 5 and 6). To determine if *cdk5* was involved in the activation of the endonuclease, its expression was then investigated in the presence or absence of siRNA directed against the kinase. As expected, *Eme1* expression was increased in the presence of control siRNA in response to sn38 (Fig. 6A, right part). However, when cells were transfected with a pool of three siRNAs directed against *cdk5*, the sn38-mediated expression of the endonuclease was significantly reduced (Fig. 6A, right part). The expression of *Eme1* has been correlated with DNA damage, chromosomal aberrations, and genetic stability. Based on these observations, we made the hypothesis that the down-regulation of *cdk5* or STAT3 might potentiate the effect of sn38 on DNA damage through a reduced expression of the endonuclease. To this end, cells were transfected with pools of three siRNA directed against STAT3 or *cdk5*, treated or not with sn38, and DNA damage was investigated by FACS analysis using an antibody directed against the Ser-139-phosphorylated form of histone H2Ax. Results presented Fig. 6B show as expected that topoisomerase I inhibition induced a significant increase in H2Ax phosphorylation (compare the first and second panel). Interestingly, we also observed that DNA damage was enhanced in the absence of *cdk5* or STAT3 (compare the second panel with panels 3 and 4). FACS quantification (Fig. 6C) confirmed that the percentage of cells with increased DNA damage is higher in the absence of STAT3 or *cdk5*.

To further extend this result, we then determined if *cdk5* down-regulation enhanced cell death following topoisomerase I inhibition. This would be expected as a consequence of increased DNA damage. To this end, cells were transfected with control siRNA or a pool of siRNAs directed against *cdk5* for 2 days, and cells were then split and treated for 10–14 days with sn38. Results from clonogenic assays presented in Fig. 6D showed that *cdk5* down-regulation resulted in a significant

The *cdk5-STAT3-Eme1* Pathway Prevents DNA Damage

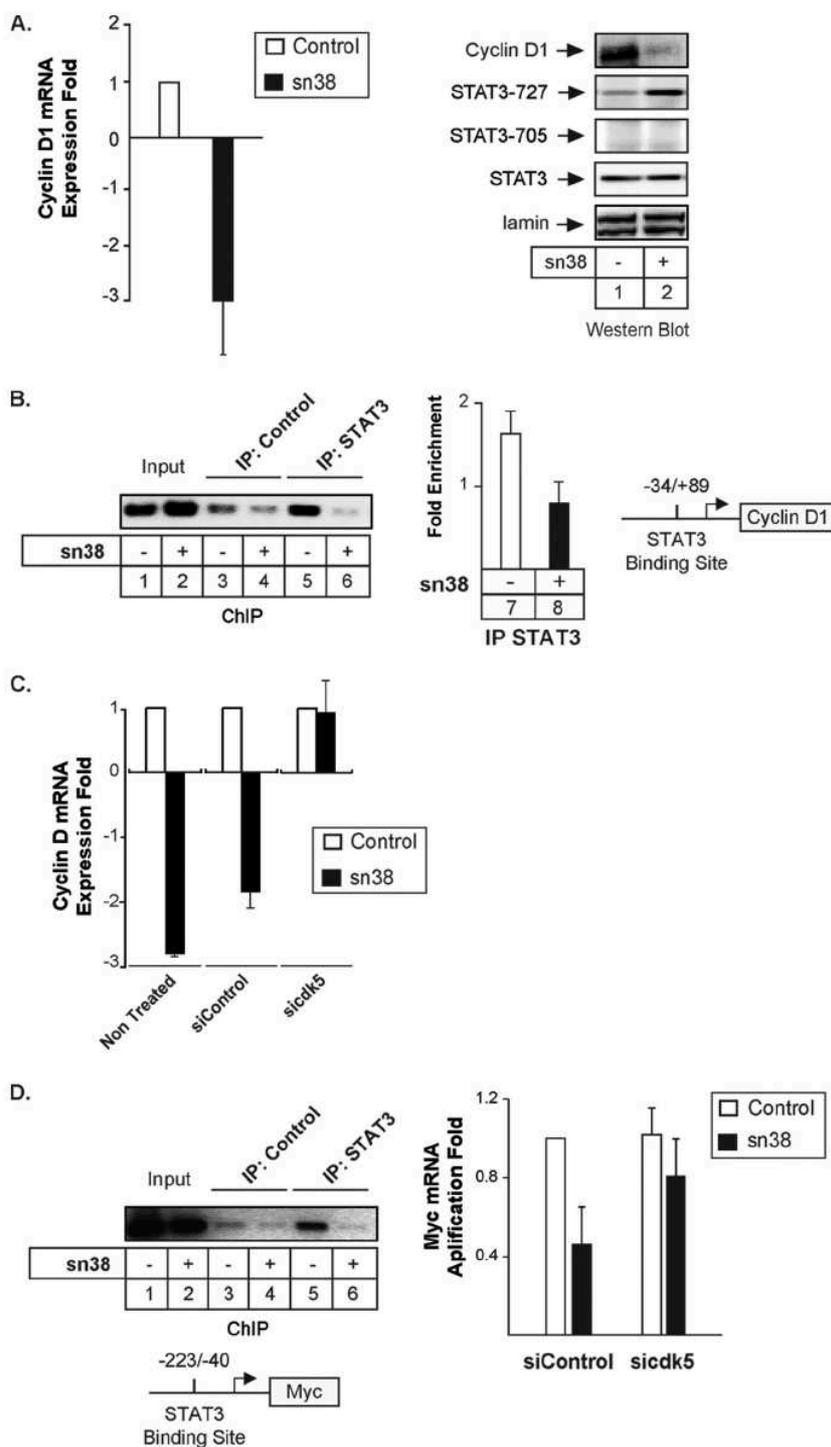


FIGURE 5. *Cdk5* is involved in the down-regulation of cyclin D1 and *myc* following topoisomerase I inhibition. *A*, growing HT29 cells were incubated with sn38 (5 ng/ml) for 48 h, and the expression of the cyclin D1 mRNA was analyzed by quantitative RT-PCR experiments ($n = 3$). In parallel, Western blot experiments were also performed to confirm the down-regulation of the cyclin D1 protein and the phosphorylation of STAT3 on its serine residue (lanes 1 and 2). *B*, HT29 growing cells were treated as described above, and soluble chromatin was prepared from the indicated cells and immunoprecipitated with antibodies directed against STAT3 or control antibodies. DNA was amplified using one pair of primers that covers the STAT3 proximal binding site of the cyclin D1 promoter. ChIP assays were analyzed on agarose gel (left part) or quantified by real-time PCR ($n = 3$, right part of the figure). *C*, growing HT29 cells were left untreated or transfected with *cdk5*-specific or control siRNA oligonucleotides as indicated. Cyclin D1 mRNA expression was analyzed by quantitative RT-PCR experiments following sn38 treatment ($n = 3$). *D*, growing HT29 cells were treated as described above, and the association of STAT3 with the *myc* proximal promoter was analyzed by ChIP (lanes 1–6). In parallel, *myc* expression was evaluated by quantitative RT-PCR in the presence or absence of *cdk5* (right part, $n = 4 \pm$ S.D.).

The *cdk5-STAT3-Eme1* Pathway Prevents DNA Damage

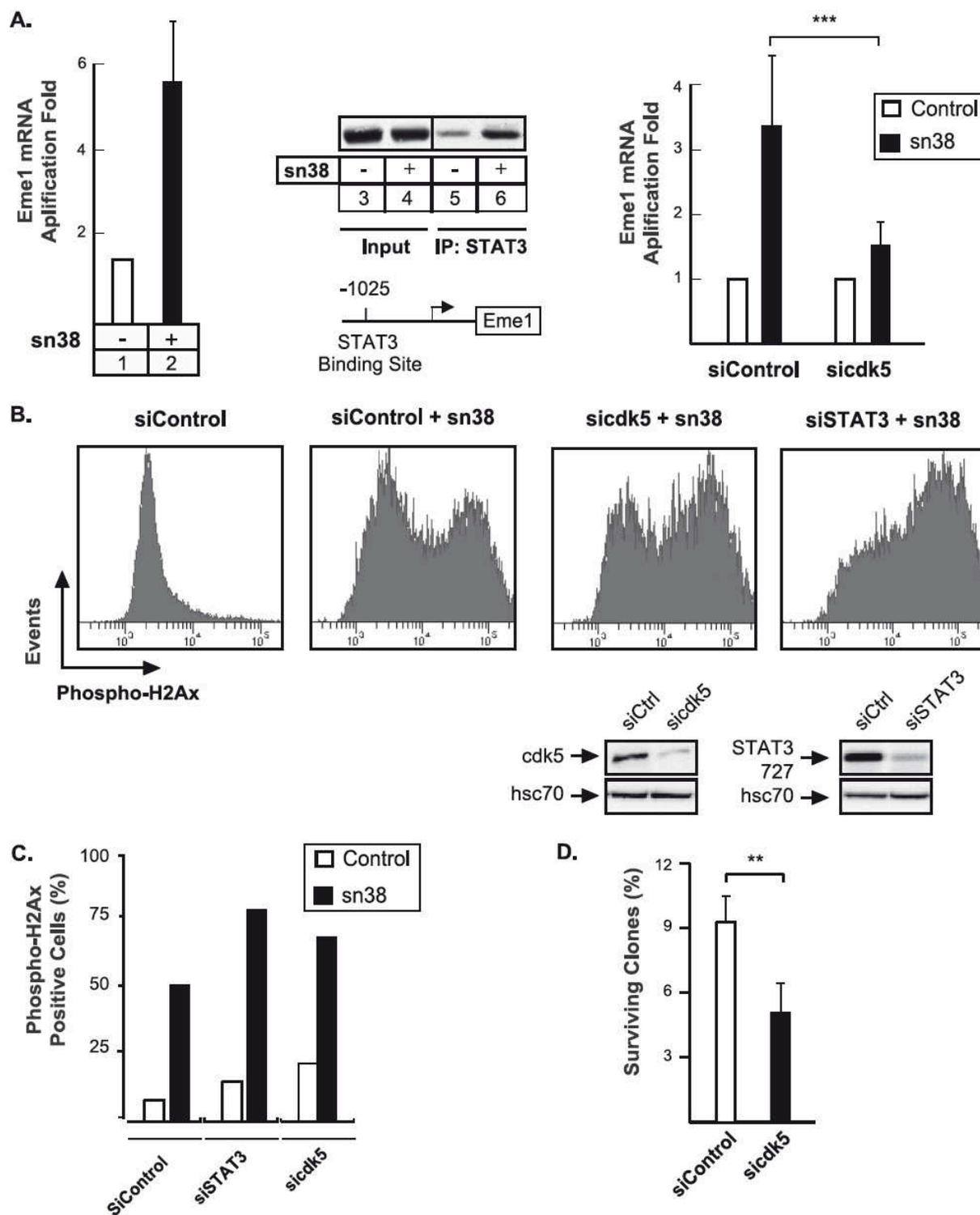


FIGURE 6. The *cdk5-STAT3* pathway regulates the expression of *Eme1* and reduces DNA damage. *A*, *Eme1* mRNA expression was analyzed by quantitative RT-PCR (lanes 1 and 2), and *STAT3* association with the *Eme1* promoter was characterized by ChIP (lanes 3–6) following *sn38* treatment. In parallel, cells were transfected with control or *cdk5* siRNA and then treated with *sn38* (5 ng/ml) for 48 h. The expression of the *Eme1* mRNA was analyzed by RT-QPCR experiments ($n = 3 \pm S.D., p < 0.001$). *B* and *C*, growing HT29 cells were transfected with specific or control siRNA and treated or not with *sn38* (5 ng/ml). The generation of DNA double strand breaks was quantified by FACS analysis using polyclonal antibodies directed against the ser139 phosphorylated form of histone H2Ax (one experiment representative of three). *D*, HT29 cells were transfected with pools of siRNAs directed against *cdk5* or control siRNAs for 48 h. Cells were then split and treated with *sn38* for 10–14 days. The percentage of colony-forming cells was evaluated as compared with non-treated cells ($n = 3 \pm S.D., p < 0.01$).

The *cdk5-STAT3-Eme1* Pathway Prevents DNA Damage

decrease of cell viability as compared with control cells. Altogether, these results suggest that *cdk5* interacts with STAT3 to regulate the expression of *Eme1* and that this allows DNA repair in response to topoisomerase I inhibition.

STAT3 Is Associated with the Eme1 Promoter, Phosphorylated on Serine 727, but Not on Tyrosine 705—These results suggest that STAT3 can function as a transcriptional regulator following serine 727 phosphorylation, in the absence of tyrosine 705 phosphorylation. To test this hypothesis, ChIP experiments were performed in HT29 cells using antibodies directed against either the tyrosine (Tyr-705), the serine (Ser-727) phosphorylated forms of the transcription factor or one polyclonal antibody directed against all forms of STAT3 (Fig. 7). Two conditions have been used, growing cells treated or not with sn38 for the indicated times, or cells that have been serum-starved and stimulated with IL-6 for 30 min. DNA binding has been characterized on the *Eme1*, cyclin D1, and *Myc* promoters. We observed as expected that STAT3 was recruited to the *Eme1* gene following sn38 treatment (Fig. 7A, lanes 1–3). Interestingly, the same recruitment was noticed using the Ser-727 antibody, but the Tyr-705 antibody did not detect any STAT3 binding (Fig. 7, lanes 4–9). This observation further suggests that a serine-phosphorylated form of STAT3 can be found associated with a target gene in the absence of tyrosine phosphorylation. When cells were stimulated with IL-6 (Fig. 7B), STAT3 was not recruited to the *Eme1* gene, indicating that this promoter is not a target of the transcription following cytokine stimulation. On the cyclin D1 and *Myc* promoters (Fig. 7, C and D), results showed that STAT3 was present on both promoters in growing cells and that its binding was inhibited following sn38 treatment. This was observed using either a “total” antibody or an antibody directed against the tyrosine-phosphorylated form of the transcription factor (Fig. 7, C and D, lanes 1–2 and 5–6). In serum-starved cells, STAT3 was not present on these promoters, but the transcription factor was recruited following IL-6 stimulation. As expected, this promoter-associated form was phosphorylated on tyrosine 705 (Fig. 7, C and D, lanes 7–8 and 11–12). This observation corresponds to results that have been published previously by our group and others, showing that STAT3 can activate the *myc* and *cyclin D1* genes following JAK-mediated phosphorylation of tyrosine 705 and the recruitment of transcriptional activators such as CBP, SRC, or P/Tefb. Interestingly, we were not able to detect a significant recruitment of STAT3 phosphorylated on its serine residue on these two promoters. Note, however, that this site may not be accessible when the dimer is bound to DNA, whereas this would be the case following DNA damaged if STAT3 has a different conformation or different partners. Taken together, these results indicate that STAT3 can be found associated with the *Eme1* promoter in response to DNA damage when phosphorylated only on its serine 727 residue.

DISCUSSION

In this study, we have found that the STAT3 transcription factor is phosphorylated on its serine C-terminal residue but not on tyrosine 705 upon topoisomerase I inhibition. Our results indicate that this is due to the activation of the *cdk5* kinase, which binds to the C-terminal of domain of the tran-

scription factor to induce its phosphorylation. Importantly, *cdk5* is involved in the down-regulation of early G₁ genes such as *myc* and *cyclin D1* and in the STAT3-mediated up-regulation of the *Eme1* gene, an endonuclease involved in the processing of damaged replication forks. In light of these results, we propose that the *cdk5-STAT3-Eme1* pathway plays an important role in the response to topoisomerase I inhibition and chemotherapy treatments.

It is well known that STAT3 is activated at the G₀-G₁ transition following cytokine or growth factor stimulation. In this condition, the transcription factor binds to the promoter of several cell cycle genes such as *myc*, *cyclin D1*, *fos*, or *cdc25A* to induce their expression and activate progression toward S phase. Gene activation by STAT3 during the G₀-G₁ transition is due to the phosphorylation of STAT3 on its tyrosine residue, followed by nuclear translocation and DNA binding. The second phosphorylation of STAT3 on its serine residue allows the contact of the tyrosine-phosphorylated dimer with transcriptional cofactors such as CBP, NcoA, or Ptefb. However, this pathway is probably not the only mechanism by which STAT proteins are activated, because several results have shown that these transcription factors induce transcription in the absence of tyrosine phosphorylation. This was originally described with STAT1 when it was shown that this transcription factor can drive the expression of several genes in the absence of tyrosine phosphorylation (45). Using non-phosphorylated forms of STAT3 on its tyrosine residue, Yang *et al.* have shown that these mutants can induce the expression of genes such as *met* and *mras*, which certainly play an important role in the oncogenic activity of STAT3. Under these conditions, gene activation is a consequence of the formation of a STAT3-NF- κ B enhanceosome that plays a key role in transformed cells (12, 13). Most importantly, the genes regulated by STAT3 in these conditions are normally not activated when the transcription factor is phosphorylated on its tyrosine residue. This leads to the important conclusion that the STAT3 transcriptional targets depends on its post-translational modifications.

Importantly, using ChIP analysis, we have been able to detect STAT3 on the *Eme1* promoter when phosphorylated only on its Ser-727 residue. We therefore propose that STAT3 is activated by DNA damage during the G₂ phase of the cell cycle and that its serine phosphorylation allows the specific up-regulation of DNA repair genes such as the *Eme1* endonuclease. Surprisingly, the role of STAT3 in the response to genotoxic treatment has not been well characterized. By contrast, it is known that both STAT1 and STAT5 are regulated following DNA damage. STAT1 is involved in the S and G₂/M checkpoints and can associate with repair signaling proteins such as Chk2 and Mdc1 in response to γ -irradiation (46, 47). In addition, this transcription factor is also phosphorylated in response to topoisomerase inhibitors (47). STAT5 has been shown to regulate the expression of *rad51* and, importantly, this has been linked to the ability of several oncogenic kinases such as *bcr-abl* or *teljak2* to induce drug resistance (48, 49). Interestingly, recent results also suggest that STAT3 plays an important role in the regulation of genome stability. The inactivation of the T-cell protein tyrosine phosphatase induces a constitutive activation of STAT3 probably as a consequence of replication fork stall-

The *cdk5-STAT3-Eme1* Pathway Prevents DNA Damage

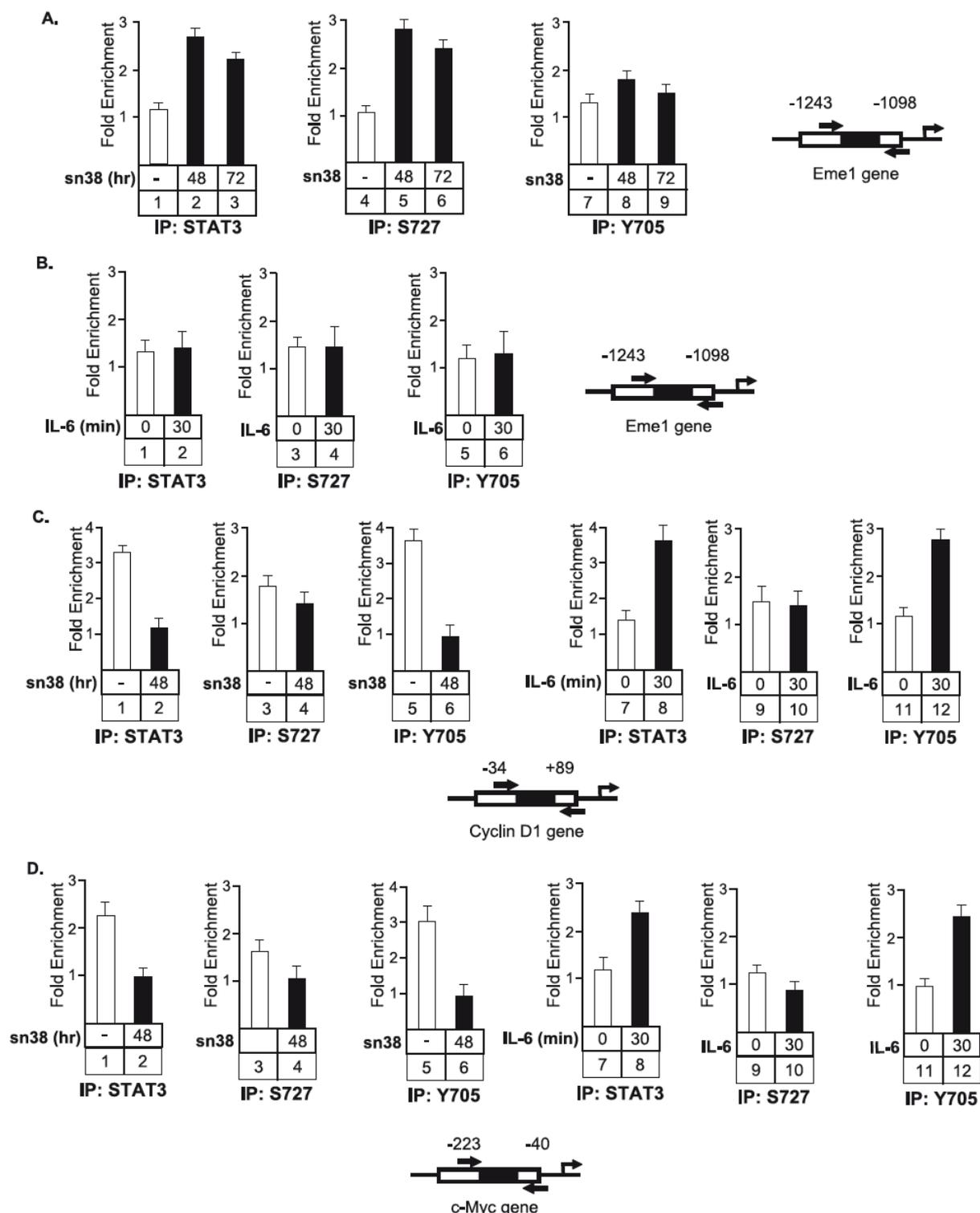


FIGURE 7. **STAT3 is recruited to the Eme1 promoter when phosphorylated only on its serine 727 residue.** Growing HT29 cells were treated or not with sn38 as indicated above and soluble chromatin was prepared and immunoprecipitated with antibodies directed against STAT3 (IP:STAT3) or its serine or tyrosine phosphorylated forms (IP:S727 or IP:Y705). In parallel, cells were serum-starved and stimulated or not with IL-6 (10 ng/ml) for 30 min, and the chromatin was immunoprecipitated under the same conditions. DNA was amplified using pair of primers that covers the STAT3 proximal binding sites of the cyclin D1 (panel C), Myc (panel D), and Eme1, (panel A and B) promoters as indicated. ChIP assays were then quantified by real-time PCR as compared with the signals obtained on each genes with a control IgG (n = 3). Note that sn38 (-) in the legend means growing cells, whereas IL6 (0) means serum-starved cells.

The *cdk5-STAT3-Eme1* Pathway Prevents DNA Damage

ing, and this leads to aberrant mitoses with lagging chromosomes (50). Unfortunately, the link between STAT3 and DNA repair has not been characterized in this study, because this effect has been linked to a sustained expression of cyclin D1 during S phase. Further suggesting a link between STAT3 and DNA stability, it is well known that a direct target of STAT3, *myc*, can induce DNA damage and dysregulate genomic stability and DNA repair pathways (51). In this study, we further extend these observations, showing that this transcription factor is activated by *Cdk5* in response to topoisomerase I inhibitors. We speculate that this kinase allows the formation of a new STAT3 enhanceosome that would specifically regulate the expression of DNA repair genes upon genotoxic treatment. In light of recent results showing an essential role of NF- κ B in the response to DNA damage (52), one interesting hypothesis is that genes involved in the response to sn38 are controlled by a specific STAT3-NF- κ B complex that would be activated by *cdk5*. It will be interesting to determine if this enhanceosome preferentially binds DNA repair genes as opposed to more conventional STAT3 targets such as *myc* or *cdc25A*.

As a consequence of DNA repair genes regulation, our results indicate that the *cdk5-STAT3* pathway reduces DNA damage in response to topoisomerase I inhibition. This suggests that these proteins might play an essential role in the resistance of cancer cells to chemotherapy. Further confirming the importance of this oncogenic cascade, recent results have shown that the *cdk5-STAT3* pathway plays an essential role in thyroid carcinomas (53). In addition, we and others have recently shown that STAT3 prevents the induction of senescence through p53-p21 inactivation (18, 40, 54, 55). Interestingly, *cdk5* is also involved in senescence programs, because this kinase regulates cell morphology through ezrin and *rac1* modulation (32, 33). It will be interesting to determine if *cdk5* is also involved in the inactivation of the p53-p21 pathway by the STAT3 oncogene during senescence induction.

In light of this study and other results (53), we therefore propose that *cdk5* plays an important role in cell transformation by the STAT3 oncogene. Because it has been proposed that cell transformation induces an intrinsic resistance program to chemotherapy (56), we speculate that *cdk5-STAT3* provides cancer cells with intrinsic resistance capacities due to enhanced *Eme1* expression and that this a corollary of cell transformation. We propose that the early detection on tumor biopsies of the *cdk5-STAT3* oncogenic pathway, both of its phosphorylation status and of its target genes, will provide oncologists with a resistance profile indicative of tumors that will fail to respond to chemotherapy (15, 57). In addition, we also propose that STAT3 inhibitors, which are emerging as new targeted cancer therapies (2, 57, 58) should be tested in clinical trials in combination with irinotecan to reduce DNA repair and enhance the efficiency of genotoxic treatments.

REFERENCES

1. Bromberg, J. (2002) *J. Clin. Invest.* **109**, 1139–1142
2. Yu, H., and Jove, R. (2004) *Nat. Rev. Cancer* **4**, 97–105
3. Levy, D. E., and Lee, C. K. (2002) *J. Clin. Invest.* **109**, 1143–1148
4. Bromberg, J. F., Horvath, C. M., Besser, D., Latham, W. W., and Darnell, J. E., Jr. (1998) *Mol. Cell. Biol.* **18**, 2553–2558
5. Bromberg, J. F., Wrzeszczynska, M. H., Devgan, G., Zhao, Y., Pestell, R. G.,

- Albanese, C., and Darnell, J. E., Jr. (1999) *Cell* **98**, 295–303
6. Wen, Z., Zhong, Z., and Darnell, J. E., Jr. (1995) *Cell* **82**, 241–250
7. Giraud, S., Bienvenu, F., Avril, S., Gascan, H., Heery, D. M., and Coqueret, O. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 8004–8011
8. Giraud, S., Hurlstone, A., Avril, S., and Coqueret, O. (2004) *Oncogene* **23**, 7391–7398
9. Paulson, M., Pisharody, S., Pan, L., Guadagno, S., Mui, A. L., and Levy, D. E. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 25343–25349
10. Nakashima, K., Yanagisawa, M., Arakawa, H., Kimura, N., Hisatsune, T., Kawabata, M., Miyazono, K., and Taga, T. (1999) *Science* **284**, 479–482
11. Qin, H. R., Kim, H. J., Kim, J. Y., Hurt, E. M., Klarmann, G. J., Kawasaki, B. T., Duhagon Serrat, M. A., and Farrar, W. L. (2008) *Cancer Res.* **68**, 7736–7741
12. Yang, J., Chatterjee-Kishore, M., Staugaitis, S. M., Nguyen, H., Schlessinger, K., Levy, D. E., and Stark, G. R. (2005) *Cancer Res.* **65**, 939–947
13. Yang, J., Liao, X., Agarwal, M. K., Barnes, L., Auron, P. E., and Stark, G. R. (2007) *Genes Dev.* **21**, 1396–1408
14. Lee, H., Herrmann, A., Deng, J. H., Kujawski, M., Niu, G., Li, Z., Forman, S., Jove, R., Pardoll, D. M., and Yu, H. (2009) *Cancer Cell* **15**, 283–293
15. Barré, B., Vigneron, A., Perkins, N., Roninson, I. B., Gamelin, E., and Coqueret, O. (2007) *Trends Mol. Med.* **13**, 4–11
16. Sano, S., Chan, K. S., Kira, M., Kataoka, K., Takagi, S., Tarutani, M., Itami, S., Kiguchi, K., Yokoi, M., Sugawara, K., Mori, T., Hanaoka, F., Takeda, J., and DiGiorganni, J. (2005) *Cancer Res.* **65**, 5720–5729
17. Shen, Y., Devgan, G., Darnell, J. E., Jr., and Bromberg, J. F. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 1543–1548
18. Niu, G., Wright, K. L., Ma, Y., Wright, G. M., Huang, M., Irby, R., Briggs, J., Karras, J., Cress, W. D., Pardoll, D., Jove, R., Chen, J., and Yu, H. (2005) *Mol. Cell. Biol.* **25**, 7432–7440
19. Catlett-Falcone, R., Landowski, T. H., Oshiro, M. M., Turkson, J., Levitzki, A., Savino, R., Ciliberto, G., Moscinski, L., Fernández-Luna, J. L., Nuñez, G., Dalton, W. S., and Jove, R. (1999) *Immunity* **10**, 105–115
20. Duan, Z., Foster, R., Bell, D. A., Mahoney, J., Wolak, K., Vaidya, A., Hampel, C., Lee, H., and Seiden, M. V. (2006) *Clin. Cancer Res.* **12**, 5055–5063
21. Diaz, N., Minton, S., Cox, C., Bowman, T., Gritsko, T., Garcia, R., Eweis, I., Wloch, M., Livingston, S., Seijo, E., Cantor, A., Lee, J. H., Beam, C. A., Sullivan, D., Jove, R., and Muro-Cacho, C. A. (2006) *Clin. Cancer Res.* **12**, 20–28
22. Gritsko, T., Williams, A., Turkson, J., Kaneko, S., Bowman, T., Huang, M., Nam, S., Eweis, I., Diaz, N., Sullivan, D., Yoder, S., Enkemann, S., Eschrich, S., Lee, J. H., Beam, C. A., Cheng, J., Minton, S., Muro-Cacho, C. A., and Jove, R. (2006) *Clin. Cancer Res.* **12**, 11–19
23. Vigneron, A., Roninson, I. B., Gamelin, E., and Coqueret, O. (2005) *Cancer Res.* **65**, 8927–8935
24. Vigneron, A., Gamelin, E., and Coqueret, O. (2008) *Cancer Res.* **68**, 815–825
25. Dhavan, R., and Tsai, L. H. (2001) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 749–759
26. Gong, X., Tang, X., Wiedmann, M., Wang, X., Peng, J., Zheng, D., Blair, L. A., Marshall, J., and Mao, Z. (2003) *Neuron* **38**, 33–46
27. Wang, C. X., Song, J. H., Song, D. K., Yong, V. W., Shuaib, A., and Hao, C. (2006) *Cell Death Differ.* **13**, 1203–1212
28. Vigneron, A., Cherier, J., Barré, B., Gamelin, E., and Coqueret, O. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 34742–34750
29. Le, H. V., Minn, A. J., and Massagué, J. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 32018–32025
30. Turner, N. C., Lord, C. J., Iorns, E., Brough, R., Swift, S., Elliott, R., Rayter, S., Tutt, A. N., and Ashworth, A. (2008) *EMBO J.* **27**, 1368–1377
31. Tian, B., Yang, Q., and Mao, Z. (2009) *Nat. Cell Biol.* **11**, 211–218
32. Alexander, K., Yang, H. S., and Hinds, P. W. (2004) *Mol. Cell. Biol.* **24**, 2808–2819
33. Yang, H. S., and Hinds, P. W. (2003) *Mol. Cell* **11**, 1163–1176
34. Fu, A. K., Fu, W. Y., Ng, A. K., Chien, W. W., Ng, Y. P., Wang, J. H., and Ip, N. Y. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 6728–6733
35. Lee, J. H., Jeong, M. W., Kim, W., Choi, Y. H., and Kim, K. T. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 19826–19835
36. Leslie, K., Lang, C., Devgan, G., Azare, J., Berishaj, M., Gerald, W., Kim, Y. B., Paz, K., Darnell, J. E., Albanese, C., Sakamaki, T., Pestell, R., and Bromberg, J. (2006) *Cancer Res.* **66**, 2544–2552

The *cdk5-STAT3-Eme1* Pathway Prevents DNA Damage

37. Lo, H. W., Hsu, S. C., Ali-Seyed, M., Gunduz, M., Xia, W., Wei, Y., Bartholomeusz, G., Shih, J. Y., and Hung, M. C. (2005) *Cancer Cell* **7**, 575–589
38. Kiuchi, N., Nakajima, K., Ichiba, M., Fukada, T., Narimatsu, M., Mizuno, K., Hibi, M., and Hirano, T. (1999) *J. Exp. Med.* **189**, 63–73
39. Bowman, T., Broome, M. A., Sinibaldi, D., Wharton, W., Pledger, W. J., Sedivy, J. M., Irby, R., Yeatman, T., Courtneidge, S. A., and Jove, R. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 7319–7324
40. Barré, B., Avril, S., and Coqueret, O. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 2990–2996
41. Barré, B., Vigneron, A., and Coqueret, O. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 15673–15681
42. Dendouga, N., Gao, H., Moechars, D., Janicot, M., Vialard, J., and McGowan, C. H. (2005) *Mol. Cell. Biol.* **25**, 7569–7579
43. Osman, F., and Whitby, M. C. (2007) *DNA Repair* **6**, 1004–1017
44. Pommier, Y., Redon, C., Rao, V. A., Seiler, J. A., Sordet, O., Takemura, H., Antony, S., Meng, L., Liao, Z., Kohlhagen, G., Zhang, H., and Kohn, K. W. (2003) *Mutat. Res.* **532**, 173–203
45. Chatterjee-Kishore, M., Wright, K. L., Ting, J. P., and Stark, G. R. (2000) *EMBO J.* **19**, 4111–4122
46. Townsend, P. A., Cragg, M. S., Davidson, S. M., McCormick, J., Barry, S., Lawrence, K. M., Knight, R. A., Hubank, M., Chen, P. L., Latchman, D. S., and Stephanou, A. (2005) *J. Cell Sci.* **118**, 1629–1639
47. Thomas, M., Finnegan, C. E., Rogers, K. M., Purcell, J. W., Trimble, A., Johnston, P. G., and Boland, M. P. (2004) *Cancer Res.* **64**, 8357–8364
48. Slupianek, A., Schmutte, C., Tomblin, G., Nieborowska-Skorska, M., Hoser, G., Nowicki, M. O., Pierce, A. J., Fishel, R., and Skorski, T. (2001) *Mol. Cell* **8**, 795–806
49. Slupianek, A., Hoser, G., Majsterek, I., Bronisz, A., Malecki, M., Blasiak, J., Fishel, R., and Skorski, T. (2002) *Mol. Cell. Biol.* **22**, 4189–4201
50. Shields, B. J., Hauser, C., Bukczynska, P. E., Court, N. W., and Tiganis, T. (2008) *Cancer Cell* **14**, 166–179
51. Vafa, O., Wade, M., Kern, S., Beeche, M., Pandita, T. K., Hampton, G. M., and Wahl, G. M. (2002) *Mol. Cell* **9**, 1031–1044
52. Campbell, K. J., Witty, J. M., Rocha, S., and Perkins, N. D. (2006) *Cancer Res.* **66**, 929–935
53. Lin, H., Chen, M. C., Chiu, C. Y., Song, Y. M., and Lin, S. Y. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 2776–2784
54. Florenes, V. A., Lu, C., Bhattacharya, N., Rak, J., Sheehan, C., Slingerland, J. M., and Kerbel, R. S. (1999) *Oncogene* **18**, 1023–1032
55. Biennu, F., Barre, B., Giraud, S., Avril, S., and Coqueret, O. (2005) *Mol. Biol. Cell* **16**, 1850–1858
56. Johnstone, R. W., Ruefli, A. A., and Lowe, S. W. (2002) *Cell* **108**, 153–164
57. Henderson, B. W., Daroqui, C., Tracy, E., Vaughan, L. A., Loewen, G. M., Cooper, M. T., and Baumann, H. (2007) *Clin. Cancer Res.* **13**, 3156–3163
58. Benekli, M., Baumann, H., and Wetzler, M. (2009) *J. Clin. Oncol.* **27**, 4422–4432

Chapitre 2

Le facteur de transcription **STAT3** est activé pendant la phase **G2** du cycle cellulaire pour réguler l'expression des gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire

La voie d'activation de STAT3 a été caractérisée à la suite d'une stimulation de cytokines ou de facteurs de croissance. Dans ces conditions, il a été montré que le facteur de transcription est activé par phosphorylation sur son résidu tyrosine 705 lui permettant d'activer ses gènes cibles impliqués dans la prolifération cellulaire et plus précisément dans la transition G0/G1 du cycle cellulaire, tels que la Cycline D1, c-Myc ou encore Cdc25c. Cependant, il reste à déterminer si STAT3 joue un rôle dans les autres phases du cycle cellulaire et si la phosphorylation sur la tyrosine 705 est réellement nécessaire à son activation.

Dans la première partie de ce travail, nous avons montré que le facteur de transcription STAT3 était phosphorylé seulement sur son résidu sérine 727 en réponse à une inhibition des topoisomérases I. Cette activation permettait au facteur de transcription de se lier au promoteur de *Eme1* permettant d'induire la réparation des dommages de l'ADN. De plus, ce traitement induisait un blocage des cellules HT29 durant la phase G2 du cycle cellulaire.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous nous sommes alors intéressés à l'activation de STAT3 durant la phase G2 du cycle cellulaire dans les lignées colorectales. Nous avons cherché à savoir si le facteur de transcription était phosphorylé sur son résidu tyrosine 705 ou sur son résidu sérine 727 pendant cette phase du cycle cellulaire. Puis nous avons voulu déterminer ses gènes cibles et leurs implications dans la progression du cycle cellulaire en mitose.

I. STAT3 est phosphorylé sur son résidu sérine 727 pendant les stades précoces du cancer colorectal.

Depuis de nombreuses années, il a été montré que STAT3 était phosphorylé sur son résidu tyrosine 705 en réponse à une stimulation de cytokines. Afin de vérifier ces observations, nous avons utilisé quatre lignées tumorales colorectales : HT29, HCT116, LS174T et DLD. Ces cellules ont été privées de sérum pendant 24h pour les stimuler ensuite avec de l'IL-6 pendant 30 min (Figure 30). Nous avons étudié alors la phosphorylation de la tyrosine 705 et de la sérine 727 de STAT3 par Western blot en utilisant des anticorps polyclonaux dirigés contre ces protéines. Ces cellules stimulées sont comparées à des cellules en croissance (cultivées avec 3% de sérum) et à des cellules privées de sérum. De cette manière, nous avons confirmé que STAT3 était phosphorylé sur son résidu tyrosine 705, en réponse à une stimulation à l'IL-6. Cependant, nous n'avons pas été capables de détecter cette forme phosphorylée dans les cellules colorectales en croissance ou privées de sérum. Néanmoins, nous avons observé que STAT3 était phosphorylé de manière constitutive sur son résidu sérine 727 dans les quatre lignées colorectales.

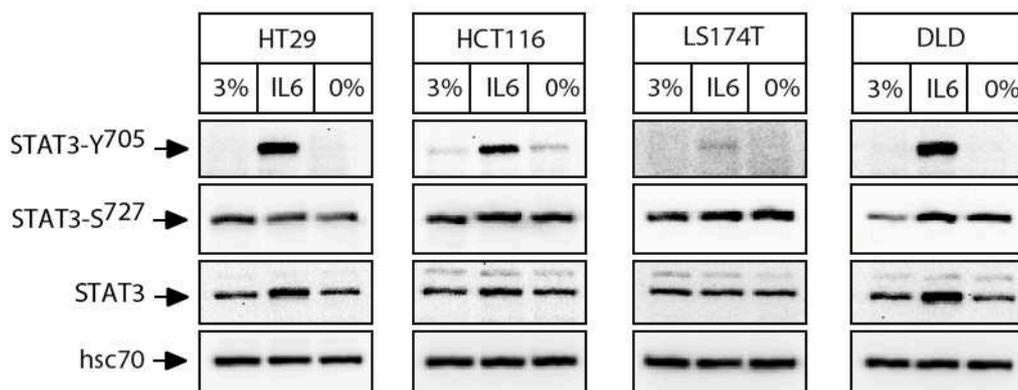


FIGURE 30 | Les phosphorylations de STAT3 dans quatre lignées cellulaires colorectales. Les cellules HT29, HCT116, LS174T et DLD sont soit en croissance avec 3% de sérum (nommé 3%) soit privées de sérum pendant 24h (nommé 0%) puis stimulées à l'IL-6 (10 ng/mL) pendant 30 min. Ensuite les extraits totaux sont analysés par Western blot en utilisant des anticorps dirigés contre les formes phosphorylées sérine 727 et tyrosine 705 de STAT3. Les membranes sont réutilisées pour la forme totale de STAT3 ainsi que pour hsc70, représentant le contrôle de charge (n=4).

Pour confirmer ces résultats, nous nous sommes intéressés à l'état de phosphorylation de STAT3 dans des échantillons de tumeurs provenant de patients souffrant d'un cancer colorectal. L'étude s'est portée sur 102 échantillons correspondant à trois étapes conduisant au cancer colorectal : 15 adénomes de faible grade, 15 adénomes de haut grade et 72 adénocarcinomes. Aucune de ces tumeurs n'a reçu de chimiothérapie, puisque nous avons montré dans la première partie de ce travail que STAT3 était activé en réponse à un traitement génotoxique.

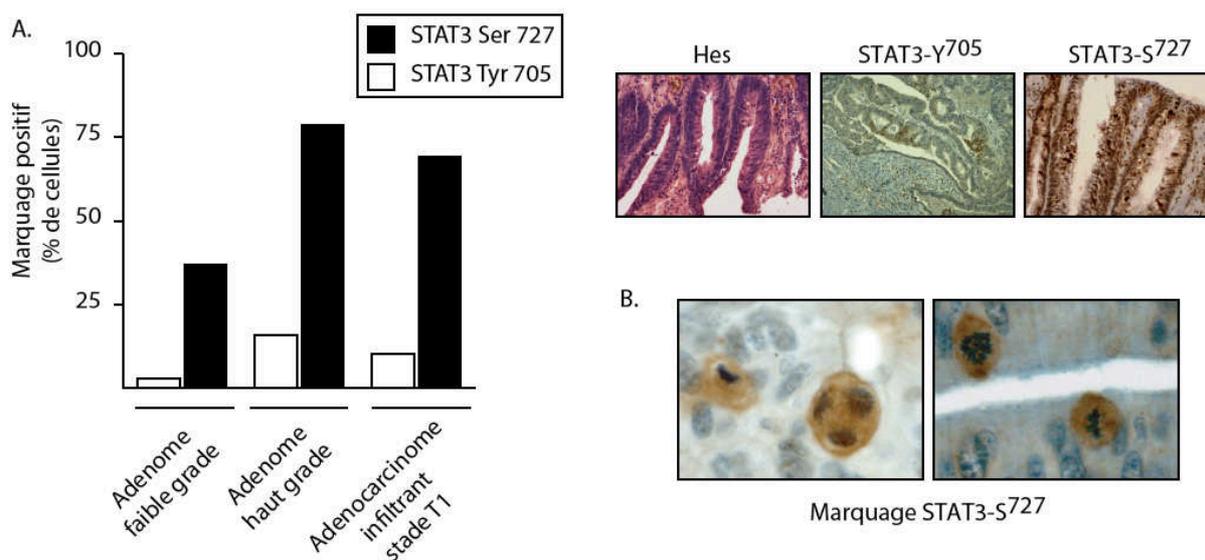


FIGURE 31 | Les phosphorylations de STAT3 dans des tumeurs colorectales. **A.** Pourcentage de cellules présentant un marquage positif avec des anticorps dirigés contre les deux formes phosphorylées de STAT3 comme indiqué, selon trois grades d'adénomes (n=102). **B.** Image représentative de la phosphorylation de STAT3 de la sérine 727 dans des cellules en mitoses identifiées sur des tumeurs solides.

Ces expériences d'immunocytochimie nous ont montré que STAT3 était principalement activé dans les adénomes de haut grade et les adénocarcinomes. Cependant, nous avons remarqué que, dans les trois grades étudiés, STAT3 était phosphorylé sur son résidu sérine 727 dans un plus grand nombre de cellules. Cette plus forte activation est détectée à un stade précoce du cancer colorectal, néanmoins, un plus grand nombre de cellules expriment la forme phosphorylée de la sérine 727 de STAT3 à des stades plus tardifs de la maladie (Figure 31A). Nous avons également remarqué, à partir de tumeurs solides, que STAT3 était principalement phosphorylé sur son résidu sérine 727 dans des cellules en mitose (Figure 31B).

Ces résultats nous ont donc suggéré que le site de la sérine 727 est un important site de phosphorylation dans le cancer colorectal et que cette phosphorylation pourrait être corrélée avec la progression du cycle cellulaire en mitose.

II. STAT3 est phosphorylé sur son résidu sérine 727 pendant la phase G2 du cycle cellulaire.

Avec ces analyses immunocytochimiques nous nous sommes demandés si STAT3 était activé durant la progression du cycle cellulaire de la phase S vers la mitose. Pour cela, nous avons étudié l'activation du facteur de transcription au cours du cycle cellulaire dans deux lignées colorectales, les HCT116 et les HT29 en utilisant différentes techniques de synchronisation. Les cellules sont donc enrichies dans chaque phase du cycle cellulaire à la suite d'un traitement au nocodazole ou bien après un double blocage thymidine ou encore en utilisant une privation de sérum suivie d'un relargage. A la suite de ses trois synchronisations, le pourcentage de cellules présentes dans chaque phase du cycle cellulaire est apprécié par cytométrie en flux.

Le nocodazole induit la dépolymérisation des microtubules durant la mitose. La cellule est donc bloquée pendant la prométaphase. Nous avons donc traité les cellules HT29 et HCT116 pendant 15h et 24h, afin de les synchroniser (Figure 32A). L'analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux a confirmé qu'après 15h et 24h de traitement au nocodazole, les cellules étaient bloquées pendant la mitose. La Cycline B1 est un des marqueurs de la mitose. En effet, couplé à la kinase Cdk1, il contrôle l'entrée des cellules en mitose. Nous avons donc utilisé cette protéine comme marqueur de la transition G2-M. Dans ces conditions, nous avons observé que les expressions protéiques de la Cycline B1 et de la forme phosphorylée de STAT3 sont augmentées en réponse à ce blocage, dans les deux lignées cellulaires étudiées (Figure 32A, lignes 2-3 et 5-6). Ces résultats nous ont donc laissé penser que STAT3 est activé en début de mitose.

Pour confirmer ces observations, nous avons utilisé une deuxième synchronisation. Le double blocage thymidine permet de synchroniser les cellules pendant la transition G1-S du cycle cellulaire. En effet une forte concentration de thymidine dans la cellule agit comme un inhibiteur de la synthèse d'ADN. Deux blocages successifs sont nécessaires pour obtenir une meilleure synchronisation pendant la transition G1-S du cycle cellulaire. Cet effet est réversible en lavant les cellules puis en les stimulant avec 10% de sérum. Nous avons donc utilisé cette technique pour enrichir les cellules dans les phases G1, S et G2-M (Figure 32B). Nous avons remarqué que *STAT3* était phosphorylé sur son résidu sérine 727 pendant la phase G2-M.

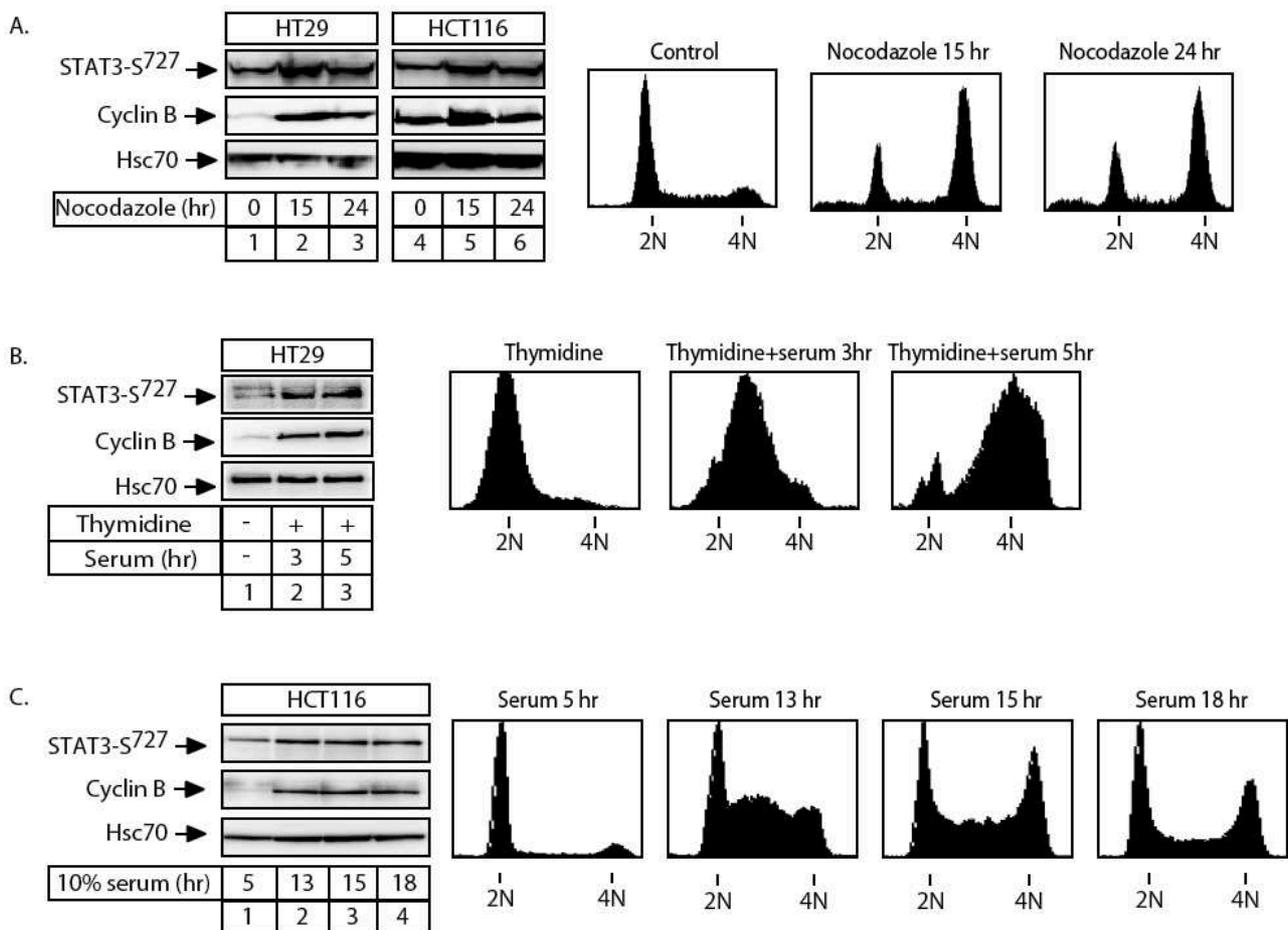


FIGURE 32 | STAT3 est phosphorylé sur son résidu sérine 727 durant la phase G2 du cycle cellulaire. **A.** Les cellules HT29 et HCT116 sont traitées ou non avec du nocodazole (30 ng/mL) pendant les temps indiqués. Un extrait cellulaire total est préparé puis l'expression protéique de la cycline B1 et de la forme phosphorylée sur la sérine 727 de *STAT3* est analysée par Western blot en utilisant des anticorps polyclonaux dirigés contre ces protéines. hsc70 est utilisé en contrôle de charge. En parallèle, le cycle cellulaire est analysé par cytométrie en flux grâce à un marquage de l'ADN par le DAPI (n=4). **B.** Les cellules HT29 sont synchronisées à la transition G1/S du cycle cellulaire grâce à un double blocage thymidine, puis les cellules sont lavées et stimulées avec 10% de sérum pour permettre la progression du cycle cellulaire. L'expression de la cycline B1, de la forme phosphorylée de la sérine 727 de *STAT3* et hsc70 est analysée par Western blot comme ci-dessus (n=4). **C.** Les cellules HCT116 sont privées de sérum pendant 48h puis stimulées avec 10% de sérum pendant les temps indiqués pour induire la progression du cycle cellulaire. L'expression de la cycline B1, de la forme phosphorylée de la sérine 727 de *STAT3* et hsc70 est analysée par Western blot comme ci-dessus (n=3).

Afin de confirmer ces observations, nous avons choisi de synchroniser les cellules HCT116 en s'affranchissant de tous traitements. Pour cela, nous avons privé les cellules de sérum pendant 48h pour qu'elles entrent en phase de quiescence. Une stimulation de sérum pendant les temps indiqués sur la figure 32C, permet de faire repartir les cellules dans un cycle cellulaire et de les enrichir dans les différentes phases du cycle. Comme nous l'avions attendu, nous avons obtenu les mêmes résultats, *STAT3* est phosphorylé sur son site sérine 727 pendant la G2-M.

Avec l'ensemble de ces résultats, nous pouvons affirmer, avec n'importe quelles synchronisations cellulaires, que la forme phosphorylée de *STAT3* sur la sérine 727 est augmentée durant la progression de la phase S vers la mitose dans des lignées cellulaires colorectales.

III. *STAT3* est phosphorylé sur son résidu sérine 727 par la kinase Cdk1

Nous avons ensuite voulu savoir quelle était la kinase responsable de la phosphorylation de *STAT3* sur le résidu sérine 727. Plusieurs sérine-thréonine kinases, telles que PLK1, Aurora et Cdk1, sont décrites comme jouant un rôle dans la progression de la phase S vers la mitose. Afin de déterminer la kinase responsable de cette phosphorylation, nous avons utilisé des cellules synchronisées en mitose par le nocodazole. A partir d'extraits totaux, nous avons immunoprécipité plusieurs kinases ou cyclines. Puis nous les avons incubé avec de l'ATP froid, la protéine de fusion *STAT3* contenant une étiquette histidine et exprimant le domaine de transactivation du facteur de transcription (Figure 33A).

En plus des kinases Cdk1 et Cdk2, nous avons choisi d'immunoprécipiter les cyclines D, B et E afin d'obtenir un complexe Cycline/Cdk actif. Les résultats de ce test de phosphorylation sont présentés sur la figure 33B. Une nette phosphorylation de *STAT3* sur son site sérine 727 est observée après immunoprécipitation de la kinase Cdk1 (Figure 33B, ligne 5). Un faible signal est également détecté en immunoprécipitant la cycline B1 (Figure 33B, ligne 2). Nous n'avons pas été capables de détecter de phosphorylation de *STAT3* due aux autres kinases testées. Ces résultats ont donc montré que *STAT3* est phosphorylé sur son résidu sérine 727 en début de mitose par la kinase Cdk1.

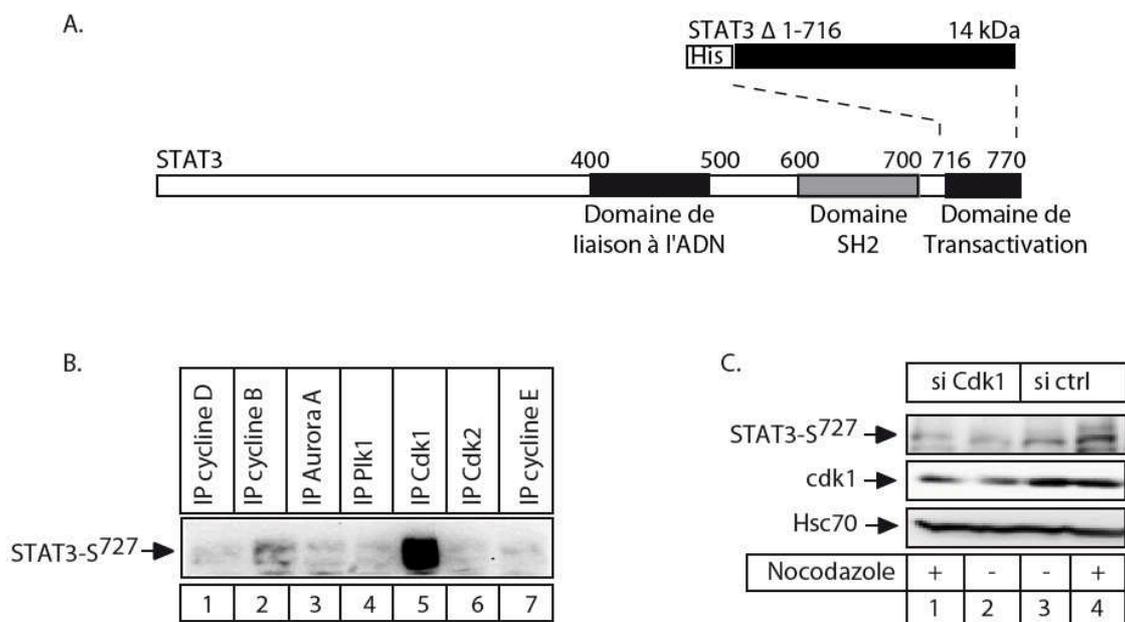


FIGURE 33| STAT3 est phosphorylé sur son résidu sérine 727 par la kinase Cdk1. A. Représentation schématique de la protéine de fusion utilisée pour la technique de Pull Down. **B.** Les cellules HCT116 sont synchronisées en mitose par le nocodazole (30ng/mL). Puis l'extrait total est immunoprécipité avec les Cyclines D1, B1, E et les kinases Aurora A, Plk1, Cdk1 et Cdk2 en utilisant des anticorps polyclonaux dirigés contre ces protéines. Les échantillons sont ensuite incubés avec le domaine de transactivation de STAT3 et de l'ATP froid. La forme phosphorylée de la sérine 727 de STAT3 est analysée par Western blot en utilisant un anticorps polyclonal dirigé contre cette protéine (n=3). **C.** Les cellules HCT116 sont transfectées avec un siRNA dirigé contre un séquence contrôle ou contre la kinase Cdk1. L'expression de la forme phosphorylé de la sérine 727 STAT3 et de Cdk1 est analysé par Western blot en utilisant des anticorps dirigés polyclonaux contre ces protéines. hsc70 est utilisé en contrôle de charge (n=3).

Afin de confirmer ces observations, nous avons réalisé un siRNA dirigé contre Cdk1 ou une séquence contrôle dans les cellules HCT116, traitées ou non par la suite avec le nocodazole (Figure 33C). Comme nous l'espérions, nous avons observé une diminution de la phosphorylation de la sérine 727 de STAT3 en absence de la kinase Cdk1 (Figure 33C, la ligne 3 est comparée à la ligne 4 et la ligne 1 est comparée à la ligne 4).

Par conséquent, nous pouvons conclure que STAT3 est phosphorylé sur son site sérine 727 par la kinase Cdk1 durant la progression de la phase G2 vers la mitose.

IV. STAT3 régule l'expression de gènes impliqués dans la progression de la phase S vers la mitose

Avec les résultats précédemment obtenus, nous avons émis l'hypothèse que STAT3 était impliqué dans la régulation de gènes impliqués dans la progression de la phase S vers la mitose. Pour appuyer cette hypothèse, nous avons dans un premier temps analysé l'expression de protéines indispensables à la phase G2 et à la mitose, telles que Aurora A, PLK1, survivine et la Cycline B1

en début de mitose (Figure 34A). Comme nous l'attendions, l'expression de ces protéines est augmentée dans cette condition.

Par la suite, nous avons cherché parmi ces protéines, lesquelles pourraient être des cibles du facteur de transcription. Pour cela, nous avons réalisé un siRNA dirigé contre *STAT3* puis, par PCR quantitative en temps réel, nous avons analysé l'expression des gènes de *Aurora A*, de la survivine et de *Plk1* dans les cellules HCT116 synchronisées ou non en début de mitose (Figure 34B). De cette manière, nous avons remarqué que seule l'expression de l'ARN messenger de *PLK1* est diminuée à la suite d'une perte de *STAT3*. Nous avons confirmé par Western blot que *PLK1* serait un gène cible de *STAT3*, étant donné que l'expression protéique de *PLK1* est diminuée à la suite d'un siRNA dirigé contre *STAT3* (Figure 34C). Nous pouvons affirmer que l'effet de *STAT3* sur la diminution de *PLK1* est spécifique, puisque nous n'avons pas observé le même effet sur l'expression de *Aurora A* ou de la survivine.

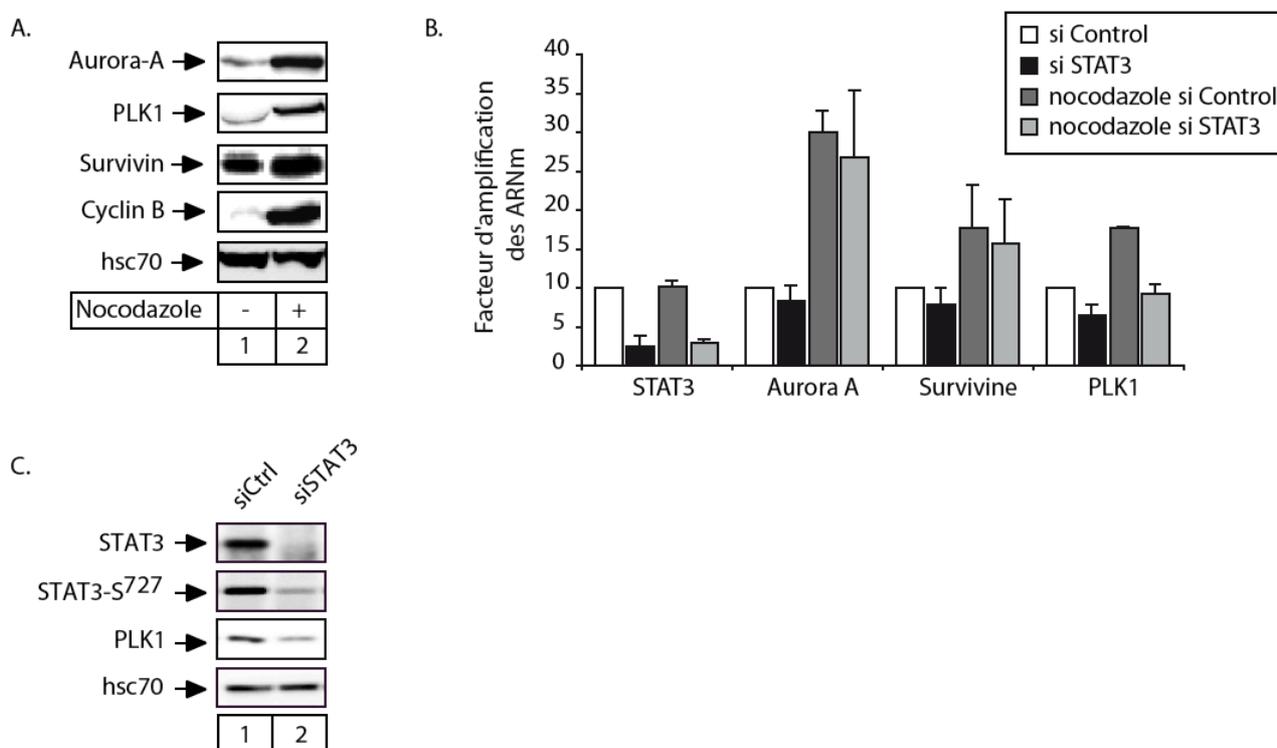


FIGURE 34 | STAT3 régule le gène de PLK1 pendant la phase G2 du cycle cellulaire. A. Les cellules HCT116 sont traitées ou non avec le nocodazole (30 ng/mL) pendant 15h. A partir des extraits totaux l'expression de *Aurora A*, *PLK1*, *Survivine* et de la *Cycline B1* est analysée par Western blot en utilisant des anticorps polyclonaux dirigés contre ces protéines. *hsc70* est utilisé comme contrôle de charge (n=4). B. Les cellules HCT116 sont transfectées avec un siRNA dirigé contre *STAT3* ou contre une séquence contrôle puis les cellules sont traitées ou non avec le nocodazole (30 ng/mL) pendant 15h. L'expression de l'ARN messenger de *Aurora A*, *PLK1*, *Survivine* et de *STAT3* est analysée par PCR quantitative en temps réel (n=4 ±S.D.). C. En parallèle l'expression de *PLK1* ainsi que la forme phosphorylée et la forme totale de *STAT3* est analysée par Western blot en utilisant des anticorps polyclonaux dirigés contre ces protéines. *hsc70* est utilisé comme contrôle de charge (n=4).

Nous avons donc montré que PLK1 pourrait être un gène cible de STAT3 pendant la phase G2 du cycle cellulaire.

Dans un deuxième temps, nous avons donc voulu savoir si STAT3 régulait directement PLK1 en se fixant sur son promoteur. Pour cela, nous avons étudié, par une analyse bio-informatique sous Genomatix, les sites potentiels de fixation de STAT3 sur le promoteur de PLK1 (figure 35A). Ensuite, nous avons sélectionné les sites potentiels situés en -325 et -291 correspondant aux plus forts taux de prédiction. En parallèle, l'analyse a été effectuée au niveau du site d'initiation de PLK1. Après avoir choisi ces séquences, nous avons réalisé une immunoprécipitation de chromatine de STAT3 après une synchronisation des cellules en phase G1, S ou G2-M par privation de sérum. L'analyse de ce CHIP a été effectuée par PCR quantitative en temps réel (Figure 35B, partie de gauche) mais également par PCR classique déposée sur gel d'agarose (Figure 35B, partie de droite). Lors de l'analyse des résultats par PCR quantitative en temps réel, le facteur d'enrichissement est déterminé en comparant par rapport à un anticorps contrôle mais également par rapport à une région contrôle du promoteur de PLK1. Nous avons alors observé que STAT3 était fixé sur le promoteur de PLK1 uniquement durant la phase G2-M du cycle cellulaire (Figure 35B, la ligne 3 est comparée aux lignes 1 et 2). Ce résultat a été confirmé par PCR classique en comparant par rapport à un anticorps contrôle, Gal4 (Figure 35B, la ligne 6 est comparée à la 5).

Ces expériences de CHIP nous ont confirmé que STAT3 se lie au promoteur de PLK1 durant la phase G2 du cycle cellulaire.

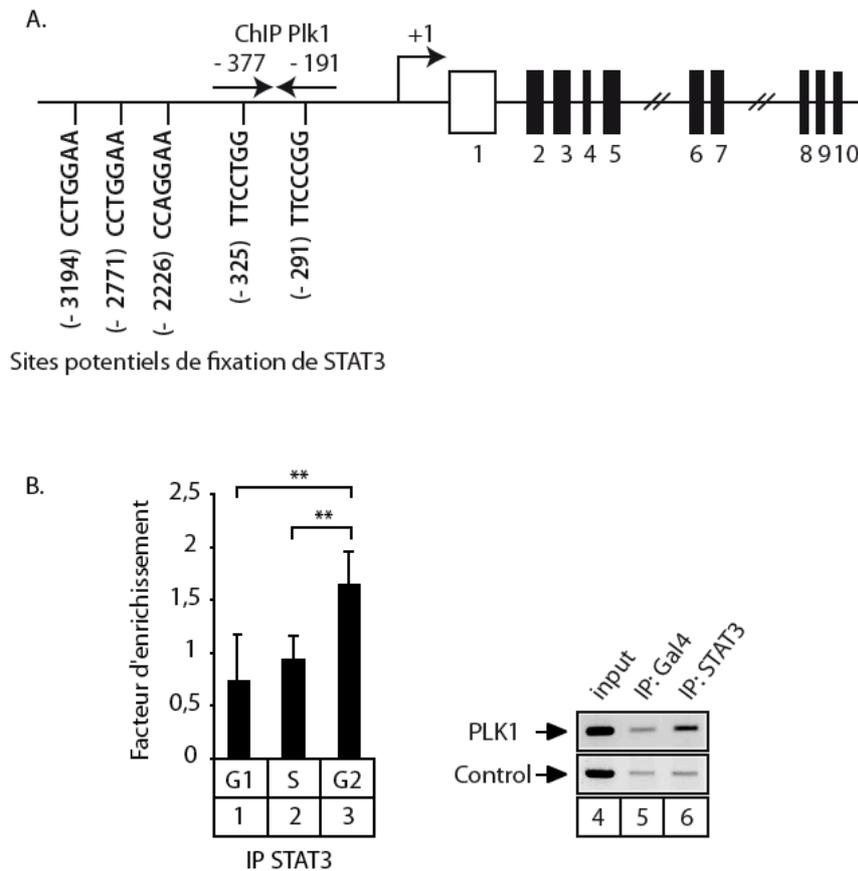


FIGURE 35 | STAT3 régule directement le gène de PLK1 pendant la phase G2 du cycle cellulaire. **A.** Schéma des sites potentiels de fixation de STAT3 sur le promoteur de PLK1 d'après le logiciel Genomatix. **B.** Les cellules HCT116 sont privées de sérum pendant 48h puis stimulées avec 10% de sérum comme décrit précédemment pour enrichir les cellules dans les phases G1, S et G2-M du cycle cellulaire. La chromatine soluble est préparée à partir de ces cellules puis immunoprécipitée avec un anticorps dirigé contre STAT3 ou contre une immunoglobuline contrôle. L'ADN est amplifié en utilisant une paire d'amorces qui couvre le site de liaison indiqué de STAT3 sur le promoteur de PLK1. Le ChIP est ensuite quantifié par PCR en temps réel en comparant le signal à l'immunoglobuline contrôle (ligne 1-3, $n=3 \pm SD$, $p<0,01$) ou analysé sur gel d'agarose (ligne 4-6, $n=4$).

Nous avons souhaité, dans un troisième temps, étendre ces résultats à d'autres gènes des phases S et G2-M. Pour cela, nous avons utilisé la technique du ChIP-on-chip. Il s'agit d'un large criblage du génome humain à partir d'une immunoprécipitation d'un facteur de transcription suivie d'une ligation par PCR et d'un clonage. Pour cette analyse, nous avons synchronisé les cellules HCT116 par une privation de sérum puis une stimulation de sérum afin d'enrichir les cellules dans les phases S et G2 du cycle cellulaire. Les régions de l'ADN fixées par STAT3 sont ensuite analysées sur puces. Ces puces sont constituées d'amorces couvrant les sites d'initiation de la transcription (-200 +800 pb) de 18 660 gènes humains. En utilisant un pourcentage de significativité de 80% ($p<0,005$) comme valeur seuil, nous avons identifié 281 gènes cibles potentiels de STAT3 avec les cellules synchronisées pendant la phase S et 367 gènes cibles potentiels lors de la synchronisation

pendant la phase G2 du cycle cellulaire. Néanmoins, parmi ces gènes, 156 sont identiques dans les deux temps de synchronisation (Figure 36).

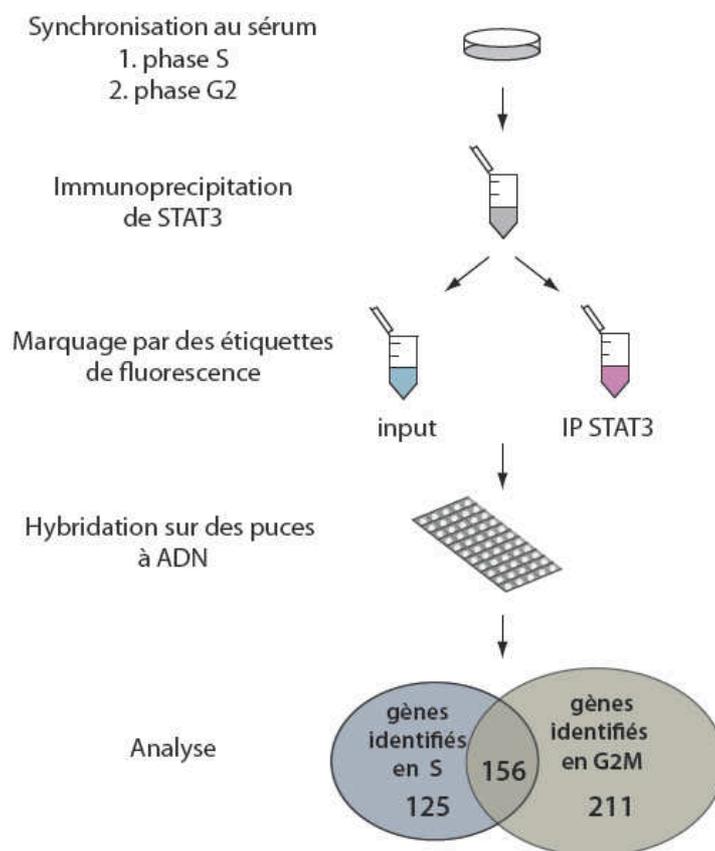


FIGURE 36 | Schéma récapitulatif de la technique du ChIP-on-chip. Les cellules HCT116 sont synchronisées pendant les phases S ou G2 du cycle cellulaire par la méthode de privation de sérum. A partir de la chromatine soluble, STAT3 est immunoprécipité en utilisant un anticorps dirigé contre la protéine. Après avoir généré des bout franc, effectué une ligation et une amplification par PCR, les échantillons sont marqués avec une étiquette de fluorescence (Cyanine 5 pour l’input et Cyanine 3 pour STAT3) puis déposés sur puces à ADN.

Pour analyser ces résultats, nous avons utilisé le système de classification Panther qui trie les gènes donnés par rapport à la base de donnée de Gene Ontology. Les différents gènes cibles potentiels de STAT3 sont classé selon leurs implications dans divers mécanismes biologiques : la signalisation, le développement, le cycle cellulaire, le métabolisme, le système immunitaire, la structure de la cellule, l’adhésion et la mort cellulaire. Les résultats de ce classement est présenté dans le tableau 2. Le nombre de gènes observés correspond aux différents gènes de notre étude impliqués dans les processus biologiques indiqués. Le nombre de gènes attendus, quant à lui, indique la valeur attendue. Il s’agit du nombre de gènes que nous pourrions attendre dans notre liste basée sur une liste de référence de Gene Ontology. La valeur *P* renseigne sur la probabilité que

le nombre de gènes obtenus correspond à cette catégorie. Une faible valeur *P* indique que le nombre de gènes observés est significativement et potentiellement intéressant (Il est recommandé que la valeur *P* soit inférieur à 0,05).

TABLEAU 2 | Classification des gènes cibles potentiels de STAT3 dans les cellules HCT116 d'après Panther.

PROCESSUS BIOLOGIQUES	PHASE S			PHASE G2		
	Gènes observés	Gènes attendus	<i>P</i>	Gènes observés	Gènes attendus	<i>P</i>
Signalisation	128	96.40	2.77E-04	211	148.81	2.40E-08
Développement	96	69.03	4.58E-04	160	106.56	7.04E-08
Cycle cellulaire	64	42.32	6.31E-04	97	65.33	6.63E-05
Immunité	84	60.45	1.14E-03	130	93.32	6.05E-05
Adhésion	48	30.66	1.57E-03	60	47.33	3.71E-02
Métabolisme	216	190.16	8.37E-03	336	293.54	7.21E-04
Structure cellulaire	47	33.19	1.09E-02	81	51.24	3.74E-05
Mort cellulaire	33	22.22	1.67E-02	51	34.30	3.66E-03

Nous avons ensuite déterminer le pourcentage de gènes présents dans ces huit catégories. Le pourcentage de ces gènes ne varie que très peu entre les gènes trouvés à partir d'une synchronisation en phase S et ceux trouvés à partir d'une synchronisation en phase G2-M. Nous avons choisi la synchronisation des cellules par privation de sérum pour s'affranchir d'une induction de gènes due au traitement. Cependant, cette méthode de synchronisation ne permet d'obtenir 100 % des cellules dans une même phase du cycle cellulaire. Etant donné que nous recherchions des gènes cibles potentiels de STAT3 impliqués dans la phase G2 et la mitose, nous avons décidé de regrouper les deux échantillons pour la suite de nos analyse. La répartition des gènes cibles potentiels de STAT3 appartenant à ces différents processus cellulaires est représentée dans la figure 37.

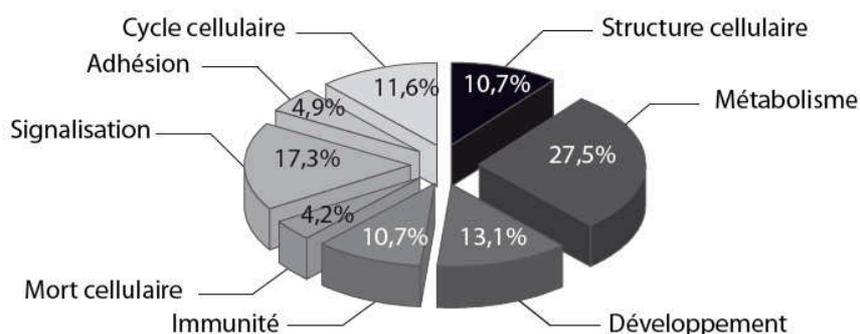


FIGURE 37 | Classement des gènes cibles potentiels selon différentes fonctions cellulaires.

Parmi les différents gènes cibles du facteur de transcription, 11,6% sont impliqués dans le cycle cellulaire. Pour notre étude, nous nous sommes donc plus particulièrement penchés sur les gènes impliqués dans la progression de la phase G2 vers la mitose. Par étude bibliographique, nous avons sélectionné 15 gènes correspondant à nos critères (Tableau 3).

TABLEAU 3 | Analyse bibliographique des gènes impliqués dans la progression de la phase G2 vers la mitose.

NOM DES GÈNES	RÔLES	RÉFÉRENCES
STIL	Rôle dans la duplication des centrioles lors de la mitose	(Castiel <i>et al.</i> 2011) (Erez <i>et al.</i> 2007)
RIC8A	Rôle dans l'orientation des fuseaux mitotiques	(Woodard <i>et al.</i> 2010)
BRD4	Essentiel pour la progression du cycle cellulaire Impliqué dans la transcription de Aurora B	(Dey <i>et al.</i> 2009) (You <i>et al.</i> 2009)
FoxM1	Régule le programme transcriptionnel nécessaire pour la progression de la mitose	(Major <i>et al.</i> 2004) (Laoukili <i>et al.</i> 2005)
MARS	Impliqué dans l'expression de Aurora B, PLK1, Cycline B1, Cdc25b et CENP-F	(Yang and Fan 2008) (Li <i>et al.</i> 2009)
NOTCH1	La survivine est un gène cible de la voie de Notch	(Lee <i>et al.</i> 2008)
MAPRE3	Régule l'organisation des microtubules durant la mitose	(Ban <i>et al.</i> 2009)
RECQL4	Rôle dans la formation des chromatides soeurs	(Petkovic <i>et al.</i> 2005)
CCNF	Fixe la cycline B1 et s'accumule en G2 pour favoriser la liaison de la cycline B1 avec Cdk1	(Fung <i>et al.</i> 2002) (D'Angiolella <i>et al.</i> 2010)
CDCA3	Responsable de la dégradation de Wee1 durant les phases S et G2	(Lim and Surana 2003) (Smith <i>et al.</i> 2007)
MAD1L1	Composant du point de contrôle de l'assemblage des fuseaux mitotiques	(Chi <i>et al.</i> 2008)
MAP4	Contrôle la dynamique des microtubules	(Ookata <i>et al.</i> 1997) (Chang <i>et al.</i> 2001)

NOM DES GÈNES	RÔLES	RÉFÉRENCES
Cdc25C	Déphosphoryle Cycline B1/Cdk1 permettant l'entrée en mitose	(Wang <i>et al.</i> 2007) (Timofeev <i>et al.</i> 2010)
Erc2	Régule l'activité des CAK et la progression de la mitose	(Chen <i>et al.</i> 2003)
NuMa	Acteur essentiel de l'assemblage et de la maintenance des fuseaux mitotiques	(Radulescu and Cleveland 2010) (Dionne <i>et al.</i> 1999)

A partir de cette liste, nous avons voulu confirmer les résultats obtenus lors du ChIP-on-chip. Nous avons donc réalisé des immunoprécipitations de chromatine de *STAT3* en utilisant un anticorps polyclonal dirigé contre la protéine, sur ces différents gènes. Nous avons été capables de confirmer que le facteur de transcription est recruté sur les promoteurs de *STIL*, *FoxM1*, *NuMa*, *Cdc25C* et *RIC8A* (Figure 38).

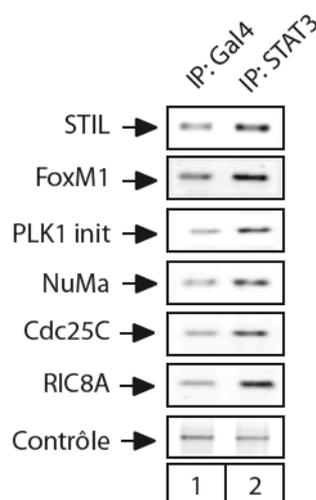


Figure 38 | *STAT3* régule les gènes impliqués dans la progression de la phase S vers la mitose. La chromatine soluble est préparée à partir des cellules HCT116 en croissance, puis immunoprécipitée avec un anticorps dirigé contre *STAT3* ou contre une immunoglobuline contrôle, Gal4. L'ADN est amplifié en utilisant une paire d'amorces qui couvre le site de liaison indiqué de *STAT3* sur les différents promoteurs. Le ChIP est ensuite analysé par PCR déposée sur gel d'agarose (n=4).

Avec l'ensemble de ces résultats, nous pouvons conclure que *STAT3* est activé durant la phase G2 pour se lier aux promoteurs de gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire de la phase S vers la phase G2M, tel que *PLK1*.

V. *STAT3* est important pour la progression de la phase S vers la mitose.

Nous avons montré précédemment que *STAT3* était impliqué dans la progression de la phase S vers la mitose en régulant les gènes de la phase G2 et de la mitose. Nous avons ensuite voulu déterminer si *STAT3* était nécessaire à cette progression du cycle cellulaire. Pour cela, nous

avons utilisé deux méthodes pour inactiver *STAT3* : des inhibiteurs chimiques du facteur de transcription et un siRNA dirigé contre *STAT3*. Afin d'étudier l'effet d'une perte de *STAT3* sur la progression du cycle cellulaire, l'ADN est marqué au DAPI puis analysé par cytométrie en flux.

Dans un premier temps, les cellules HT29 sont synchronisées à la transition des phases G1 et S du cycle cellulaire à l'aide de l'hydroxyurée. Un relargage de sérum pendant 6h et 9h nous a permis d'enrichir les cellules dans les phases S et G2-M. Pendant le relargage, nous avons utilisé deux inhibiteurs de *STAT3* : Stattic et *STAT3* VI inhibiteur. Ces deux inhibiteurs ont été décrits comme des inhibiteurs chimiques se fixant dans le domaine SH2 de *STAT3* empêchant sa dimérisation, sa translocation nucléaire ainsi que sa liaison à l'ADN (Figure 39A). Comme nous l'avons espéré, l'inhibition du facteur de transcription entraîne un ralentissement de la progression vers la mitose. Cependant, sur des temps plus longs de relargage, la totalité des cellules arrivent en mitose. Nous avons pensé que cet effet était dû aux inhibiteurs de *STAT3* qui n'inactivent pas totalement la protéine.

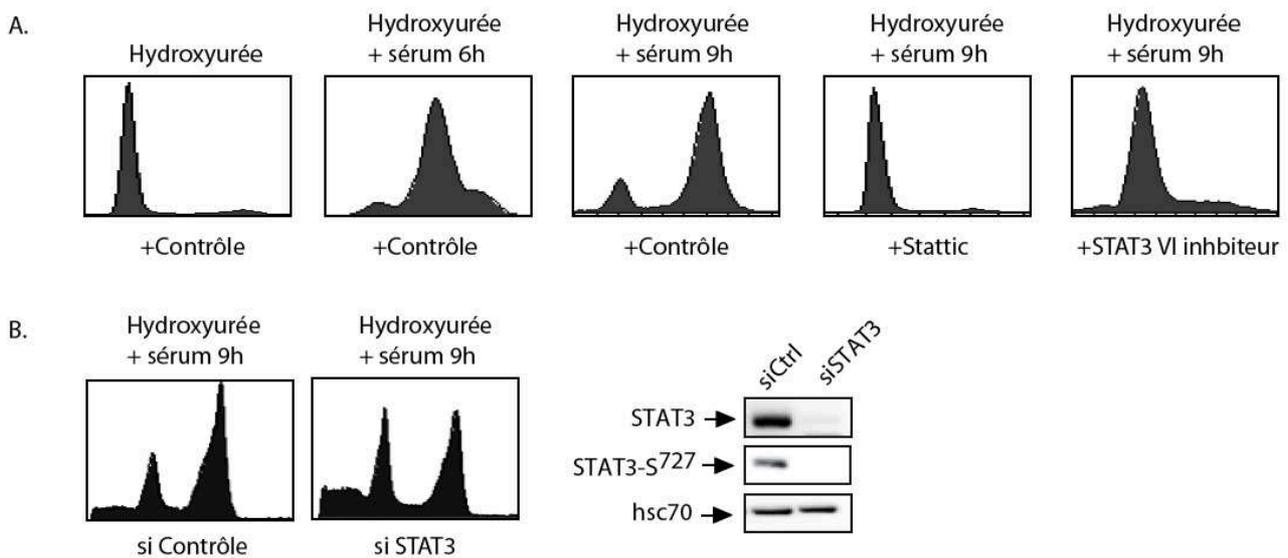


FIGURE 39 | *STAT3* est impliqué dans la progression de la phase G2 du cycle cellulaire.

A. Les cellules HT29 sont synchronisées à la transition G1-S du cycle cellulaire avec de l'hydroxyurée (2mM) pendant 15h. Puis les cellules sont lavées et stimulées avec du sérum pendant les temps indiqués en absence ou en présence d'inhibiteurs de *STAT3*, Stattic ou *STAT3* VI inhibiteur. L'analyse par FACS est alors utilisée pour analyser la progression de la phase G2 (n=3). **B.** Les cellules HT29 en croissance sont transfectées avec un siRNA dirigé contre *STAT3* ou une séquence contrôle, comme indiqué, puis les cellules sont synchronisées à la transition G1-S par l'hydroxyurée. Les cellules sont alors lavées puis stimulées avec du sérum pendant 9h. L'analyse par FACS est alors utilisée pour analyser la progression de la phase G2 (n=3) L'inactivation de *STAT3* est vérifiée par Western blot (partie de droite de la figure).

Nous avons donc, dans un deuxième temps, utilisé une deuxième méthode d'inactivation de *STAT3*. Pour cela, les cellules HT29 ont été transfectées avec un siRNA dirigé contre *STAT3* ou bien contre une séquence contrôle (Figure 39B). Les cellules ont été synchronisées à la transition

des phases G1 et S avec de l'hydroxyurée, puis lavées et stimulées au sérum pendant 9h afin d'enrichir les cellules pendant la phase G2 du cycle cellulaire. Par cette technique, nous avons confirmé qu'une perte du facteur de transcription *STAT3* ralentissait la progression de la phase G2 du cycle cellulaire.

Afin d'appuyer notre hypothèse sur l'implication nécessaire de *STAT3* dans la progression de la phase G2 vers la mitose, nous avons étudié la qualité de la condensation des chromosomes en mitose. Pour cela, nous avons utilisé des plasmides exprimant soit la forme constitutivement active du facteur de transcription, *STAT3*-Cys, soit une forme mutée sur le site 727, pour lequel la sérine est substituée en Alanine. Une fois transfectées, les cellules sont synchronisées en début de mitose par le nocodazole.

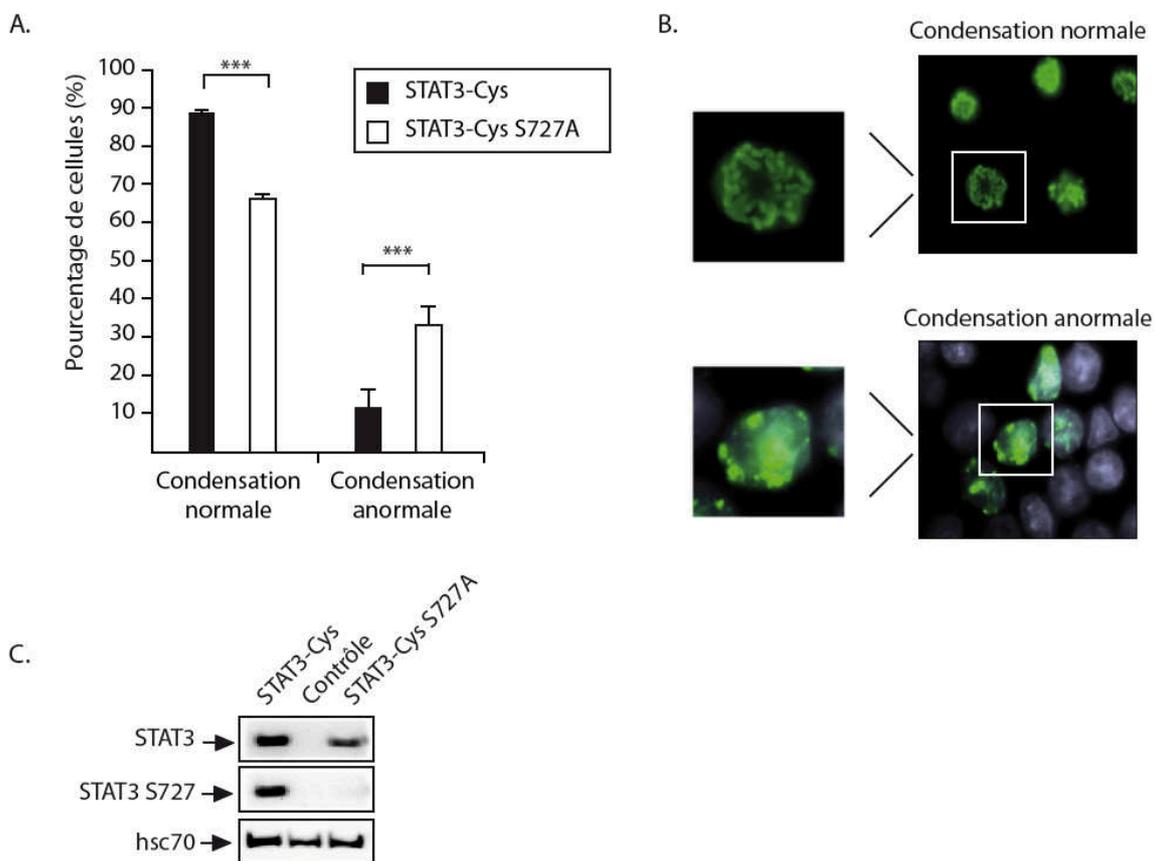


FIGURE 40 | *STAT3* est impliqué dans la progression de la phase G2 vers la mitose. **A.** Les cellules HCT116 sont transfectées avec un plasmide exprimant la forme active de *STAT3*, *STAT3*-Cys, ou bien avec la forme mutée sur la sérine 727, *STAT3*-Cys S727A puis synchronisées en début de mitose avec le nocodazole. Les cellules mitotiques sont marquées avec un anticorps dirigé contre la forme phosphorylée de la sérine 10 de l'histone H3, couplé à un fluorochrome, Alexa fluor 488. Le pourcentage de cellules présentant une condensation normale et anormale est évalué par microscopie à fluorescence ($n=4 \pm SD$). **B.** Illustration de mitoses normales et anormales. **C.** En parallèle, la transfection des plasmides de *STAT3*-Cys et de son mutant est vérifiée par Western blot en utilisant des anticorps dirigés contre *STAT3* et sa forme phosphorylée.

Pour distinguer les cellules mitotiques, nous avons réalisé, en plus du marquage de l'ADN au DAPI, un marquage par immunofluorescence de la forme phosphorylée de la sérine 10 de l'histone H3. Cette modification de l'histone H3, due à la kinase Aurora A, est considérée comme un marqueur de cellules mitotiques nécessaire pour la ségrégation et la condensation des chromosomes. Grâce au marquage de la mitose, la condensation des chromosomes est ensuite appréciée par microscopie à immunofluorescence.

Après avoir fait la distinction entre une condensation anormale et une condensation normale (Figure 40B), nous avons compté le nombre de cellules HCT116 présentant l'une ou l'autre de ces condensations, dans les cellules transfectées soit avec le plasmide *STAT3*-Cys, soit avec sa forme mutante, *STAT3*-Cys S727A (Figure 40A). Nous avons remarqué que la mutation de la sérine 727 de *STAT3* augmente de 25% le nombre de cellules présentant une condensation de la chromatine anormale, tandis que la forme active de *STAT3* ne modifie pas l'état de condensation de la chromatine.

Par conséquent, ces résultats suggèrent que le facteur de transcription *STAT3* est nécessaire pour la progression de la phase G2 vers la mitose, mais il est également indispensable à la condensation de l'ADN.

Pour confirmer cette hypothèse, nous avons étudié par cytométrie en flux, l'ADN en 8n et la mort cellulaire, reflétées par le subG1, dans les cellules HT29 et HCT116 synchronisées en début de mitoses par le nocodazole en absence de *STAT3* (Figure 41).

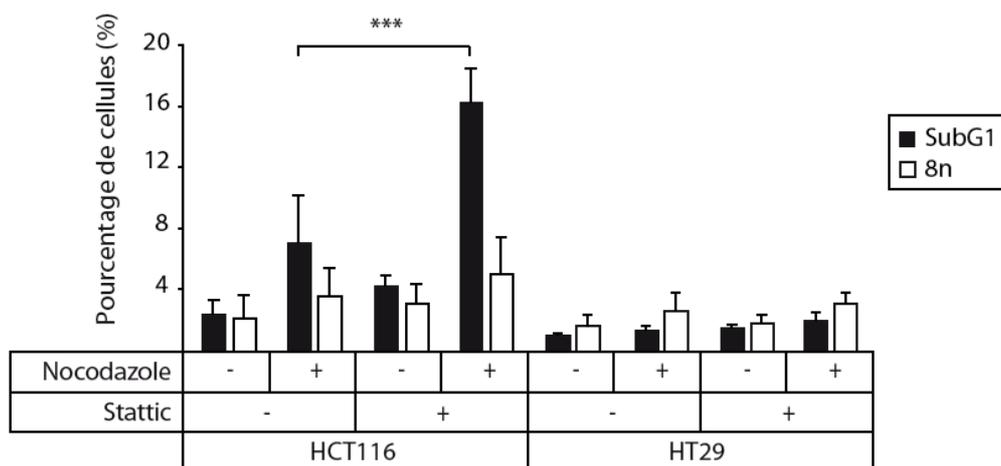


FIGURE 40 | *STAT3* est nécessaire pour la progression normale de la phase G2 vers la mitose. Les cellules HT29 et HCT116 sont traitées ou non avec le nocodazole et/ou Stattic pendant 15h. Puis le subG1 et le 8n est analysé par FACS après un marquage de l'ADN au DAPI (n=3 ± SD, p<0,001).

Nous avons choisi d'effectuer cette étude sur ces deux lignées colorectales parce qu'elles présentent un point de contrôle des fuseaux mitotiques différents. De plus, ces lignées diffèrent par

leurs mutations. En effet, contrairement aux cellules HCT116, les cellules HT29 sont mutées sur le codon 273 de p53, au niveau de son domaine de liaison à l'ADN. Lorsque les cellules ont été traitées séparément avec le nocodazole ou avec Stattic, aucune différence significative n'a été observée dans ces deux lignées. Cependant, la combinaison de ces deux traitements a entraîné des modifications notables. En absence de STAT3, et après traitement au nocodazole, le pourcentage de subG1 a augmenté seulement dans les cellules HCT116. Nous pouvons donc affirmer que cet effet est spécifique du type cellulaire. Cette différence observée peut être due soit au point de contrôle des fuseaux mitotiques, soit à l'inactivation du gène suppresseur de tumeur, p53 dans les cellules HT29.

VI. Conclusion : STAT3 est activé pendant la phase G2 du cycle cellulaire pour réguler l'expression des gènes impliqués dans la progression vers la mitose

L'ensemble de ces résultats a montré que le facteur de transcription STAT3 est phosphorylé sur son résidu sérine 727 pendant la phase G2 du cycle cellulaire. Cette activation de STAT3 est nécessaire à une progression normale du cycle cellulaire de la phase G2 vers la mitose.

Ce chapitre amène une nouvelle fonction au facteur de transcription STAT3. Durant le cycle cellulaire, STAT3 est principalement connu pour activer les gènes impliqués dans la progression de la phase G1, tels que la Cycline D1, de Cdc25a, c-Myc. Cette activation se fait par phosphorylation sur son résidu tyrosine 705, en réponse à une stimulation de cytokines. Durant cette phase G1, il a été montré que la phosphorylation de la sérine 727 permet d'augmenter l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription. Dans nos travaux, nous avons montré que le facteur de transcription peut être actif lorsqu'il est seulement phosphorylé sur son site sérine 727 et peut donc réguler l'expression des gènes. Nous avons également mis en évidence que cette phosphorylation permet la progression de la phase G2 vers la mitose.

De plus, il est intéressant de mettre en parallèle les deux voies de signalisation dues à la phosphorylation du résidu sérine 727 de STAT3. Cette modification sur le même résidu, effectuée par deux kinases différentes, donne lieu à deux voies distinctes : la réparation des dommages de l'ADN en réponse à agent génotoxique ou bien la progression du cycle cellulaire vers la mitose. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que, selon les cofacteurs de STAT3, ou bien selon les modifications post-traductionnelles, le facteur de transcription ne se fixera pas sur les mêmes gènes.

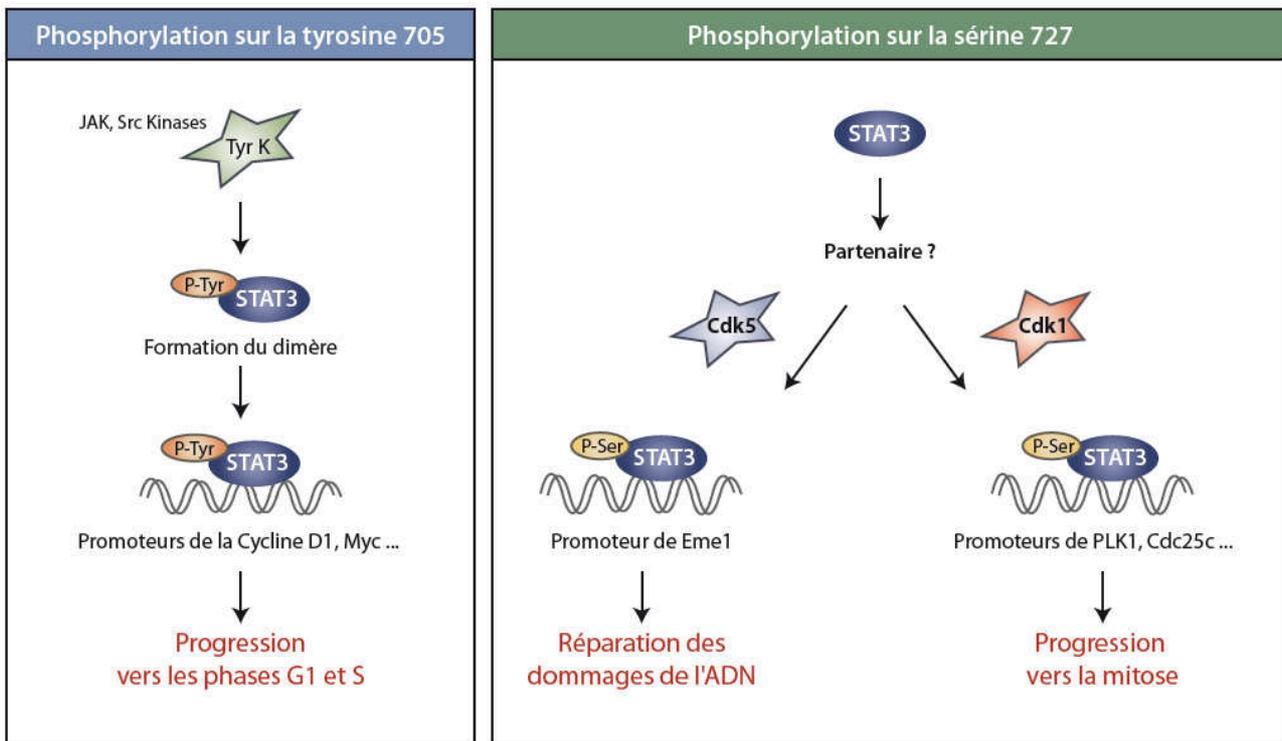


FIGURE 42 | Les différents rôles de STAT3. Les deux phosphorylations du facteur de transcription lui confère des rôles distincts. Cependant, une même phosphorylation peut conduire à deux voies différentes. En réponse à un agent génotoxique, STAT3-Ser727 se fixe sur le promoteur de Eme1 pour induire la réparation des dommages. Néanmoins, dans le cycle cellulaire, STAT3-Ser727 se fixe sur les promoteurs de gènes de G2 et de mitose pour permettre la progression cellulaire et contrôler la condensation de la chromatine.

**THE STAT3 TRANSCRIPTION FACTOR IS ACTIVATED DURING
THE G2 PHASE OF THE CELL CYCLE TO REGULATE THE EXPRESSION OF
GENES INVOLVED IN PROGRESSION TOWARDS MITOSIS**

**Hélène Sellier¹, Amélie Rébillard^{1,4}, Aude-Hélène Pavageau¹, Isabelle Valo³,
Elisa Ravon¹, Erick Gamelin¹, Charles Vadnais²,
Alain Nepveu², Benjamin Barré¹ and Olivier Coqueret^{1*}**

¹Paul Papin ICO Cancer Center; INSERM U892; Angers, France

²Rosalind and Morris Goodman Cancer Research Centre,
McGill University, Montreal, QC, Canada

³Paul Papin ICO Cancer Center; Angers, France

⁴Present address: EA1274, Rennes, France

running title: STAT3 Ser727 phosphorylation during the G2 phase

* Corresponding Author:

Institut de Cancérologie de l'Ouest, Paul Papin, INSERM U892

2 rue Moll, 49033 ANGERS, France

olivier.coqueret@univ-angers.fr

Tel.: (33) 2 41 35 29 14 FAX: (33) 2 41 48 31 90

Abstract

STAT3 transcription factors are cytoplasmic proteins that induce gene activation in response to growth factor stimulation. Following tyrosine phosphorylation on its 705 residue, STAT3 activates genes which are often involved in the progression of the G1 phase of the cell cycle. In the absence of tyrosine phosphorylation, STAT3 can still induce gene activation and this has been correlated with the phosphorylation of its serine 727 site located in the transactivation domain. Importantly, it has been reported in this case that its target genes are different as compared to genes upregulated in response to the tyrosine-phosphorylated form. These results suggest that STAT3 post-translational modifications play an important role in the specificity of its transcriptional activity. In the work reported here, we found that the Ser727 site is a major phosphorylation site in colorectal cancer, using either cell lines or primary tumor samples. Cell synchronization experiments indicate that this phosphorylation increased in the G2 phase of the cell cycle and that STAT3 is phosphorylated by the cdk1 kinase. Chromatin immunoprecipitation and genome-wide location analysis indicate that STAT3 binds to the promoter of the polo-like

kinase 1 gene to induce its expression as well as to the promoters of several G2-specific genes. Results also indicate that STAT3 is necessary for the progression from S phase to mitosis and for normal chromosome compaction. Thus, in addition to its role during the G1 phase, the STAT3 transcription factor also serves as a cell-cycle dependent transcriptional factor necessary for the progression of the G2 phase.

Introduction

Signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) proteins are cytoplasmic transcription factors that dimerize and translocate into the nucleus following growth factor stimulation. In contrast to normal cells where its activation is only transient, constitutive activation of STAT3 has been reported in several primary cancers, in tumors cell lines and in many oncogene-transformed cells (1-5). In cancer cells, STAT3 plays an essential role in the regulation of genes involved in cell cycle progression and cell survival. In most cases, its activation relies on tyrosine kinase such as JAK or src, which phosphorylate its tyrosine 705 residue (Tyr705) to allow a complete activation of the dimer. The transcription factor is phosphorylated on a second

residue, serine 727 (Ser727), which is located in the transactivation domain. This phosphorylation has been initially characterized as an important event in the regulation of STAT3 transcriptional activity (6), but it remains to be fully demonstrated that the Ser727 phosphorylation is required for the interaction with STAT3 transcriptional coactivators such as CBP, NcoA or PTEF/b (7, 8).

The STAT3 activation pathway has been initially characterized following growth factor or cytokine stimulation of quiescent cells. For instance, upon IL6 stimulation, it is well known that STAT3 is phosphorylated on Tyr705 to activate genes such as Myc or Cyclin D1 which then induce cell growth and early cell cycle progression (9-12). It is important to keep in mind that these descriptions of STAT3 functions correspond to molecular events occurring at the G0/G1 transition that are associated with cellular proliferation but not necessarily with cell cycle regulation per se. Consequently, it remains to be precisely determined whether STAT3 is activated during other phases of the cell cycle and whether these potential functions rely solely on Tyr705 phosphorylation. Interestingly, the long-standing view of STAT3 activation has been recently challenged by several results. Although tyrosine phosphorylation was expected to be associated with nuclear translocation and DNA binding, several studies have described that the unphosphorylated transcription factor can form stable homodimers. Accordingly, it has been recently reported that STAT3 can activate gene transcription and play an important role in cancer cell in the absence of Tyr705 phosphorylation (13, 14). Using mutated forms of the transcription factor, Yang et al. have shown that STAT3 binds to the NF- κ B transcription factor to induce the expression of genes such as RANTES, IL6 or IL8 (15). This occurs in the absence of Tyr705 phosphorylation and late after the initial stimulation, suggesting that these genes are not activated during the early step of STAT3 signaling by conventional tyrosine-phosphorylated forms of the transcription factor. Recent elegant results have also suggested that the protein tyrosine phosphatase TCPTP prevents any abnormal activity of STAT3 during S phase (16). Although this effect relies in this case on the tyrosine phosphorylation of the transcription factor, these observations indicate that STAT3 can potentially regulate genes involved in S phase progression and not only in G1. Finally, we have recently shown that STAT3 regulates genes involved in DNA repair during the G2 phase of the cell cycle, following topoisomerase I inhibition (17, 18). This effect relies mainly on the phosphorylation of the transcription factor on its Ser727 residue by the cdk5 kinase. Altogether, these results suggest

that STAT3 probably regulates gene transcription not only during early G1 but also during other phases of the cell cycle and that this may be independent of Tyr705 phosphorylation. If this is effectively the case, it will be important to determine how this transcription factor is regulated during cell cycle progression and if its activity can be regulated by cyclin-cdk complexes. In line with this hypothesis, we and others have shown that D-type cyclins can bind to STAT3 to regulate its transcriptional activity during the G1 phase of the cell cycle (19-21). Whether this is also occurring in the S or G2 phases remains to be determined.

During the course of our experiments, we have noticed that STAT3 was constitutively phosphorylated on Ser727 in colorectal cell lines. In this study, we confirmed this observation and showed that this is also the case in tumor samples isolated from patients suffering from colorectal cancer. Using cell cycle synchronization, we have observed that this phosphorylation occurs during the G2 phase of the cell cycle and that it is mediated by the cdk1 kinase. Interestingly, STAT3 binds to the promoter of the PLK1 gene to regulate its expression, as well as to several genes involved in G2 progression as shown by genome wide analysis. Altogether, these results uncover a new function of the STAT3 transcription factor during the progression of the G2 phase of the cell cycle.

Materials and methods

Antibodies, siRNA

Polyclonal anti-STAT3 (C20), anti-phospho-STAT3-Ser 727 (ser727-R), anti-Cdc25C, anti-Numa and anti hsc70 (B-6) were obtained from Santa Cruz (Santa Cruz Biotechnology, CA, 95060, USA). The anti-phospho-STAT3-Ser 727 conjugated to PE was obtained from Beckton Dickinson. The anti-phospho-STAT3-Tyr705 was obtained from Cell signaling (Beverly, MA, USA). The STAT3 siRNA have been obtained from Dharmacon (Dharmacon, Inc, CO, USA) and transfected using the Dharmafect 4 (Dharmacon) method. Pools of three different siRNAs were used for each transfection.

Cell synchronisation

To synchronize cells at the G1/S transition, cells were treated with hydroxyurea (2mM) (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) for 15hr and released for the indicated times in growth medium complemented with 10% serum. For mitosis synchronization, cells were treated with nocodazole (30 ng/mL) (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) for 16hr. For the thymidine double block, cells were first treated with thymidine (2mM) for 18hr, then released in

growth medium complemented with 10% serum for 9hr and finally treated with thymidine (2mM) for 14hr. For serum starvation, cells were starved for 48hr in 0.1% serum and released with fresh media complemented with 10% serum for 5hr (G1 phase), 13hr (S phase) or 18hr (G2/M).

Chromatin immunoprecipitation assay (ChIP) and ChIP-ChIP analysis

Attached cells were washed twice with cold-PBS and then cross-linked with 1% formaldehyde at room temperature for 7 min. Cells were washed with glycine (125mM). Cells were lysed with 400 μ L of lysis buffer (1% SDS, 10 mM EDTA, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.1, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 2 μ g/ml leupeptin, 5 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml pepstatinA, 0.5M NaF, 100mM Na₃VO₄). Lysats were sonicated six times for 20s each. Supernatant were recovered by centrifugation at 13000 RCF for 10 min at 4°C, diluted one time in dilution buffer (1% Triton X-100, 20mM tris-Hcl, pH 8.1, 2mM EDTA, 150 mM NaCl, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 2 μ g/mL leupeptin, 5 μ g/mL aprotinin, 1 μ g/mL pepstatinA, 0.5M NaF, 100mM Na₃VO₄), and subjected to one round of immunoclearing for 2 h at 4°C with 20 μ L of 50% slurry mix protein G-agarose and protein A-agarose coated with salmon sperm DNA (Millipore). Immunoprecipitation was performed overnight with specific antibodies, then 20 μ L of 50% slurry mix protein G-agarose and protein A-agarose coated with salmon sperm DNA was added for 1 h at 4°C. Immunoprecipitates were washed in TSE1 (0.1% SDS, 1% Triton X100, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCl pH 8.1 and 150 mmol/NaCl), TSE2 (0.1% SDS, 1% Triton X100, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCl pH 8.1 and 500 mmol/NaCl), buffer 3 (0.25 mM LiCl, 1% NP40, 1% Deoxycholate, 1 mM EDTA and 10 mM Tris-HCl pH8.1). Beads precipitated were washed once with TE buffer (10 mM Tris, pH 7.6, 100mM EDTA) and eluted with 500 μ L of elution buffer (1% SDS and 0.1 mM NaHCO₃) for 1h. Eluates were heated at 65°C for 6hr and DNA was precipitated using classical procedures. For PCR, 5 μ L from a 100 μ L DNA preparation were used for 30 cycles of amplifications. Primer sequences are available on request. For ChIP-ChIP analysis, a total of 3 to 6 x10⁸ cells were used for each purification. Total chromatin was obtained and immunoprecipitated DNA fragments and input samples were blunt ended using T4 DNA polymerase and then ligated to a linker (JW102: 5' - GCGGTGACCCGGGAGATCTGAATTC, JW103: 5'-GAATTCAGATC) using T4 DNA ligase. The linker is then used as a primer binding site for amplification by PCR (25 cycles, using

JW102 as a primer). The amplified DNA was then Cy5 (Immunoprecipitated sample) or Cy3 (Corresponding input) labeled using the Dual-Color DNA Labeling Kit from Roche Nimblegen according to the manufacturer's instructions. Labeled DNA was then hybridized to the Nimblegen 385k human promoter array set. Scanning was done on an Agilent 5 μ m resolution scanner and the images obtained were processed and analyzed for the identification of binding sites using the Nimblescan software from Nimblegen.

Cases and tissues

One hundred and two patients with adenoma or colorectal adenocarcinoma were studied by immunohistochemistry. Note that samples were taken from patients that had not undergone any chemo- or radiotherapy before surgical resection. There were 30 adenomas with 15 low-grade adenoma and 15 high-grade adenoma: the dysplasia was graded according to the established criteria of architectural features and cytological atypia. 87,13% of the tumor were situated in the colon, 6,93% in the rectum and 5,94% in the rectosigmoid hinge. All tumours were obtained from the Department of Pathology at Paul Papin Center, at University Hospital of Angers, and from the Center of Pathology of Angers, between 2000 and 2005, after local ethical approval.

Immunohistochemistry

Formalin fixed paraffin wax embedded tissues were cut into 4 μ m sections and placed on a slide, dry at 60°C for 2hr and then disposed in the automate Ventana (Benchmark®) for the entirely automatised step of deparaffinage and immunohistochemistry with antibodies directed against phospho-STAT3-Tyr705 (B7, Santa Cruz Biotechnology) and phospho-STAT3-Ser727 (S727-R, Santa Cruz Biotechnology). The immunohistochemistry was evaluated by the percentage of staining cells, the type of staining (nuclear or cytoplasmic), and the intensity (with three groups: low, moderate, high). To exclude subjectivity, all slides were evaluated by two pathologists who had no knowledge of the patients' identities or clinical status. In discrepant cases, the two pathologists reviewed the slides together and reached a consensus.

Results

STAT3 is phosphorylated on its Ser727 residue in colorectal cancer

STAT3 is well known to be activated on its Tyr705 phosphorylation site following growth factor stimulation and G0 exit. To verify this observation, several colorectal cell lines were serum starved for two days and stimulated with IL6 for 30 mn. As expected, we effectively

observed that the transcription factor was phosphorylated on its Tyr705 site (Figure 1A). Note that in our experimental conditions, cells are grown in 3% FBS and that in that case, we were not able to detect a significant constitutive phosphorylation of this residue in growing conditions. By contrast, STAT3 was constitutively phosphorylated on its Ser727 residue in growing cells and this phosphorylation was easily detected. Note that IL6 did not significantly affect the Ser727 site in colorectal cell lines. To further confirm this observation, we used tumor samples isolated from patients suffering from colorectal cancer. One hundred and two samples were collected, corresponding to 15 low-grade adenoma, 15 high-grade adenoma and 72 colorectal carcinomas. Importantly, these primary tumors have not received prior chemotherapy since we and others have shown that STAT3 is activated in response to genotoxic treatments and is involved in DNA damage signaling (17, 18, 22). As expected, immunocytochemistry experiments confirmed that STAT3 was phosphorylated on the Tyr705 site (Figure 1B). However, both in adenoma and in adenocarcinoma, we noticed that a higher percentage of cells express the Ser727-phosphorylated form of STAT3 (Figure 1C). This activation was detected at the early step of colorectal cancer, as early as at the low dysplasia adenoma stage. We noticed a significant increase in the number of cells expressing the serine-phosphorylated form of STAT3 at the transition between the low and high-grade dysplasia (Figure 1D). Surprisingly, this phosphorylation was also observed in cells presenting condensed chromatin and mitotic figures (Figure 1E).

Altogether, these results suggested that the Ser727 site is an important phosphorylation site in colorectal cancer and that this phosphorylation might somehow be connected with progression towards mitosis.

STAT3 is phosphorylated on its Ser727 site during the G2 phase of the cell cycle

In light of these observations, we then determined if STAT3 was activated during progression from S phase to mitosis. To this end, HT29 or HCT116 colorectal cell lines were synchronized using various strategies to obtain populations of cells enriched in these phases of the cell cycle: treatment with nocodazole, double-thymidine block, or serum starvation–stimulation. In each case, cell-cycle distribution was monitored by fluorescence activated cell sorting (FACS) analysis. Following nocodazole treatment of growing cells, FACS analysis indicated that HT29 cells were synchronized in the G2/M phase of the cell cycle (Figure 2A, right part). In this condition, a significant increase of the serine 727 phosphorylation was observed (Figure 2A, lanes

1-3). As expected, cyclin B expression was also increased. This effect was also observed in a different cell line, HCT116, where a significant increase of STAT3-serine phosphorylation was also observed (Figure 2A, lanes 4-6). To confirm this observation, HT29 cells were then synchronized by the double thymidine block procedure and then restimulated with 10% serum. Cells reached the G2 phase following 5 hr of stimulation and under these conditions, we observed that STAT3 was also phosphorylated on its Ser727 residue (Figure 2B, lanes 1-3). Since we were concerned that this effect could be related to a non specific effect of nocodazole or thymidine, HCT116 were serum starved for two days and then stimulated with 10% FBS to reenter cell cycle. Under these conditions, cells were in the G1 phase of the cell cycle after 5hr, reached S phase after 9-10 hours and the G2 phase after 13-15 hrs. Results confirmed that STAT3 serine phosphorylation was increased during progression towards G2 and that this phosphorylation occurred when cyclin B was upregulated (Figure 2C, compare lane 1 and 2-4). To further confirm these results, FACS experiments were performed on nocodazole-treated cells using propidium iodide staining conjugated with intracellular staining using phospho-serine 727 antibodies. Using this experimental approach, a significant phosphorylation of the transcription factor on its serine residue was also noted on the G2/M subpopulation (Figure 2D).

Altogether, we concluded from these results that whatever method of cell synchronization was used, STAT3-serine phosphorylation increased during the progression from S phase to mitosis in colorectal cell lines.

STAT3 is phosphorylated on its Ser727 residue by the cdk1 kinase

Several kinases such as PLK, Aurora and cdk1 are well known to play an important role in the progression from S phase to mitosis (23-25). In a different experimental setting, it has been already proposed that STAT3 can be phosphorylated by cdk1 (26). As a first attempt to characterize the phosphorylation of the transcription factor, cells were treated with nocodazole and several kinases or cyclins were immunoprecipitated from cell extracts and incubated for 15 min in the presence of cold-ATP with an histidine-tagged STAT3 fusion protein expressing the C-terminal domain of the transcription factor (amino-acids 716-770, see Figure 3A). Under these conditions, STAT3 was significantly phosphorylated by the cdk1 kinase and weakly by the cyclin B immunoprecipitation (Figure 3B). No modifications were noticed when the Aurora-A, PLK1 and cdk2 kinases were immunoprecipitated or when cyclin D or E antibodies were used as a

control. To extend this observation, cells were transfected with siRNA directed against cdk1 or a control sequence and STAT3 Ser727 phosphorylation was evaluated following nocodazole treatment. Western Blot experiments indicated that cdk1 levels was reduced to around 20% of the initial amount (Figure 3C, lanes 1-2) and that this induced a significant downregulation of STAT3 Ser727 phosphorylation. In this condition, and as stated above, we were not able to detect any Tyr705 phosphorylation of the transcription factor (data not shown).

Altogether, we concluded from these results that STAT3 is phosphorylated by the cdk1 kinase during progression from G2 to mitosis.

STAT3 Regulates the expression of genes involved in the progression from S phase to mitosis

In light of these observations, we made the hypothesis that STAT3 was involved in the activation of genes regulating the progression from S phase to mitosis. As a first attempt to test this hypothesis, we first evaluated the expression of G2 specific genes such as Aurora-A, PLK1, survivin and cyclin B1. As expected, western blot experiments indicated that these genes were upregulated following nocodazole treatment (Figure 4A). To determine if STAT3 was involved in their activation, cells were transfected with siRNA directed against the transcription factor or control sequences and synchronized in the G2 phase of the cell cycle. Under control conditions, results showed that the mRNA expression of the PLK1 gene was increased following synchronization. By contrast, this effect was significantly reduced when STAT3 level was downregulated (Figure 4B). Western blot experiments confirmed that the expression of PLK1 protein was also downregulated in the absence of the transcription factor (Figure 4C). This effect was specific since the expression of other genes such as Aurora-A or survivin was not modified following STAT3 downregulation (Figure 4D). This result indicates that PLK1 downregulation was not simply explained by a reduced cell cycle progression. Transcription factor recognition site analysis of the PLK1 promoter revealed the presence of potential STAT3 binding sites (Figure 4E, genomatis analysis). To determine if the transcription factor was associated with the PLK1 promoter and if this binding was observed in the G2 phase of the cell cycle, chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments were then performed. Control Gal4 antibodies were used as negative controls. ChIP experiments confirmed that the endogenous STAT3 was recruited to the PLK1 promoter during the G2 phase of the cell cycle (Figure 4E,

lanes 1-3 for quantitative PCR analysis and 4-6 for agarose gel).

To further extend this result, we then used a genome-wide screening method based on ChIP followed by hybridization to a promoter microarray. To this end, HCT116 cells were synchronized by serum starvation/serum stimulation in the S or G2 phases of the cell cycle, DNA regions immunoprecipitated by STAT3 antibodies were then analyzed using a set of human promoter microarrays containing the regions spanning from 3500 bp upstream to 750 bp downstream of the transcription start sites of 20500 human genes. Using $p < 0.005$ as a P-value threshold, we identified 125 STAT3 potential targets in S phase, 211 in G2/M and 156 common targets (Figure 5A). As expected, these genes are involved in several distinct signaling pathways, but among these potential new STAT3 targets, some of these have already been reported to play a direct or indirect role in the progression towards mitosis (Figure 5B). Using ChIP experiments, we were able to confirm that STAT3 was effectively recruited to the promoters of the STIL, FOXM1, NUMA, CDC25C and RIC8A genes (Figure 5C and 5D).

Altogether, we concluded from these results that STAT3 is activated during the G2 phase to bind to the promoter of genes involved in the progression of the cell cycle such as PLK1.

STAT3 is involved in the progression from S phase to mitosis

We then determined if STAT3 was necessary for cell cycle progression from S phase to mitosis. To this end, HT29 cells were synchronized at the G1/S transition with hydroxyurea and then released using serum stimulation. As described above, cells reached the G2 and M phases of the cell cycle (4N DNA content) following 9 to 10 hr of stimulation. Interestingly, when STAT3 was inactivated using two different specific chemical inhibitors (static, STAT3 VI inhibitor), the speed of progression towards mitosis was reduced (Figure 6A). Note that most cells finally reached mitosis so that we believe that STAT3 inactivation does not completely prevent cell cycle progression during G2. To confirm this observation, HCT116 cells were transfected with an siRNA directed against STAT3 or a control sequence. When these cells were synchronized at the G1/S transition by hydroxyurea and then further stimulated with 10% serum, we also noticed that the progression to the G2/M phase was delayed (Figure 6B). To extend these results, cells were transfected or not with a plasmid expressing either the activated form of the transcription factor, STAT3-Cys (5), or this active form of the transcription factor mutated on its Ser727 site (STAT3 S727A). Cells were treated with nocodazole to induce early

mitosis synchronisation and chromosome condensation figures were then counted, by staining the phosphorylation of histone H3 on serine 10. Interestingly, we noticed a significant increase in abnormal DNA condensation in the presence of the mutated form of the transcription factor, whereas wild type STAT3-Cys did not induce the presence of abnormal chromosomes (Figure 6C). This result suggested that STAT3 was necessary for a normal G2-M progression and DNA compaction. To extend this observation, cells were treated with nocodazole, in the presence or absence of the STAT3 inhibitor static. Cell death (subG1) as well as the presence of cells presenting an abnormal 8N DNA content were then evaluated by FACS analysis. HCT116 and HT29 cells were chosen, since these cells have been reported to have different spindle checkpoint responses (27). No significant effect was noticed when both cell lines were treated with nocodazole or static alone (Figure 6D). Interestingly, we observed that the presence of the two drugs at the same time induced a significant increase in cell death. Importantly, this effect was only observed in HCT116 cells, indicating that this death response is cell-type specific. We speculate that this might be explained by a difference in mitotic checkpoint activation as previously reported (27). Alternatively, this could also be related to the inactivation of the p53 tumor suppressor gene in HT29 cells.

Altogether, these results indicate that STAT3 activity and its phosphorylation on the Ser727 residue is necessary for a normal progression of the cell cycle from G2 to mitosis.

Discussion

In this study, we have found that STAT3 is phosphorylated by the cdk1 kinase during the G2 phase of the cell cycle. We have also observed that the transcription factor can bind to the promoter of the PLK1 gene to induce its expression during this phase of the cell cycle. Genome wide analysis was used to extend the number of STAT3 potential targets during G2. As a consequence, STAT3 downregulation reduces the speed of the G2 phase and the overexpression of a mutated form of the transcription factor on its Ser727 residue induced abnormal DNA condensation. In light of these results, we propose that STAT3 should not be considered as active only during the G1 phase of the cell cycle and that this transcription factor also plays an important role during the G2 phase.

Besides its normal functions, STAT3 has been reported to be abnormally active in several cancers and as an oncogenic transcription factor, this protein hyperactivates growth-promoting genes involved in cell cycle progression and prosurvival functions. We and others have shown

that STAT3 can bind to the promoters of genes such as Myc, Fos, cyclin D1 or cdc25A to induce cell cycle progression, and in parallel to genes such as Bcl2, Bcl-xL or survivin to induce cell survival and tumor escape. STAT3 can also upregulate genes involved in the epithelial-mesenchymal transition (EMT) such as Twist, Liv1 or metalloproteases. It is interesting to note that the cell cycle genes generally used as STAT3 targets are very often involved in the progression of the G1 phase. For instance, myc, cyclin D1 and fos are well known to be involved in the regulation of the early phase of the cell cycle. Surprisingly, we don't know much about the regulation of STAT3 in the other phases of the cell cycle. Since every oncogenic transcription factor can probably deregulate genes involved in DNA replication or chromosome condensation to favour genetic instability, we made the hypothesis that STAT3 also affects gene transcription in the S or G2/M phases. Interesting studies have already suggested that this is indeed the case (26). For instance, the transcription factor has been recently reported to be inhibited by the T cell protein tyrosine phosphatase (TCPTP) in response to DNA replication stress to prevent abnormal S phase progression (16). These results suggest that the transcription factor has the ability to activate gene expression during S phase. In addition, recent results have shown that STAT3 can associate with NF- κ B and induce the expression of several genes that theoretically could participate to the progression of the S and G2 phase of the cell cycle (13, 15). Although this was not investigated further, PLK1 was one of the gene that was identified in this study. Since STAT3 is well known to play an important role in colorectal cancer (28, 29), we propose the hypothesis that this oncogene induces abnormal proliferation not only through the activation of the G1 phase but also through the S and G2/M phases, and that this might lead to abnormal chromosome separation.

Altogether, and in association with recent data obtained from STAT3 genome wide analysis, these observations also lead to the important conclusion that STAT3 induces different transcriptional programs that probably depend on cell stimulation but most importantly on the activation of specific phosphorylation sites on the transcription factor. Although it was initially believed that Tyr705 phosphorylation is essential for STAT3 activity, several groups have recently reported that specific forms of the transcription factor which are only phosphorylated on its Ser727 residue can induce gene activation and most importantly drive tumorigenesis. In addition, we have recently shown that STAT3 is able to induce the expression of DNA repair genes when phosphorylated on this serine residue and that this

is occurring during senescence induction. We believe that the Ser727 phosphorylation alone can probably not explain these different transcriptional responses. Interestingly, STAT3 is not only phosphorylated in response to cell stimulation since its acetylation on the Lys685 residue plays an important role in its dimerization (30). Important results have recently shown that STAT3 is methylated on K140 by the histone methyl transferase SET9 and demethylated by LSD1 (31). When methylated, STAT3 appears to bind promoters selectively, further indicating that post-translational modifications are certainly essential events in the specificity of STAT3 target genes. We speculate that a specific set of modifications allows the interaction with transcriptional partners that would direct a STAT3 enhanceosome to precise DNA sequences, allowing the specificity of the transcriptional response. If this hypothesis is true, then we can expect that the post-translational modifications of STAT3 are different during the G2 phase as compared to G1 and that this would result in the recruitment of a different enhanceosome on the Myc or cdc25A promoters as compared to the PLK1 gene.

The abnormal activation of the STAT3 oncogene has been reported in many tumor samples, and this is often associated with a poor prognosis. Importantly, the activation of the transcription factor is generally investigated through the use of antibodies directed against its Tyr705 phosphorylated form. However, in light of this study and of the results reported above, we would argue that one should be cautious with the interpretation of STAT3 immunohistochemistry results, since its oncogenic functions rely probably not only on one phosphorylation site. This has been recently suggested for the NFkB2 transcription factor, which can function as a tumor suppressor or as an oncogene, depending on different phosphorylations (32). Surprising results have recently shown that STAT3 might prevent the invasiveness of intestinal tumors in late stage disease, it will be interesting to determine if this effect correlates with a specific phosphorylation pattern of the transcription factor (33). In our experimental conditions, we have observed that human colorectal tumors mainly expressed the serine phosphorylated form of the transcription factor, although the tyrosine-phosphorylated form of the transcription factor was also detected. Unfortunately, immunohistochemistry experiments do not allow to determine if the transcription factor is phosphorylated on the two sites at the same time. Nevertheless, these results suggest that STAT3 tyrosine and serine phosphorylations are heterogeneous within primary tumors. It will be important to determine if this also the case when

investigating Lys685 acetylation or K140 methylation status on tumor samples. This leads to the interesting hypothesis that a specific set of modifications (phosphorylation/acetylation/methylation) might define subpopulations of tumor cells. In colorectal cancer, this would certainly be very helpful to define in advance aggressive tumors that are resistant to chemotherapy treatments.

Acknowledgments

This work was supported by a post-doctoral fellowship (to A.R.) and grants (to O.C. and B.B.) from the Ligue Contre le Cancer (comité du Maine et Loire) and from Institut du Cancer (to O.C.).

REFERENCES

1. Bromberg J. Stat proteins and oncogenesis. *J Clin Invest.* 2002;109:1139-42.
2. Yu H, Jove R. The STATs of cancer--new molecular targets come of age. *Nat Rev Cancer.* 2004;4:97-105.
3. Levy DE, Lee CK. What does Stat3 do? *J Clin Invest.* 2002;109:1143-8.
4. Bromberg JF, Horvath CM, Besser D, Lathem WW, Darnell JEJ. Stat3 activation is required for cellular transformation by v-src. *Mol Cell Biol.* 1998;18:2553-8.
5. Bromberg J, Wrzeszczynska M, Devgan G, Zhao Y, Pestell R, Albanese C, et al. Stat3 as an oncogene. *Cell.* 1999;98:295-303.
6. Wen Z, Zhong Z, Darnell JE, Jr. Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell.* 1995;82:241-50.
7. Giraud S, Hurlstone A, Avril S, Coqueret O. Implication of BRG1 and cdk9 in the STAT3-mediated activation of the p21waf1 gene. *Oncogene.* 2004;23:7391-8.
8. Giraud S, Bienvenu F, Avril S, Gascan H, Heery DM, Coqueret O. Functional interaction of STAT3 transcription factor with the coactivator NcoA/SRC1a. *J Biol Chem.* 2002;277:8004-11.
9. Kiuchi N, Nakajima K, Ichiba M, Fukada T, Narimatsu M, Mizuno K, et al. STAT3 is required for the gp130-mediated full activation of the c-myc gene. *J Exp Med.* 1999;189:63-73.
10. Shirogane T, Fukada T, Muller JM, Shima DT, Hibi M, Hirano T. Synergistic roles for Pim-1 and c-Myc in STAT3-mediated cell cycle progression and antiapoptosis. *Immunity.* 1999;11:709-19.
11. Barré B, Avril S, Coqueret O. Opposite regulation of myc and p21waf1 transcription by STAT3 proteins. *J Biol Chem.* 2003;278:2990-6.
12. Barré B, Vigneron A, Coqueret O. The STAT3 transcription factor is a target for the Myc and retinoblastoma proteins on the Cdc25A promoter. *J Biol Chem.* 2005;280:15673-81.
13. Yang J, Chatterjee-Kishore M, Staugaitis SM, Nguyen H, Schlessinger K, Levy DE, et al. Novel roles of unphosphorylated STAT3 in oncogenesis and transcriptional regulation. *Cancer Res.* 2005;65:939-47.
14. Qin HR, Kim HJ, Kim JY, Hurt EM, Klarmann GJ, Kawasaki BT, et al. Activation of signal transducer and activator of transcription 3 through a phosphomimetic serine 727 promotes prostate tumorigenesis independent of tyrosine 705 phosphorylation. *Cancer Res.* 2008;68:7736-41.
15. Yang J, Liao X, Agarwal MK, Barnes L, Auron PE, Stark GR. Unphosphorylated STAT3 accumulates in response to IL-6 and activates transcription by binding to NFkappaB. *Genes Dev.* 2007;21:1396-408.
16. Shields BJ, Hauser C, Bukczynska PE, Court NW, Tiganis T. DNA replication stalling attenuates tyrosine kinase signaling to suppress S phase progression. *Cancer Cell.* 2008;14:166-79.
17. Courapied S, Sellier H, De Carne Trecesson S, Vigneron A, Bernard AC, Gamelin E, et al. The cdk5 kinase regulates the STAT3 transcription factor to prevent DNA damage Upon topoisomerase I inhibition. *J Biol Chem.* 2010;285:26765-78.
18. Vigneron A, Gamelin E, Coqueret O. The EGFR-STAT3 oncogenic pathway up-regulates the Emel endonuclease to reduce DNA damage after topoisomerase I inhibition. *Cancer Res.* 2008;68:815-25.
19. Bienvenu F, Barre B, Giraud S, Avril S, Coqueret O. Transcriptional Regulation by a DNA-associated Form of Cyclin D1. *Mol Biol Cell.* 2005;16:1850-8. Epub 2005 Jan 19.
20. Lundquist A, Barre B, Bienvenu F, Hermann J, Avril S, Coqueret O. Kaposi sarcoma-associated viral cyclin K overrides cell growth inhibition mediated by oncostatin M through STAT3 inhibition. *Blood.* 2003;101:4070-7.
21. Bienvenu F, Gascan H, Coqueret O. Cyclin D1 represses STAT3 activation through a Cdk4-independent mechanism. *J Biol Chem.* 2001;276:16840-7.
22. Barry SP, Townsend PA, Knight RA, Scarabelli TM, Latchman DS, Stephanou A. STAT3 modulates the DNA damage response pathway. *Int J Exp Pathol.* 2010;91:506-14.
23. Strebhardt K, Ullrich A. Targeting polo-like kinase 1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2006;6:321-30.
24. Seki A, Coppinger JA, Jang CY, Yates JR, Fang G. Bora and the kinase Aurora a cooperatively activate the kinase Plk1 and control mitotic entry. *Science.* 2008;320:1655-8.
25. Macurek L, Lindqvist A, Lim D, Lampson MA, Klompmaaker R, Freire R, et al. Polo-like kinase-1 is activated by aurora A to promote checkpoint recovery. *Nature.* 2008;455:119-23.
26. Shi X, Zhang H, Paddon H, Lee G, Cao X, Pelech S. Phosphorylation of STAT3 serine-727 by cyclin-dependent kinase 1 is critical for nocodazole-induced mitotic arrest. *Biochemistry.* 2006;45:5857-67.
27. Tao W, South VJ, Zhang Y, Davide JP, Farrell L, Kohl NE, et al. Induction of apoptosis by an inhibitor of the mitotic kinesin KSP requires both activation of the spindle assembly checkpoint and mitotic slippage. *Cancer Cell.* 2005;8:49-59.

28. Grivennikov S, Karin E, Terzic J, Mucida D, Yu GY, Vallabhapurapu S, et al. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell*. 2009;15:103-13.
29. Bollrath J, Phesse TJ, von Burstin VA, Putoczki T, Bennecke M, Bateman 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.
30. Yuan ZL, Guan YJ, Chatterjee D, Chin YE. Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue. *Science*. 2005;307:269-73.
31. Yang J, Huang J, Dasgupta M, Sears N, Miyagi M, Wang B, et al. Reversible methylation of promoter-bound STAT3 by histone-modifying enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:21499-504.
32. Barre B, Perkins ND. The Skp2 promoter integrates signaling through the NF-kappaB, p53, and Akt/GSK3beta pathways to regulate autophagy and apoptosis. *Mol Cell*. 2010;38:524-38.
33. Musteanu M, Blaas L, Mair M, Schleder M, Bilban M, Tauber S, et al. Stat3 is a negative regulator of intestinal tumor progression in Apc(Min) mice. *Gastroenterology*. 2010;138:1003-11 e1-5.

FIGURE LEGENDS

Figure 1 : STAT3 phosphorylation in colorectal cell lines and tumor samples

A. The indicated cell lines were either grown in 3% serum, or serum starved and then stimulated with IL6 (10 ng/ml) for 30 mn as indicated. Total cell extracts were prepared and serine 727 or tyrosine 705 phosphorylations were analyzed by Western blot using polyclonal antibodies directed against the phosphorylated forms of the protein. The membrane was reprobated with an antibody directed against STAT3 or hsc70 as loading controls (n=4).

B and C. Average percentages of cells with positive nuclear staining using the anti-p-STAT3 Tyr705 or anti-p-STAT3 Ser727 antibodies on primary tumor samples (n=102).

D. STAT3 phosphorylation according to the grade of dysplasia.

E. Representative images of STAT3 Ser727 phosphorylation on mitotic figures identified on tumor slides.

Figure 2 : STAT3 is phosphorylated on serine 727 during the G2 phase of the cell cycle

A. HT29 and HCT116 cells were treated with nocodazole or not for the indicated time. Following treatment, total cell extracts were prepared and cyclin B1 and STAT3-Ser727 phosphorylation were analyzed by Western blot using specific polyclonal antibodies. The membranes were reprobated with a hsc70 antibody (n=4). Cell synchronisation was confirmed by FACS analysis.

B. HT29 cells were synchronized at the G1/S transition by the double thymidine block, washed and then stimulated with 10% serum to allow progression towards the G2 phase as indicated by FACS analysis. Cyclin B1 and STAT3-Ser727 phosphorylation were analyzed as described above by western blot. The membranes were reprobated with a hsc70 antibody (n=4).

C. HCT116 cells were serum starved for two days in 0.1% serum and then stimulated with 10% serum to induce cell cycle progression as shown by FACS analysis. Cyclin B1 and STAT3-Ser727 phosphorylation were analyzed as described above (n=3).

D. STAT3 Ser727 phosphorylation was quantified by FACS analysis in nocodazole-treated HCT116 cells using polyclonal antibody directed against the serine 727 phosphorylated form of the transcription factor in parallel with propidium iodide staining to identify the different cell cycle phases (one experiment representative of three).

Figure 3 : STAT3 is phosphorylated on its Ser727 residue by the cdk1 kinase

A. Representation of the C-terminal fusion protein used in the kinase assay experiments.

B. The indicated kinases were immunoprecipitated from synchronized cells and incubated with his-STAT3D1-716 for 10 min at room temperature in the presence of cold ATP. The phosphorylation of STAT3 on its serine 727 residue was then analyzed by western-blot (n=3).

C. Growing cells were either transfected with cdk1-specific siRNA oligonucleotides or control oligonucleotides as indicated. Cdk1 expression and phosphorylation of STAT3 on its serine 727 residue were monitored after 48 h (n=3).

Figure 4 : STAT3 regulates the PLK1 gene during the G2 phase of the cell cycle

A. HCT116 cells were treated with nocodazole for 15hr, mRNA were extracted and the expression of the indicated genes was then analyzed by RT-quantitative PCR (n=4 +/- sd).

B. Growing cells were either transfected with STAT3-specific siRNA oligonucleotides or control oligonucleotides as indicated, treated with nocodazole for 15hr, and the expression of the PLK1 mRNA was then analyzed by RT-quantitative PCR (n=4 +/- sd, p<0.05).

C. Cells were treated as described above, total cell extracts were then separated on polyacrylamide gels and PLK1 and STAT3 expressions were then detected by Western blot using the indicated polyclonal antibodies (n=4).

D. Growing cells were either transfected with STAT3-specific siRNA oligonucleotides or control oligonucleotides as indicated, treated with nocodazole for 15hr, and the expression of the aurora-A and survivin mRNAs was then analysed by RT-quantitative PCR (n=4 +/- sd).

E. HCT116 cells were serum starved and restimulated by serum as described above to generate population of cells enriched in the G1, S and G2 phase of the cell cycle. Soluble chromatin was prepared from the indicated cells and immunoprecipitated with antibodies directed against STAT3. DNA was amplified using one pair of primers that covers the indicated binding site of STAT3 on the PLK1 promoter. ChIP assays were quantified by real-time PCR as compared to signals obtained with control Gal4 antibodies (lanes 1-3, n=3 +/- sd, p<0.01) or analyzed on agarose gel (lanes 4-6).

Figure 5 : Genome wide analysis of STAT3 target genes in S and G2 phase of the cell cycle

A and B. HCT116 cells were serum starved for two days in 0.1% serum and then stimulated with 10% serum to induce cell cycle progression as shown by FACS analysis. Chromatin isolated from S or G2-synchronized cells was then analyzed by ChIP-ChIP analysis using a genomic DNA microarray set containing the regions spanning from 3500 bp upstream to 750 bp downstream of transcription start sites of 20 500 human genes. Some genes were selected according to a previously described role in G2 and mitosis progression.
C and D. Soluble chromatin was prepared and immunoprecipitated with antibodies directed against STAT3. DNA was amplified using one pair of primers that covers the proximal promoter of the indicated genes. ChIP assays were analyzed on agarose gel or by quantitative PCR (n=3).

Figure 6 : STAT3 is involved in the progression of the G2 phase of the cell cycle

A. HCT116 cells were synchronised at the G1/S transition of the cell cycle, washed and then stimulated with 10% serum in the absence or presence of the indicated STAT3 inhibitors. FACS analysis was then used to analyze the progression of the G2 phase (n=3).

B. Growing cells were either transfected with STAT3-specific siRNA oligonucleotides or control oligonucleotides as indicated and then synchronized at the G1/S transition with hydroxyurea. Cells were then stimulated with 10% serum and FACS analysis was then used to analyse G2 phase progression (n=3). STAT3 inactivation was verified by western blot analysis (right part of the figure).

C. Cells were transfected with a vector expressing the constitutively active form of STAT3, STAT3-cys, or its mutated form on the Ser727 residue. Cells were then treated with nocodazole, fixed and DNA condensation was analysed using antibody directed against the phosphorylated form of histone H3 on serine 10. Abnormal chromosomal compactations were counted as indicated on the figures (n=4 +/- sd, p<0.001).

D. Growing HT29 or HCT116 cells were treated with nocodazole and/or static overnight as indicated on the figure. Cell death (subG1) and 8N DNA content were then analyzed by FACS analysis (n=3 +/- sd, p<0.001).

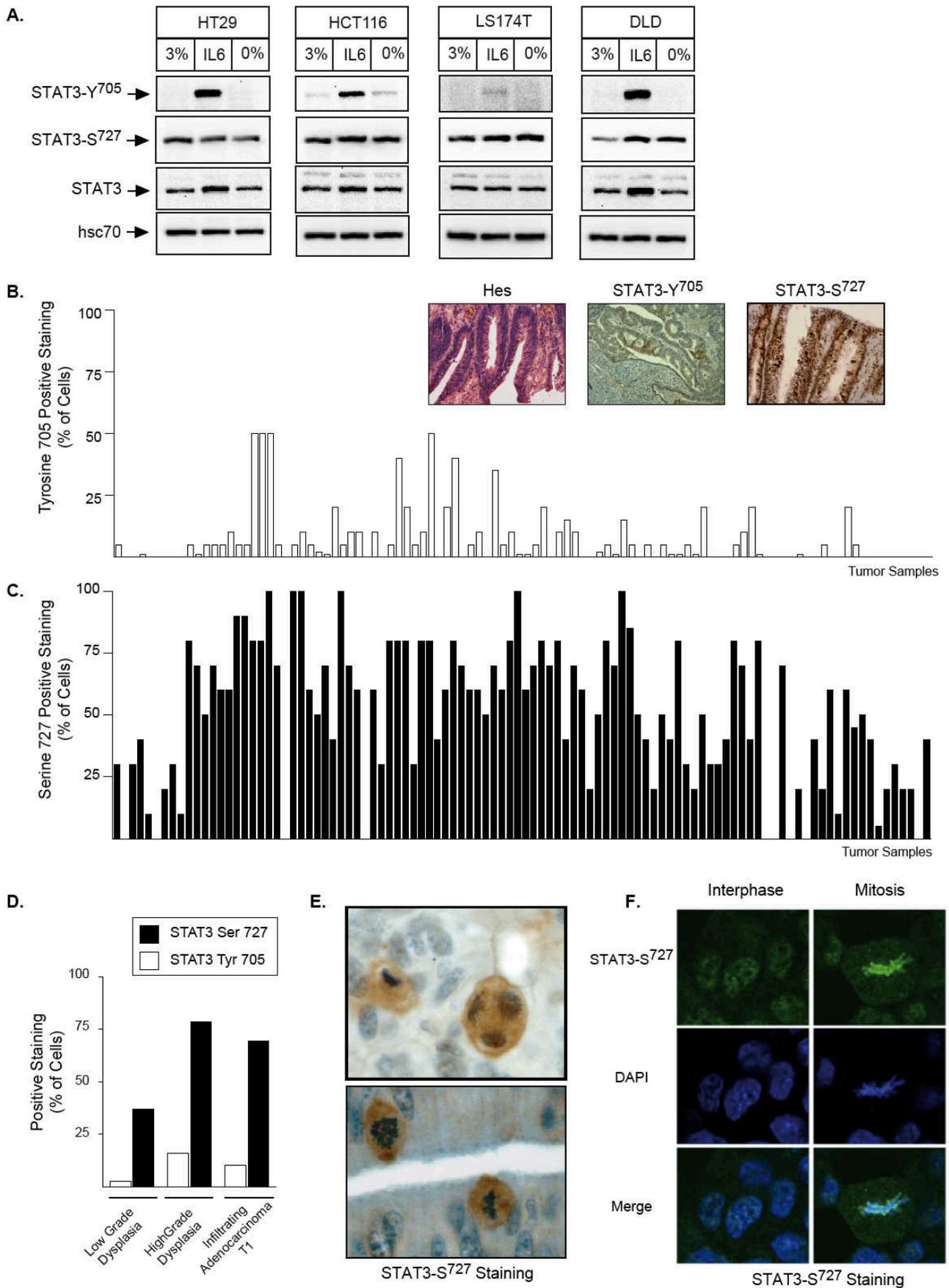


Figure 1

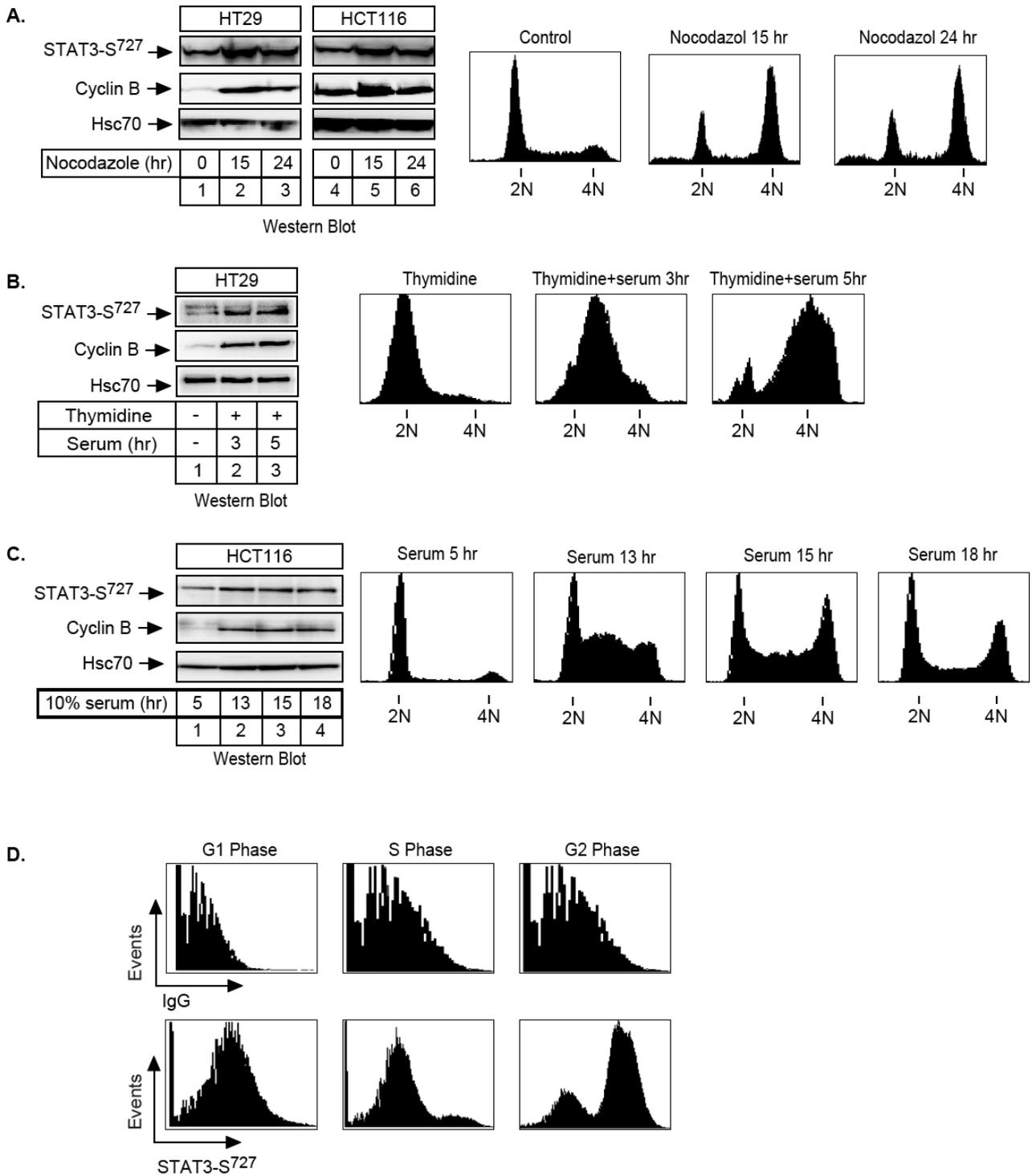


Figure 2

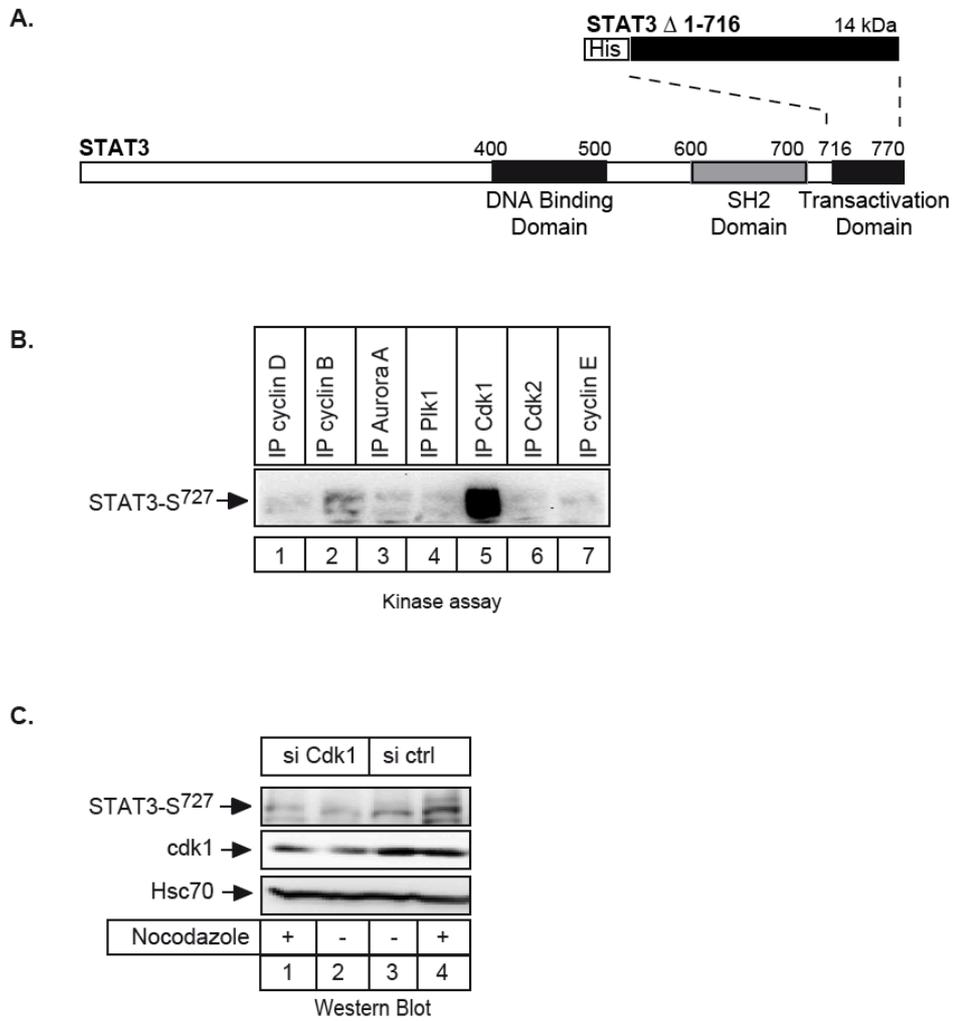


Figure 3

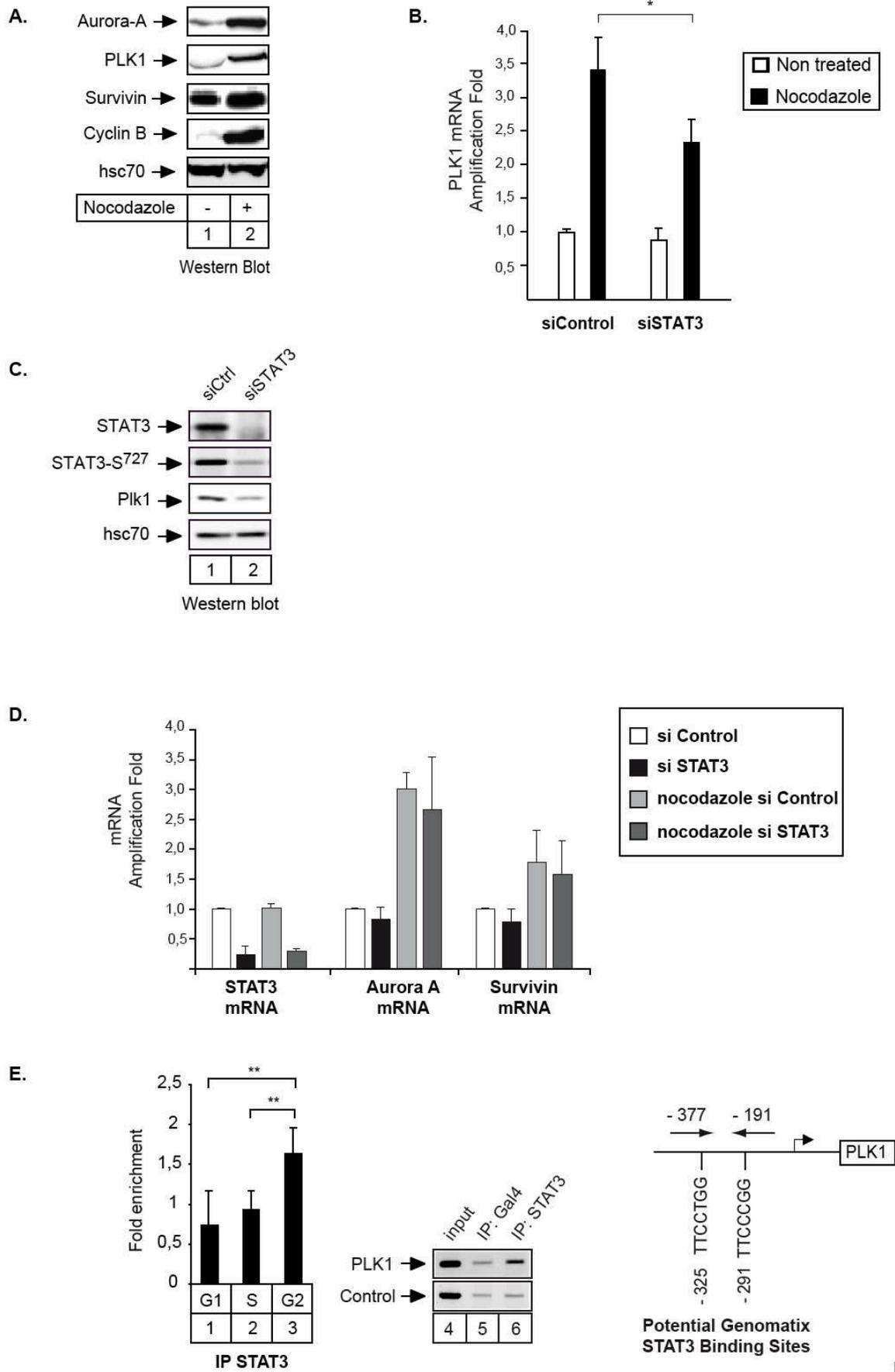
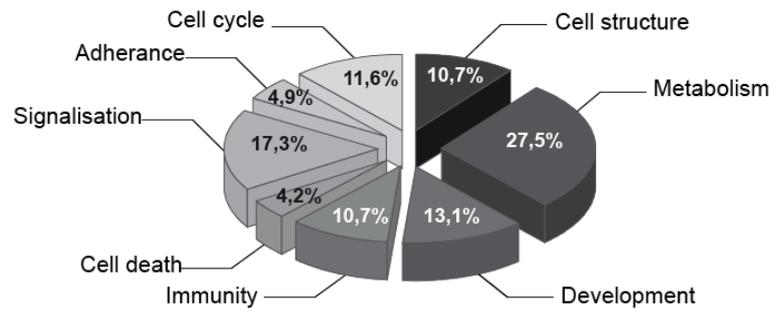
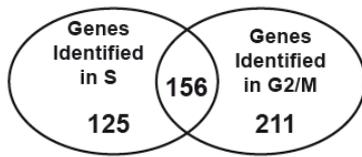


Figure 4

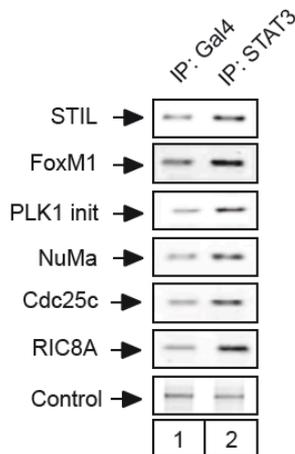
A.



B.

STIL	Castiel A. et al, J Cell Sci, 2011 Erez A. et al, Cancer Res, 2007	CCNF	Fung TK et al, JBC, 2002 D'Angiolella V et al, Nature, 2010
RIC8	Woodard GE et al, Mol Cell Biol, 2010	CDCA3	Molecular Cell, 2003 Smith A et al, Cell Cycle, 2007
BRD4	Dey A. et al, Mol Cell Biol, 2009 You J et al, Mol Cell Biol, 2009	MAD1L1	Chi YH et al, JBC, 2008
FoxM1	Major ML et al, Mol Cell Biol, 2004 Laoukili J et al, Nat Cell Biol, 2009	MAP4	Ookata K et al, Biochemistry, 1997 Chang W et al, J Cell Sci, 2001
MARS	Yang CP and Fan SS, Exp Cell Res, 2008 Li HH et al, J Biomed Sci, 2009	CDC25C	Wang R et al, Cell, 2007 Timofeev O et al, JBC, 2010
NOTCH1	Lee CW et al, Cancer Research, 2008	ERCC2	Chen J et al, Nature, 2003
MAPRE3	Ban R et al, J Biol Chem, 2009	NUMA	Radulescu AE et al, Trends Cell Biology, 2010 Dionne MA et al, Cell Motil Cytoskeleton, 1999
RECQL4	Petkovic M et al, J Cell Sci, 2005		

C.



D.

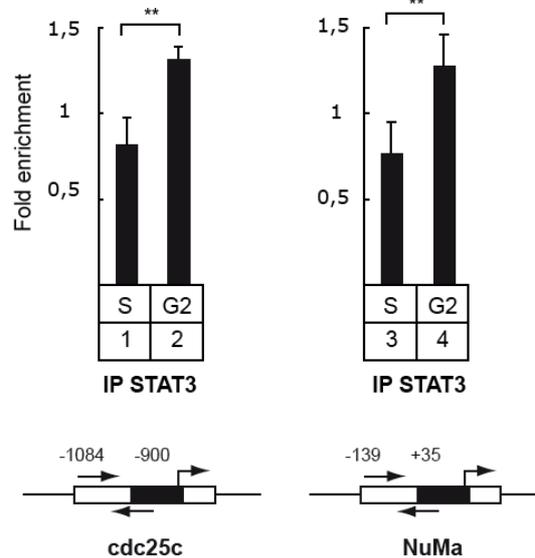


Figure 5

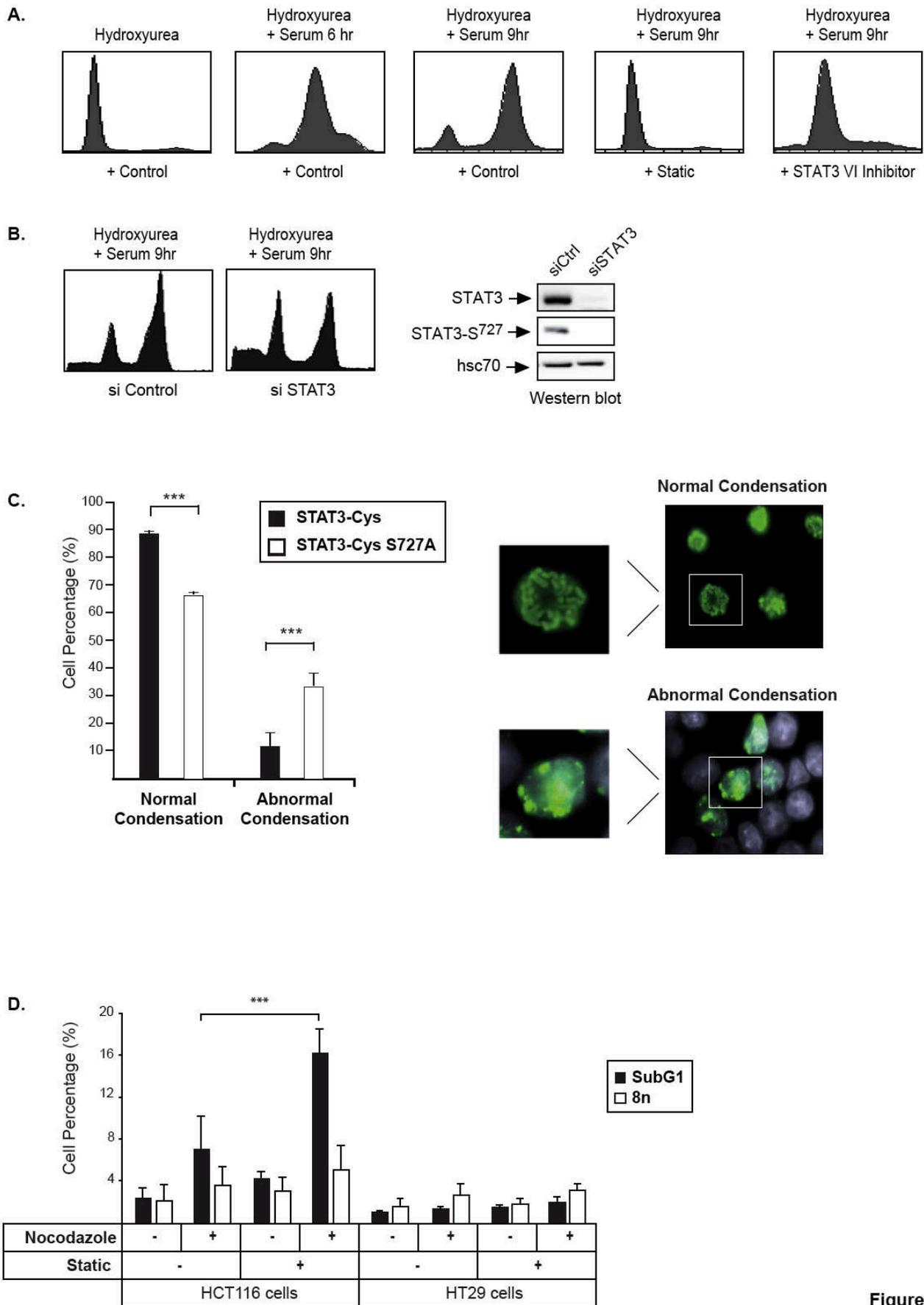


Figure 6

Chapitre 3

Le facteur de transcription STAT3 est principalement phosphorylé sur son résidu sérine 727 durant le stade précoce de dysplasie du cancer colorectal.

I. Introduction

Nous avons vu, au cours de ces chapitres, que STAT3 était phosphorylé sur son site sérine 727 en réponse à un traitement génotoxique. Cette activation lui permet d'activer la transcription de l'endonucléase de réparation, Eme1, et par conséquent d'induire une chimiorésistance. Cependant, nous avons également mis en évidence que STAT3 était également phosphorylé sur son résidu sérine 727 au cours du cycle cellulaire et plus particulièrement durant les phases G2 et mitose dans des lignées cellulaires colorectales. Nous avons montré que le facteur de transcription est impliqué dans la progression de la phase S vers la mitose en contrôlant l'expression des plusieurs gènes nécessaires à la mitose, tels que PLK1, STIL, NuMa, Cdc25c ...

L'ensemble de ces résultats ont donc montré que la tyrosine 705 n'est pas la seule responsable de l'activité transcriptionnelle de STAT3. Qin *et al* avaient également remarqué, dans le cancer de la prostate, que la phosphorylation de la sérine 727 était suffisante pour activer le facteur de transcription et conduire à la tumorigenèse en absence de la phosphorylation sur la tyrosine 705 (Qin *et al.* 2008).

Au cours de ma thèse, j'ai participé à l'étude des phosphorylations de STAT3 sur la tyrosine 705 et la sérine 727 à différents stades du cancer colorectal à partir de coupes de tumeurs de patients souffrants de cette maladie. Ces travaux ont été réalisés par Aude-Hélène Pavageau et Isabelle Valo, respectivement interne et Docteur en Anatomopathologie au Centre Paul Papin.

L'évolution du cancer colorectal du stade adénome vers le stade carcinome peut prendre plusieurs dizaines d'années. Le passage de la cellule normale à la cellule cancéreuse est le résultat d'une accumulation d'altérations génétiques conduisant à un phénotype particulier tel que la prolifération incontrôlée, l'envahissement des tissus adjacents et l'invasion des organes à distance (Hanahan and Weinberg 2011). Fearon et Vogelstein ont été les premiers à décrire un modèle de progression du cancer colorectal : ils ont montré que les mutations des gènes APC (Adenomatous polyposis coli), K-Ras et p53 contribuaient à l'évolution du cancer colorectal (Vogelstein *et al.* 1989). En effet, les mutations de APC sont détectées dès le stade adénome en dysplasie de bas grade, tandis que les mutations de K-Ras et de p53 sont présentes dès le stade adénome en dysplasie de haut grade. Depuis d'autres études ont confirmé leurs travaux et d'autres gènes, impliqués dans ce processus ont été découvert, comme STAT3 (Bromberg, Wrzeszczynska *et al.* 1999; Bromberg 2002).

Au niveau histologique, les adénomes correspondent à des lésions précancéreuses du cancer colorectal d'aspect polyploïde à la surface de la muqueuse colique et sont caractérisés par leur

morphologie tubuleuse ou villose et par leur grade de dysplasie. Le grade de dysplasie est classé en bas grade ou haut grade. Ces grades sont définis selon des critères morphologiques précis reflétant un niveau différent d'instabilité génétique (Scoazec 2007). Au cours de l'évolution de la tumeur, le stade adénome s'échelonne en trois étapes : adénome précoce, adénome intermédiaire et adénome tardif. Puis, à la suite de mutations de p53 et de TGF β , la tumeur atteint le stade carcinome avant de donner des métastases.

La phosphorylation de la tyrosine 705 de STAT3 a été décrite dans le cancer colorectal et a été associée à un mauvais pronostic et à l'invasion tumorale (Ma *et al.* 2004; Kusaba *et al.* 2005; Kusaba *et al.* 2006). Néanmoins, nous ne savons que peu de choses sur le rôle de la phosphorylation de la sérine 727 de STAT3 dans la tumorigenèse du cancer colorectal. Le but de cette étude a donc été d'évaluer la présence des deux formes phosphorylées de STAT3 aux différentes étapes adénomes-adénocarcinomes puis de corrélérer ces activations avec des caractéristiques histopronostiques.

II. STAT3 est principalement phosphorylé sur son résidu sérine 727 à un stade précoce du cancer colorectal

Dans un premier temps, nous avons étudié la phosphorylation de la tyrosine 705 et de la sérine 727 dans le tissu du colon. Nous avons observé que, dans la muqueuse péritumorale, la phosphorylation de la sérine 727 est détectée dans toutes les cellules de la crypte tandis que la phosphorylation de la tyrosine n'est pas détectée dans toutes les cellules de cette région. Etant donné que STAT3 peut être activé en réponse à des cytokines telles que IL-6 ou IL-10, cette activation péritumorale est certainement une conséquence de la libération de cytokines libérées par le microenvironnement de la cellule tumorale.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à l'activation du facteur de transcription lors de la progression du cancer colorectal, en comparant 15 adénomes de bas grades et 15 adénomes de haut grades. Nous avons mis en évidence que seules quelques cellules tumorales de bas grade présentent la forme phosphorylée de la tyrosine 705. Néanmoins, cette activation augmente significativement dans les tumeurs de haut grade de dysplasie. En ce qui concerne la phosphorylation de la sérine 727, les cellules tumorales de bas grades sont nettement plus marquées. De plus, lors de la transition vers la haut grade de dysplasie, toutes les cellules tumorales sont phosphorylées sur la sérine 727, avec une intensité de marquage plus importante.

Cette phosphorylation sur la sérine 727 est, par conséquent, significativement associée avec un haut grade de dysplasie et correspond à un site important d'activation de STAT3 durant les étapes précoces du cancer colorectal.

Ensuite nous avons voulu analyser les deux phosphorylation durant la transition adénomes-adénocarcinomes. Pour cela, nous avons étudié l'activation de STAT3 dans différents stades d'invasion tumorale notés de T1 à T4. Nous avons montré que les phosphorylations de la tyrosine 705 et de la sérine 727 sont détectées dans les stades, cependant le pourcentage de cellules exprimant la forme phosphorylée de la sérine est toujours plus élevé que la forme phosphorylée sur la tyrosine 705. Ces observations ont été corrélées avec les stades cliniques.

Ces résultats nous ont permis de mettre en évidence que STAT3 est phosphorylé sur son résidu 727 à des étapes précoces du cancer colorectal. De plus, le pourcentage de cellules présentant un marquage nucléaire de la forme phosphorylée de la sérine 727 reste stable dans les différents stades conduisant à la progression du cancer colorectal. Il est important de noter que nous avons toujours détecté une phosphorylation de STAT3 sur son résidu tyrosine 705 mais dans un moins grand nombre de cellules.

Pour confirmer ces effets, nous avons étudié les deux phosphorylations de STAT3 dans quatre lignées cellulaires colorectales différentes cultivées avec ou sans sérum puis stimulées avec l'IL-6. Comme nous l'avions attendu, STAT3 est phosphorylé sur la tyrosine 705 en réponse à l'IL-6, néanmoins, cette stimulation n'entraîne pas de variation de la forme phosphorylée de la sérine 727, qui est présente de manière constitutive.

Ces résultats indiquent donc que STAT3 est phosphorylé sur la sérine 727 dans ces lignées colorectales. Nous nous sommes alors demandés si cette forme phosphorylée du facteur de transcription est nécessaire pour la survie cellulaire. Nous avons utilisé un inhibiteur chimique de STAT3, Stattic, puis nous avons évalué la survie des cellules colorectales par test de clonogenicité. Nous avons observé que l'inactivation de STAT3 induit la mort cellulaire dans ces quatre lignées. Par conséquent, le facteur de transcription STAT3 joue un rôle essentiel dans la viabilité cellulaire lorsqu'il est essentiellement phosphorylé sur son résidu sérine 727.

En résumé, ce travail a montré que le site de phosphorylation de la sérine 727 est activé dès les stades précoces de dysplasie dans le cancer colorectal. Les cellules étaient également phosphorylées sur le résidu tyrosine 705 mais le pourcentage de cellules est moins important par rapport au nombre de cellules présentant la phosphorylation de la sérine 727.

Par conséquent, le site de la sérine 727 est un site de phosphorylation majeur dans la cancer colorectal. L'étude de l'activation de STAT3 ne peut donc pas être seulement cantonné à la détection de la phosphorylation de la tyrosine 705.

**THE STAT3 TRANSCRIPTION FACTOR IS MAINLY PHOSPHORYLATED
ON ITS SERINE 727 SITE
AT THE EARLY DYSPLASIA STAGE OF COLORECTAL CANCER**

AH Pavageau^{1,3}, I. Valo², H Sellier¹, AC Bernard¹, V Verrière², E Lavoine⁴, AL Poirier²,
JP Saint André³, MC Rousselet³, E. Gamelin¹, B. Barré¹, C. Guette¹ and O. Coqueret^{1*}

¹Paul Papin Cancer Center; INSERM U892; Angers, France

²Paul Papin Cancer Center Paul Papin; Angers, France

³Pathology Department, University Hospital; Angers, France

⁴Pathology Center, Angers, France

* Corresponding Author: Paul Papin Cancer Center, INSERM U892 2 rue Moll, 49033 ANGERS, France.
olivier.coqueret@univ-angers.fr Tel.: (33) 2 41 35 29 14

Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) is a transcription factor which has been initially characterized as a cytoplasmic protein that translocates into the nucleus to induce gene activation following stimulation. It is now well established that this effect relies on the phosphorylation of the transcription factor on its tyrosine 705 residue, followed by its dimerisation and DNA binding. However, this long standing view has been recently revised since non phosphorylated STAT proteins exist as dimers and have been shown to induce gene activation. This has led to the important hypothesis that different phosphorylated forms of STAT3 might have different target genes and consequently different functions. Besides its tyrosine phosphorylation, STAT3 is also phosphorylated on its serine 727 residue in the C-terminal domain. In this study, we have characterized by immunohistochemistry these two phosphorylations at the successive stages of colorectal cancer. Results indicate that the Ser 727 site is a major phosphorylation site which is activated as the early dysplasia stage of the disease. Although cancer cells were also phosphorylated on Tyr 705, the percentage of cells phosphorylated on the serine residue was significantly higher. This result was confirmed in several colorectal cell lines where STAT3 was found to be phosphorylated on its serine residue using total cell extract. As expected, chromatin immunoprecipitation experiments indicated that the transcription factor was present on the promoter of the *myc* and *cyclin D1* genes and that its inactivation led to cell death. Altogether, these results indicate that the Ser 727 site is a major phosphorylation site in colorectal cancer and confirm in this disease that STAT3 activation should not be monitored only through the detection of Tyr705 phosphorylation.

Colorectal cancer is initiated by the transformation of normal epithelia into tumor cells during the adenoma-carcinoma sequence. Most of the time, this initial event relies on the mutation of the APC tumor suppressor gene that leads to the constitutive activation of beta-catenin and the abnormal expression of cell cycle genes such as *Myc* or *cyclin D*. Subsequent colorectal tumor progression is driven by additional dysregulations of mitogenic and survival pathways and it has been shown for instance that *Ras* mutations are necessary to induce the nuclear translocation of beta-catenin. In addition, it is also well known that all oncogenic pathways that drive abnormal cell proliferation induce intracellular sensors that normally activate apoptosis or senescence. As a consequence, the *INK4-Rb* and *p53-p21* pathways are also inactivated during the successive steps of colorectal cancer progression. Mutations of mitotic checkpoint genes such as *BUB1* have also been reported, probably to prevent a correct activation of the spindle checkpoint in response to replicative stress. This allows the escape to mitotic catastrophe, a suppressive response induced in response to abnormal DNA content. This results in the emergence of chromosomal instability (CIN) and the appearance of an abnormal chromosome number (aneuploidy).

Besides the APC- beta-catenin pathway, other proteins also participate to colorectal cancer progression. Among these, the STAT3 transcription factor is well known to play an important role in tumor cells (1-3). In contrast to normal conditions, STAT3 is constitutively phosphorylated in several cancers as a consequence of the dysregulation of oncogenic kinases. In colorectal cancer, we and others have demonstrated that the *src* kinase plays an important role in the abnormal activation of STAT3 (4-8). In addition, the endogenous production of growth factors and cytokines such as

amphiregulin, IL-6 or IL-10 by the microenvironment or the tumor itself also participates to the oncogenic upregulation of STAT3 in intestinal cells (9). Extending several *in vitro* studies, important results have recently demonstrated *in vivo* in mice that this transcription factor is necessary for tumor progression and growth (9,10). At the molecular level, it is now well established that STAT3 favors cell transformation through the abnormal expression of cell cycle, survival and DNA repair genes and through the inactivation of tumor suppressor pathways (4,5,11-15).

STAT3 is well known to be phosphorylated on two residues, the tyrosine 705 (Tyr705) and Serine 727 sites (Ser727). The Tyr705 phosphorylation was initially described as necessary for dimer formation, nuclear translocation and DNA binding. Accordingly, numerous studies have reported that cell cycle progression relies on the STAT3-mediated activation of *myc* and *cdc25A* following tyrosine phosphorylation of the transcription factor. When first identified, the Ser727 site has been proposed to play an important role in transcriptional activation, probably to allow the interaction with transcriptional activators such as CBP or NcoA. However, this long standing view is probably not complete since several studies have reported that STAT proteins can be active in the absence of one or both phosphorylations. Recent results have reported in *Drosophila* that unphosphorylated STATs play an essential role in heterochromatin stability (16,17). Several studies have also recently shown that STAT3 can induce gene activation when only phosphorylated on its Ser 727 residue. In prostate cancer and B-cell chronic lymphocytic leukemia, STAT3 allows tumor growth when phosphorylated on its serine residue and not on its tyrosine site (18,19). It has been proposed that the transcription factor associates with NF- κ B when only phosphorylated on Ser727 to induce gene expression (20-22). Finally, we have recently shown that STAT3 is only activated on this residue following topoisomerase I inhibition and DNA damage and that this might play an important role in the response to chemotherapy (23). Altogether, these observations indicate that the tyrosine 705 phosphorylation site should not be considered anymore as the only STAT3 activation site and that the Ser727 residue probably also plays an important role during cell transformation.

The constitutive activation of STAT3 on its Tyr705 site has been previously described in colorectal cancer and has been associated with metastatic and wrong prognosis (24-27). However, the importance and kinetic of activation of the Ser727 phosphorylation site remains largely to be characterized in colorectal cancer. The aim of this study was therefore to evaluate the presence of the

two phosphorylated forms of STAT3 at the different stages of the adenoma-adenocarcinoma continuum and correlate their activation with morphology or histopronostics characteristics.

MATERIALS AND METHODS

Cases and tissues

One hundred and two patients with adenoma or colorectal adenocarcinoma were studied by immunohistochemistry. There were 30 adenomas with 15 low-grade adenoma and 15 high-grade adenoma: the dysplasia was graded according to the established criteria of architectural features and cytological atypia. There were 72 colorectal carcinomas. 55,9% were men and 44,1% were women. The median age was 73. 87,13% of the tumor were situated in the colon, 6,93% in the rectum and 5,94% in the rectosigmoid hinge. All tumours were obtained from the Department of Pathology at Paul Papin Center and at University Hospital of Angers, and from the Center of Pathology of Angers, between 2000 and 2005. The following tumor samples were excluded: young patients (under 40 years old), tumour with a positive test for microsatellite instability, treated tumour. Transversal sections were selected to look at the different expression between the superficialities or the depth of the tumour.

Each histological type was noted according to the World Health Organisation classification as follows: well differentiated, moderately differentiated, poorly differentiated adenocarcinoma and mucinous adenocarcinoma. According to the 7th TNM staging system of the American Joint Committee on Cancer (24), the depth of tumour invasion of the adenocarcinomas was classified as follows: Tis, carcinoma *in situ* or limited to mucosa; T1, tumor invading the submucosa; T2, tumor invading the muscularis propria; T3, tumor invading either the subserosa or pericolic tissue; and T4, tumor invading contiguous organs and/or perforating visceral peritoneum. The status of regional lymph node metastasis was therefore stratified as follows: N0, absence of regional lymph node metastasis; N1, one to three regional lymph node metastasis; N2, four or more regional lymph node metastasis. The presence of distant metastasis was noted as follows: M0, absence of distant metastasis; M1, presence of distant metastasis. The stage was reported as follows: stage 0 (TisN0), I (T1-2N0), II (T3N0 and T4N0), III (AnyT, N1-2), IV (AnyT, anyN, M1). Lymphatic and venous invasion were also studied on routine.

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was carried out on 4 μ m thick paraffin embedded sections of formalin-fixed

tumor samples using an antibody directed against the phosphorylated forms of STAT3. Two antibodies were used: anti-p-STAT3 Tyr705 (clone B7 SC-8059 Santa Cruz BioTechnologies, diluted 1/25) and anti-p-STAT3 Ser727 (clone SC-8001-R Santa Cruz BioTechnologies, diluted 1/25). The immunolabelling technique was performed by a Benchmark® automatised tissue staining system (Roche-Ventana).

The immunohistochemistry was evaluated semi-quantitatively by the percentage of staining cells, the type of staining (nuclear or cytoplasmic), and the intensity (with three groups: low, moderate, high). To exclude subjectivity, all slides were evaluated by two pathologists who had no knowledge of the identities of the patients or their clinical status. In discrepant cases, the two pathologists reviewed the slides together and reached a consensus. Note that some samples have been fixed in formol or bouin but that this did not affect STAT3 staining. By contrast, staining artefact were noticed due to fixation in paraffin and this has been taken into consideration to exclude non-specific staining.

Clinicopathological characteristics in colorectal adenomas

The size range from 0,5cm to 3cm with a mean tumor size of 1,32 cm and 1,40 cm for respectively low-grade adenoma and high-grade adenoma. The mean age was 67 years-old for the low-grade adenoma and 74 years-old for the high grade adenoma. There were 23 men and 7 women. The location is especially colic (in 78,6% low grade adenoma and 86,6% high grade adenoma), then at the upper rectum (in 7,1% low grade adenoma and 6,7% high grade adenoma) and at the rectosigmoid hinge (14,3% low grade and 6,7% high grade adenoma). With regard with morphotype, 15 were classified as low-grade adenoma and 15 as high-grade dysplasia. The clinicopathological characteristics were all comparable between low-grade and high-grade adenoma.

Clinicopathological characteristics in colorectal adenocarcinoma

There were 34 men and 38 women, with a mean age of 73 years old (average 70,3 years old). Histologically, there were 12 intramucosal carcinomas and 60 invasive carcinomas which characteristics are described Figure 4. All 12 cases of intramucosal carcinoma (Tis) were well differentiated adenocarcinomas. Of the 60 invasive carcinomas, 27 were well differentiated adenocarcinomas, 25 were moderately differentiated adenocarcinomas, 4 were poorly differentiated adenocarcinomas, and 4 were mucinous carcinomas. Among the invasive carcinomas, there were 14 classified as T1, 16 classified T2, 15 classified T3, and 15 carcinomas

classified T4. 19 patients had lymphatic or vascular invasion, 27 patients had lymph node metastasis and 10 had distant metastasis. So, 26 patients were stratified stage I (43,3%), 7 stage II (11,7%), 18 stage III (30%) and 9 stage IV (15%)

Statistical analysis

Analyses comparing the expression of p-STAT3 were performed with the Chi-2 test for independence and the Wilcoxon or Kruskal Wallis test.

Cell lines

The human colorectal cell lines were obtained from ATCC (Manassas, VA20108, USA) and cultured in RPMI 1640 medium (Lonza Walkersville, USA). Cell lines were supplemented with 10% fetal bovine serum (PAA laboratories GmbH, Austria).

Colony formation assay

For colony formation assays, 1000 cells were plated per well in 6-well plates, treated with sn38 the next day and allowed to form colonies. After 10-14 days cells were washed twice with PBS and treated with crystal violet for 10 min at room temperature, and then washed 5 times with water. The percentage of colony forming cells was calculated as compared to non-treated cells.

Immunoprecipitation and western blot analysis

After two washings with cold PBS, cells were lysed in 100µl (Western Blot) using ice-cold lysis buffer (25mM HEPES, pH 7.9, 300 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 10% glycerol, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 2µg/ml leupeptin, 5 µg/ml aprotinin, 1µg/ml pepstatinA, 0.5M NaF, 100mM Na₃VO₄). After a 30 min incubation at 4°C, total extracts were clarified by centrifugation at 12000rpm for 10 min. Total cell extracts were analyzed by western blot using the same antibodies as previously described. Briefly membranes (Millipore corporation MA, 01821, USA) were blocked for 45 min at room temperature in Tris-buffered saline buffer, 5% BSA, 0.05% tween. Membranes were then incubated overnight with the indicated antibodies diluted in Tris-buffered saline buffer, 1% BSA, 0.05% tween at 4°C. After three washings, blots were incubated with the appropriate HRP-conjugated secondary antibody for 45 min. Proteins were detected using an enhanced chemiluminescence system (ECL, Biorad, CA 94547, USA).

Chromatin Immunoprecipitation Assays

ChIP experiments were performed as previously described (21-23) Briefly, HT29 cells were fixed with 1% formaldehyde. After 10 min, cells were washed with ice-cold Tris-buffered saline and lysed with 500 µl of ChIP buffer (50 mM Tris-HCl pH 8,1; 1% SDS ; 10 mM EDTA; 1 mM PMSF; 10 µg/

ml aprotinine; 10 µg/ml leupeptine; 10 µg/ml pepstatine; 1 mM Na₃V04; 50 mM NaF). Chromatin was sheared by sonication to an average size of 500 bp. The chromatin solution was diluted with 1 volume of dilution buffer (2 mM EDTA; 20 mM Tris-HCl pH 8,1; 1% Triton X100; 0,1% NP40; 150 mM NaCl; 1 mM PMSF; 10 µg/ml aprotinine; 10 µg/ml leupeptine; 10µg/ml pepstatine; 1 mM Na₃V04; 50 mM NaF) and incubated 1 hr at 4°C on a rotating platform with a mix of protein A-agarose and protein G-sepharose which pretreated with sheared DNA salmon sperm. Chromatin was then incubated overnight at 4°C on a rotating platform with 1 µg of the anti-STAT3 or anti-GAL4 antibodies. Following precipitation with A-agarose and protein G-sepharose (pretreated with sheared DNA salmon sperm), chromatin was eluted with elution buffer (1% SDS ; 100 mM NaHCO₃) for 5 hr at 65°C. DNA was extracted with phenol-chloroform, precipitated with ethanol, allowed to air dry, and then dissolved in 100 µl of sterile H₂O. Four µl of the DNA samples were then subjected to PCR amplification

RESULTS

Phosphorylation of STAT3 in normal and tumoral colorectal tissues

To characterise STAT3 phosphorylation on its Tyr 705 and Ser 727 sites in colorectal cancer, we first examined its nuclear phosphorylation in normal tissues since the transcription factor is well known to translocate into the nucleus upon activation. Moderate phosphorylation of the Tyr 705 and Ser 727 sites was observed in autonomous neural plexus cells, in muscular and endothelial cells, in lymphocytes, and in a few fibroblasts in the different layers of the normal colon tissue. These staining were used as internal positive controls in the following experiments (Figure 1A). Normal colon mucosa showed a weak STAT3 nuclear staining at the basis of colon crypts and staining was lost in the apical parts of the crypts where cells differentiate. This observation was made with the two antibodies, directed against the Tyr 705 or Ser 727 phosphorylated forms of the transcription factor (Figure 1B and 1C). Interestingly, in the peritumoral mucosa, the Ser 727 phosphorylation was detected on all cells of the crypt epithelium whereas the tyrosine modification was not detected on all parts of the crypt. In addition, we noticed a general increase in Ser 727 and Tyr 705 phosphorylations in inflammatory zones (data not shown). Since the transcription factor is well known to be activated by cytokines such as IL6 or IL10, this peritumoral activation is certainly a consequence of cytokine release by the microenvironment or by tumor cells.

Differential STAT3 Phosphorylations on Tyr705 and Ser727 in low and high-grade colorectal dysplasia

Although APC and beta-catenin dysregulations are well known to represent key oncogenic events in the initiation of colorectal cancer, the timing of STAT3 Ser 727 activation remains to be fully characterized during the early transformation events. To determine at which step STAT3 is activated during colorectal cancer progression, p-STAT3 Tyr705 and Ser727 staining were compared between low and high grade dysplasia samples. 30 samples were obtained, 15 classified as low-grade adenoma and 15 as high-grade dysplasia. Since we have recently shown that STAT3 is phosphorylated in response to genotoxic treatments, it is important to note that these samples were obtained from tumors that had not received prior chemotherapy. Results presented Figure 2 indicated that only a few tumor cells express a tyrosine-phosphorylated form of STAT3 in low-grade adenoma and that this percentage was significantly increased to around 21 % in high-grade adenoma (Figure 2C, $p < 0,0003$). In addition, we also observed that the intensity increased from a low to a moderate staining (Figure 2C, right part, $p = 0,000006$). Interestingly, when these experiments have been repeated using an antibody directed against the serine-phosphorylated form of the transcription factor, results indicated that a higher percentage of tumor cells express p-STAT3 Ser 727 at the early stage of colorectal cancer (Figure 3A and 3B, $p = 0,0005$). In low grade adenoma, around 36% of cells were scored as positive as compared to 3% for Tyr 705. During the transition from low grade to high grade adenoma, around 84% of cells express a serine-phosphorylated form of STAT3 as compared to 21% for the Tyr705 site. Importantly, this increase was also associated with a significant upregulation of the Ser 727 staining intensity which was classified as high in all tumor cells at the high grade adenoma (Figure 3C, right part). This Ser727 phosphorylation was significantly associated with high-grade adenoma, either when the staining intensity was considered ($p = 0,0005$) or when the percentage of positive cells was scored ($p = 0,0005$).

Altogether, we concluded from these results that although a significant number of adenoma cells express the Tyr-705 phosphorylated form of STAT3, the Ser727 residue is a major site of activation significantly activated at the early step of colorectal cancer. These staining results are summarized Table I.

Different expression of p-STAT3 Tyr705 and p-STAT3 Ser727 in colorectal adenocarcinoma and correlation with the histopronostics parameters

We then analyzed if the two different STAT3 phosphorylations were modified during the adenoma to adenocarcinoma transition (see patients

and samples characteristics Table II). Nuclear phosphorylation was detected in almost all carcinomas and in many cases, the invasive front was generally less intensely stained than the superficial and central parts. Figure 4 A-C shows a representative example of strong immunohistochemical Tyr705 or Ser727 staining in an invasive T2 and T3 (left) grade carcinoma. Results presented Figure 4D and E showed that Tyr705 and Ser727 phosphorylations were detected in all carcinoma stages. Importantly, the percentage of cells expressing the serine-phosphorylated form of the transcription factor was always higher as compared to the tyrosine-phosphorylated form. Tyr705 and Ser727 phosphorylations were detected respectively with an average percentage of staining of 17% (+/-8,1) and 60% (+/-25,2) cells in Tis tumours; 10,7% (+/-11,06) and 57,9 (+/-30) cells in T1 tumours; 8,5% (+/-6,7) and 65,6(+/-19,7) cells in T2 tumours; 3,06% (+/-5,9) and 73,3% (+/-21,9) cells in T3 tumours; 1,7% (+/-5,2) and 65,3% (+/-22) cells in T4 tumours. These differences were also observed when STAT3 phosphorylation was correlated to the clinical stages (Figure 4E). In these successive steps of tumor progression, the average percentage of cells with a Ser 727 nuclear staining appeared to be stable and remained always higher than the Tyr705 staining.

Altogether, we concluded from these results that the STAT3 transcription factor is phosphorylated at the early stages of colorectal cancer at that its phosphorylation status remains constant during the successive step of tumor progression.

STAT is phosphorylated on its STAT3 Ser727 residue in growing colorectal cell lines

During the course of these experiments, we have also analyzed the Ser727 and Tyr705 phosphorylation status in growing colorectal cell lines. Interestingly, we also noticed that the Ser727 site was the main phosphorylation site in colorectal cell lines (Figure 5A). This effect was observed in different cell lines, indicating that this observation is probably general. A very weak phosphorylation on the Tyr705 site was also detected (note that we had to increase 10 times the cell extract concentration to get a more significant signal). This observation was made using either a classical total cell extract or following compartmentation, using either a cytoplasmic or nuclear extract (data not shown). As a control, cells were serum starved for one day and then stimulated with IL6 for 30 mn. As expected, a significant increase in the phosphorylation of the tyrosine was observed (Figure 5A, middle panel). Note however that we did not detect a significant effect on the Ser727 site. Several studies have reported that the inactivation of STAT3 in cancer cell lines leads to cell cycle arrest and cell death, certainly as a

consequence of oncogene addiction. Most of the time, this effect has been linked to the inactivation of the Tyr705 phosphorylation and the consequent downregulation of cell cycle and cell death genes. As expected, we also noticed using chromatin immunoprecipitation experiments that STAT3 was associated with the proximal promoter of the Myc and cyclin D1 genes in growing HT29 cells (Figure 5B). Since our results indicate that STAT3 is essentially phosphorylated on its Ser727 site in colorectal cell lines, we then asked if this phosphorylated-form of the transcription factor was necessary for cell survival in this experimental model. To this end, four different colorectal cell lines were treated with a well-known inhibitor of STAT3, Static, and cell survival was evaluated using clonogenic assays after 10 days to take into account all forms of cell death (note that this long term assay precludes the use of RNA interference). Interestingly, we noticed that the inactivation of STAT3 induced cell death in the five different cell lines (Figure 5B), indicating that the transcription factor plays also an essential role in cell viability when essentially phosphorylated on its Ser727 site.

DISCUSSION

In this study, we have characterized STAT3 phosphorylation in the successive stages of colorectal cancer. Although we could detect the classical phosphorylation on Tyr705, our results indicate that the Ser727 site is a major phosphorylation site in colorectal cancer. In addition, we also observed that this activation occurs at the very early stage of the disease, probably in parallel to the initial deregulation of the APC/ β -catenin pathway. Results performed in cell line models confirm this observation since the Tyr705 phosphorylation was barely detected using classical extraction procedures whereas it was significantly induced following IL6 stimulation. By contrast, the Ser727 phosphorylation appeared to be constitutively active. Interestingly, STAT3 inactivation led as previously reported to cell death, confirming that this oncogene plays an essential role in colorectal cancer lines, even if it is essentially phosphorylated on its Ser727 residue.

Several studies have already reported the constitutive phosphorylation of the transcription factor in cell lines or tumor samples and documented its importance in cell viability. However, most of the time, these activation studies investigated STAT3 activation by measuring its phosphorylation on its Tyr705 site. This site is expected to play an important role in tumor cells as it is targeted by essential oncogenic kinases such as the JAK and src kinases. In this case, it is well known that STAT3 dimerizes and translocate into the nucleus to activate cell cycle and cell survival

genes. However, STAT3 can also play an essential role in tumor cells when phosphorylated only on its Ser727 site. In ras-expressing cells, STAT3 was found associated with the mitochondria without nuclear translocation. Through the regulation of oxidative phosphorylation, the transcription factor was reported to play an essential role to mediate ras-transformation. Interestingly, in the same experimental conditions, these authors showed that STAT3 translocated to the nucleus to activate its target genes when phosphorylated on Tyr705 by the src kinase. This leads to the important conclusion that the phosphorylation status of STAT3 might be specific of a given oncogenic pathway and that this event might dictate its localization and as a consequence its function. Note that the src and ras oncogenes are well known to play an important role in colorectal cancer and that around 35% of tumors present a Ras mutation. It is therefore tempting to speculate that the phosphorylation of STAT3 in colorectal cancer might depend on the presence of these two oncogenes. Since our immunohistochemistry experiments were focused on the nuclear presence of STAT3, it remains to be determined if the transcription factor can be detected on the mitochondria on colorectal tumor samples.

Recent important results have also reported that STAT3 can associate with the NFkB transcription factor when phosphorylated only on its Ser727 site. In this case, it appears that the STAT3-NFkB complex activates the expression of genes such as Met which are not classical targets of the STAT3 protein. As stated above, this further indicates that the role and function of STAT3 depends on the regulation of its phosphorylation which certainly dictates its association with specific partners. In each case, the STAT3 transcriptome is probably different and this might explain why some of its target genes can be easily detected in certain cell lines and not in others. Interestingly, using animal models, both STAT3 and NFkB have been reported to play an important role in the initiation of colorectal cancer, controlling both proliferation, cell death and the release of pro-inflammatory cytokines necessary for tumor progression. This suggests that these two transcription factors certainly associate in human colorectal tumors to induce the expression of specific genes that remain to be determined. If so, it will be important to determine if the two transcription factors are activated at the same time, ie, at the dysplasia stage or if NFkB activation occurs later to collaborate with STAT3 and induce tumor progression. Interestingly, both proteins can be activated by the inflammatory cytokines which are produced by tumor cells or by the microenvironment, suggesting that this pathway might play an important role in the maintenance of an autocrine loop of inflammatory signaling.

It is widely accepted that colorectal cancer is a heterogeneous disease that results from multiple genetic mutations so that similar apparent diseases can have very different outcomes. Molecular clustering is an essential goal of cancer research to identify disease subtypes having good or bad prognosis. Although our results indicate that the high percentage of tumor cells are phosphorylated on its Ser727 residue, we have always detected a phosphorylation of STAT3 on its tyrosine site. This opens the possibility that different tumor cells might exist with either unphosphorylated STAT3 and mono-phosphorylated or bi-phosphorylated forms of the transcription factor. Most of the time the presence and the function of these potential different forms of the transcription factor on DNA have been poorly characterized. For instance, we have recently shown that STAT3 can be detected on DNA repair promoter when phosphorylated on its Ser727 site but not on its Tyr705 site. This leads to the hypothesis that the different phosphorylated forms of STAT3 might correlate with different prognosis. If this is true, the status of STAT3 phosphorylation might be useful to identify disease subtypes and predict tumor escape.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Ligue Contre le Cancer (comité du maine et loire), Institut du Cancer and by a fellowship from the Ministère de la Recherche (to H.S).

REFERENCES

1. Bromberg, J., Wrzeszczynska, M., Devgan, G., Zhao, Y., Pestell, R., Albanese, C., and Darnell, J. (1999) *Cell* **98**, 295-303
2. Bromberg, J. (2002) *J Clin Invest* **109**, 1139-1142.
3. Barre, B., Vigneron, A., Perkins, N., Roninson, I. B., Gamelin, E., and Coqueret, O. (2007) *Trends Mol Med* **13**, 4-11
4. Vigneron, A., Roninson, I. B., Gamelin, E., and Coqueret, O. (2005) *Cancer Res* **65**, 8927-8935.
5. Vigneron, A., Gamelin, E., and Coqueret, O. (2008) *Cancer Res* **68**, 815-825
6. Mao, W., Irby, R., Coppola, D., Fu, L., Wloch, M., Turner, J., Yu, H., Garcia, R., Jove, R., and Yeatman, T. J. (1997) *Oncogene* **15**, 3083-3090.
7. Yeatman, T. J. (2004) *Nat Rev Cancer* **4**, 470-480.
8. Bromberg, J. F., Horvath, C. M., Besser, D., Lathem, W. W., and Darnell, J. E. J. (1998) *Mol Cell Biol* **18**, 2553-2558
9. Grivnenikov, S., Karin, E., Terzic, J., Mucida, D., Yu, G. Y., Vallabhapurapu, S., Scheller, J., Rose-John, S., Cheroutre, H., Eckmann, L., and Karin, M. (2009) *Cancer Cell* **15**, 103-113
10. Bollrath, J., Phesse, T. J., von Burstin, V. A., Putoczki, T., Bennecke, M., Bateman, T., Nebelsiek, T., Lundgren-May, T., Canli, O., Schwitalla, S., Matthews, V., Schmid, R. M., Kirchner, T., Arkan, M. C., Ernst, M., and Greten, F. R. (2009) *Cancer Cell* **15**, 91-102
11. Barré, B., Vigneron, A., and Coqueret, O. (2005) *J Biol Chem* **280**, 15673-15681
12. Bowman, T., Broome, M. A., Sinibaldi, D., Wharton, W., Pledger, W. J., Sedivy, J. M., Irby, R., Yeatman, T., Courtneidge, S. A., and Jove, R. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 7319-7324.
13. Kiuchi, N., Nakajima, K., Ichiba, M., Fukada, T., Narimatsu, M., Mizuno, K., Hibi, M., and Hirano, T. (1999) *J Exp Med* **189**, 63-73
14. Diaz, N., Minton, S., Cox, C., Bowman, T., Gritsko, T., Garcia, R., Eweis, I., Wloch, M., Livingston, S., Seijo, E., Cantor, A., Lee, J. H., Beam, C. A., Sullivan, D., Jove, R., and Muro-Cacho, C. A. (2006) *Clin Cancer Res* **12**, 20-28
15. Gritsko, T., Williams, A., Turkson, J., Kaneko, S., Bowman, T., Huang, M., Nam, S., Eweis, I., Diaz, N., Sullivan, D., Yoder, S., Enkemann, S., Eschrich, S., Lee, J. H., Beam, C. A., Cheng, J., Minton, S., Muro-Cacho, C. A., and Jove, R. (2006) *Clin Cancer Res* **12**, 11-19
16. Yan, S. J., Lim, S. J., Shi, S., Dutta, P., and Li, W. X. (2011) *Faseb J* **25**, 232-241
17. Shi, S., Larson, K., Guo, D., Lim, S. J., Dutta, P., Yan, S. J., and Li, W. X. (2008) *Nat Cell Biol* **10**, 489-496
18. Qin, H. R., Kim, H. J., Kim, J. Y., Hurt, E. M., Klarmann, G. J., Kawasaki, B. T., Duhagon Serrat, M. A., and Farrar, W. L. (2008) *Cancer Res* **68**, 7736-7741
19. Hazan-Halevy, I., Harris, D., Liu, Z., Liu, J., Li, P., Chen, X., Shanker, S., Ferrajoli, A., Keating, M. J., and Estrov, Z. (2010) *Blood* **115**, 2852-2863
20. Yang, J., Chatterjee-Kishore, M., Staugaitis, S. M., Nguyen, H., Schlessinger, K., Levy, D. E., and Stark, G. R. (2005) *Cancer Res* **65**, 939-947
21. Yang, J., Liao, X., Agarwal, M. K., Barnes, L., Auron, P. E., and Stark, G. R. (2007) *Genes Dev* **21**, 1396-1408
22. Lee, H., Herrmann, A., Deng, J. H., Kujawski, M., Niu, G., Li, Z., Forman, S., Jove, R., Pardoll, D. M., and Yu, H. (2009) *Cancer Cell* **15**, 283-293
23. Courapiéd, S., Sellier, H., De Carne Trecesson, S., Vigneron, A., Bernard, A. C., Gamelin, E., Barre, B., and Coqueret, O. (2010) *J Biol Chem* **285**, 26765-26778.
24. Ma, X. T., Wang, S., Ye, Y. J., Du, R. Y., Cui, Z. R., and Somsouk, M. (2004) *World J Gastroenterol* **10**, 1569-1573
25. Kusaba, T., Nakayama, T., Yamazumi, K., Yakata, Y., Yoshizaki, A., Inoue, K., Nagayasu, T., and Sekine, I. (2006) *Oncol Rep* **15**, 1445-1451
26. Kusaba, T., Nakayama, T., Yamazumi, K., Yakata, Y., Yoshizaki, A., Nagayasu, T., and Sekine, I. (2005) *J Clin Pathol* **58**, 833-838
27. Hbib, A. T., Lagorce, C., Wind, P., Spano, J. P., Des Guetz, G., Milano, G., Benamouzig, R., Rixe, O., Morere, J. F., Breau, J. L., Martin, A., and Fagard, R. (2008) *Cancer Biomark* **4**, 83-91
28. O'Connell, JB., Maggard, MA., Ko, CY. *J Natl Cancer Inst* **96**, 1420-5
29. Gunderson, LL., Milburn Jessup, J., Sargent, DJ., Greene, FL., Stewart, AK. *J Clin Oncol* **28**, 264-271

FIGURE LEGENDS

Figure 1: STAT3 phosphorylation in normal tissue

A. Specific nuclear staining with anti-p-STAT3Ser727 of endothelial, muscular cells of the capillary (original magnification x200). B. p-STAT3 Tyr705 expression in epithelium of the basis of normal colon crypts with an internal positive control (original magnification x100). C. p-STAT3 Ser727 expression in epithelium of the basis of normal colon crypts with an internal positive control (original magnification x100).

Figure 2: Tyrosine 705 phosphorylation of STAT3 in colorectal adenoma according to the grade of dysplasia.

A and B. Adenoma HES (original magnification x40 and X100) with low or high grade dysplasia (left). p-STAT3 Tyr705 expression in low or high grade dysplasia as indicated (right)

C. Average percentages of cells with positive nuclear staining with the anti-p-STAT3 Tyr705 antibody (left). Intensity distribution of nuclear staining with the anti-p-STAT3 Tyr705 antibody (right). Statistical differences with the Wilcoxon test was $p = 0,0003$ for the percentage and $p=0,0000661$ for the intensity between the low grade the high grade.

Figure 3: Serine 727 phosphorylation of STAT3 in colorectal adenoma according to the grade of dysplasia.

A and B. Adenoma HES (original magnification x40 and x100) with low or high grade dysplasia (left). p-STAT3 Ser727 expression in low or high grade dysplasia as indicated (right)

C. Average percentages of cells with positive nuclear staining with the anti-p-STAT3 Ser727 antibody (left). Intensity distribution of nuclear staining with the anti-p-STAT3 Ser727 antibody (right). Statistical differences with the Wilcoxon test is either $p<0,001$ ($p= 0,0005$) or $p<0, 0001$ ($p=0,00005$) between the low grade the high grade.

Figure 4: Correlations between p-STAT3Tyr 705 and p-STAT3 Ser727 nuclear staining and the grade of tumour invasion.

A, B. Representative staining of STAT3 phosphorylation in adenocarcinoma.

C. Average percentage of cells with nuclear staining p-STAT3 Tyr705 and p-STAT3 Ser727 and the grade of tumour invasion T1: tumor invades the submucosa; T2: tumor invades the muscularis propria; T3: tumor invades through the muscularis propria into the subserosa or perirectal tissues; T4: tumor directly invades other organs or structures and/or perforates visceral peritoneum.

D. Average percentage of cells with nuclear staining p-STAT3 Tyr705 and p-STAT3 Ser727 and stages I, II, III, IV: the average 5 years-survival is noticed for each categories according to O Connell et al. (28) and Gunderson et al (29).

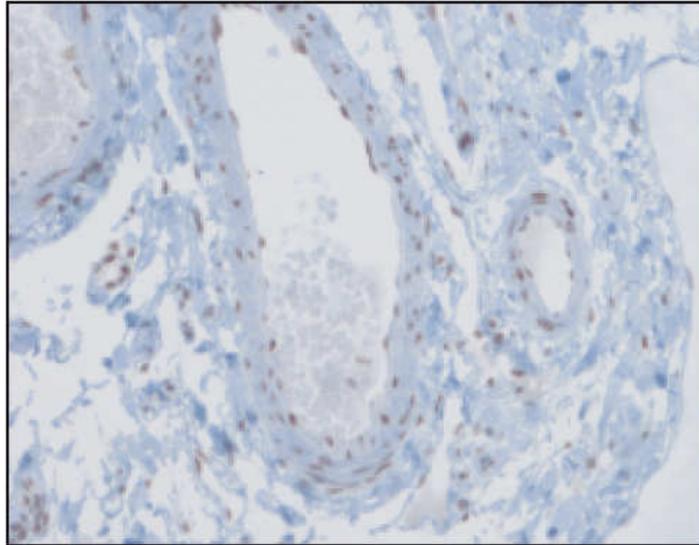
Figure 5: Phosphorylation of STAT3 in colorectal cell lines

A. Total cell extracts were obtained from growing colorectal cell lines, starved cell lines or cells that have been starved for 24 hrs and further stimulated with IL6. STAT3 phosphorylation was evaluated by western blot analysis using the indicated antibodies. Tubulin staining was used as an internal control (n=3)

B. Soluble chromatin was prepared from HT29 growing cells and immunoprecipitated with antibodies directed against STAT3 or control antibodies. DNA was amplified using pair of primers that covers the STAT3 proximal binding site of the cyclin D1 or Myc promoters. ChIP assays were quantified by real-time PCR (n=3).

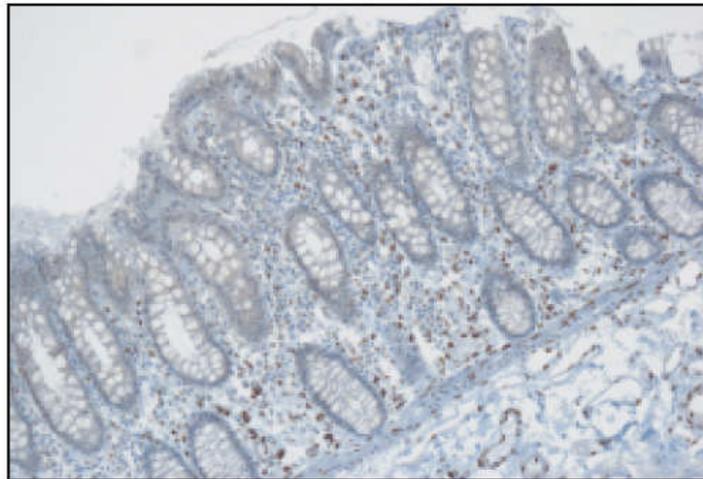
C. The indicated cells were treated or not with Static as indicated for 8 days. Colony formation was then counted using an inverted microscope, and the growth of non treated cells was set up at 100%. Clonogenic survival was then plotted as a fraction relative to these untreated cells (n=3 +/- sd).

A.



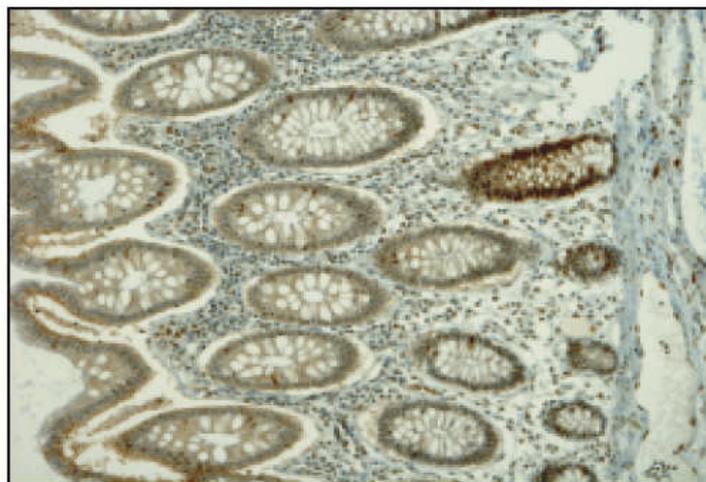
STAT3 Ser727 Staining, Normal Tissue

B.



STAT3 Tyr705 Staining, Normal Colon Tissue

C.



STAT3 Ser727 Staining, Normal Colon Tissue

Figure 1

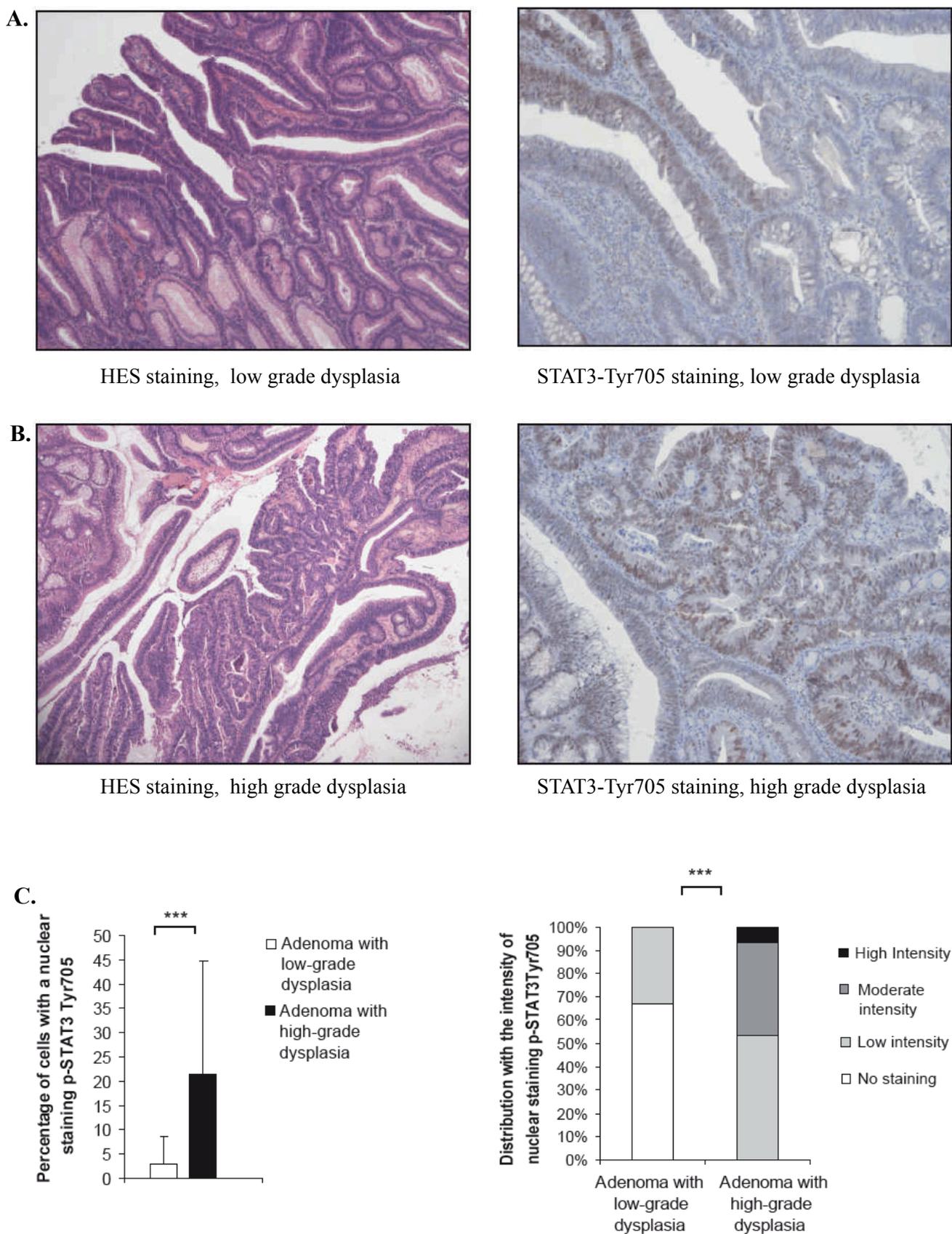


Figure 2

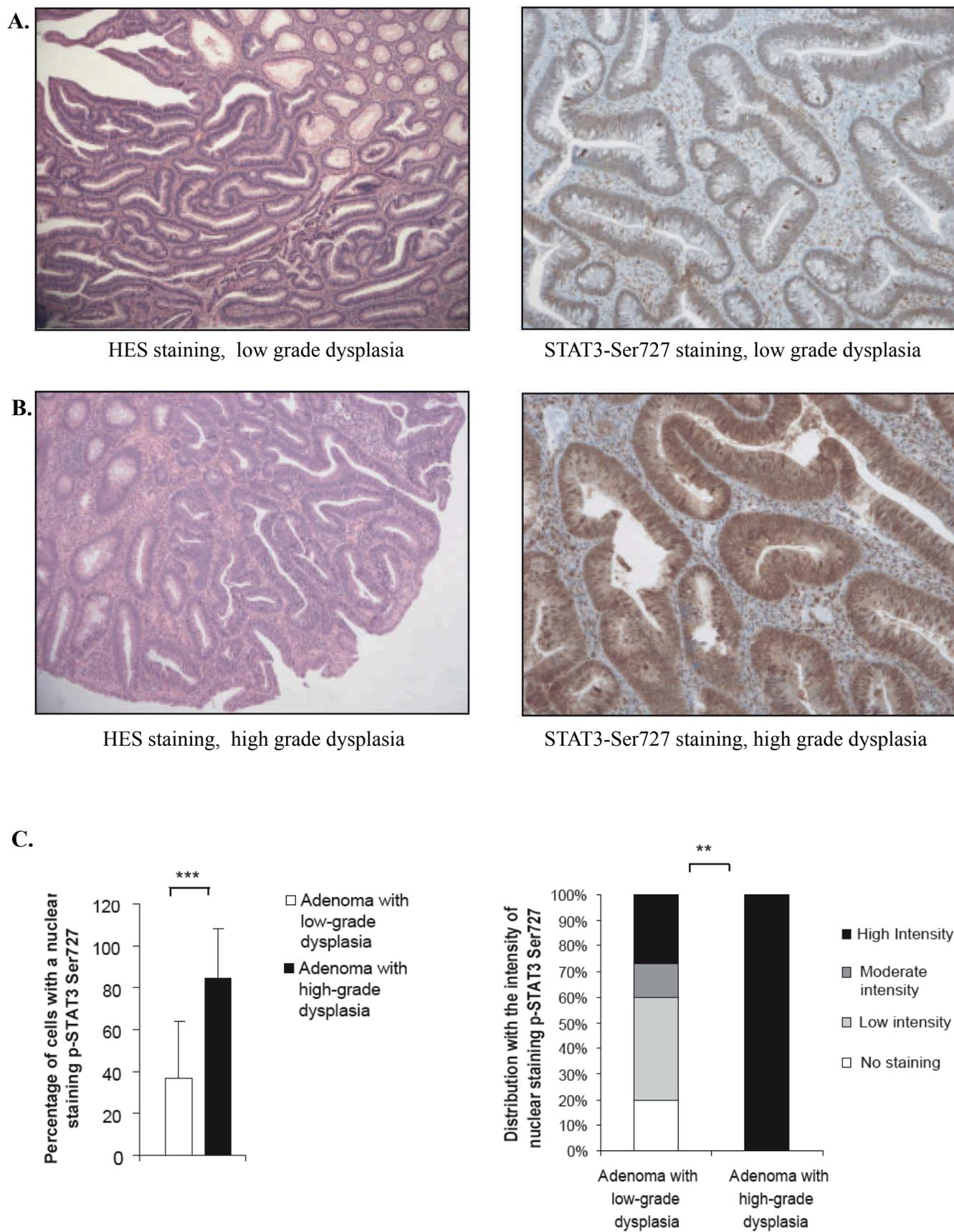
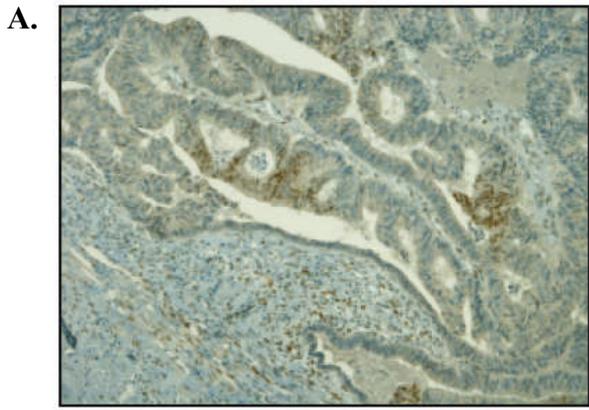
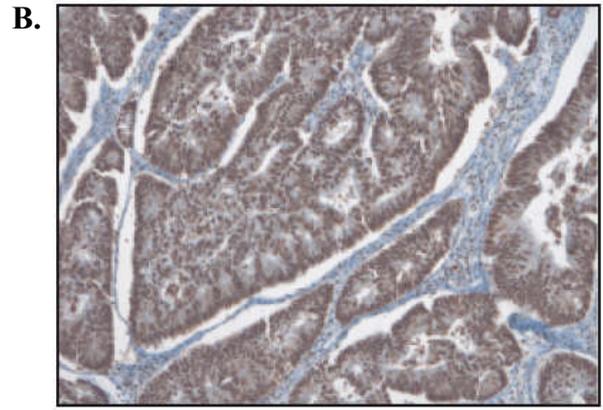


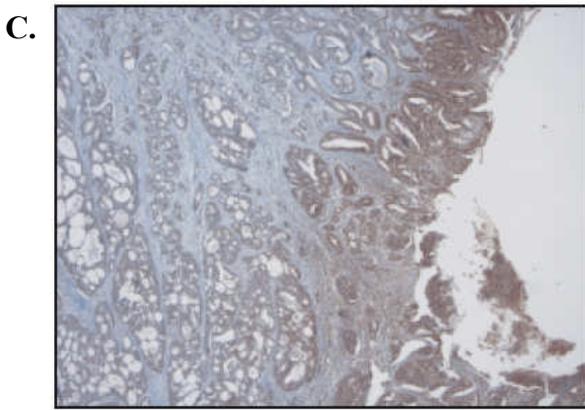
Figure 3



STAT3-Tyr705 staining, adenocarcinoma



STAT3-Ser727 staining, adenocarcinoma



STAT3-Ser727 staining, invasion vs superficial area

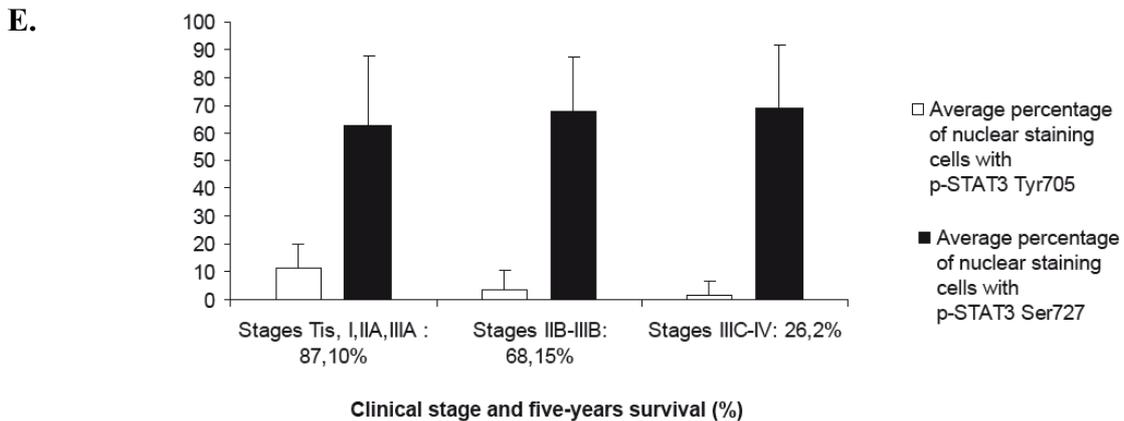
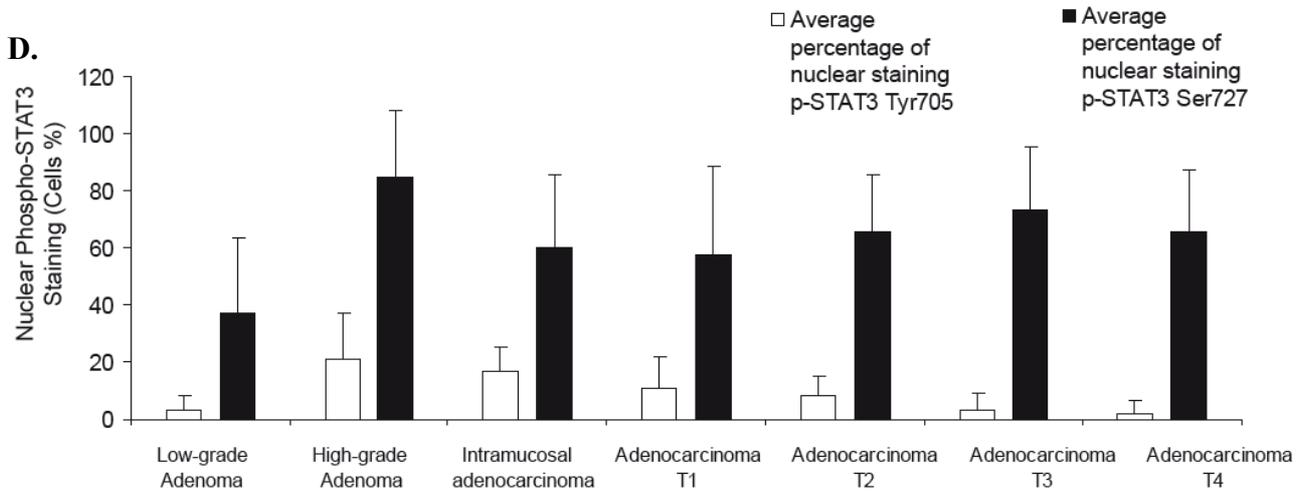
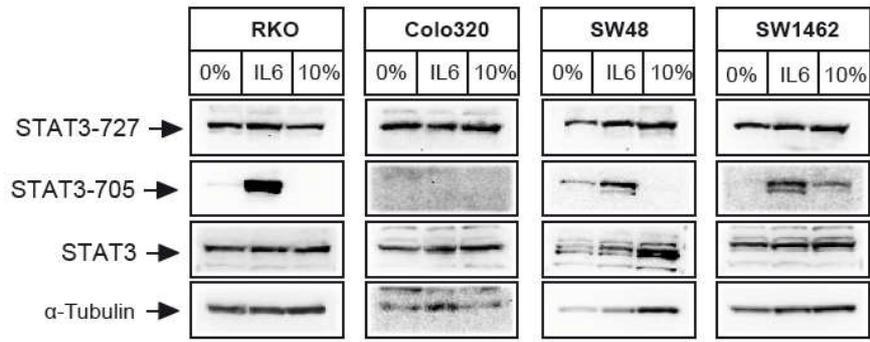


Figure 4

A.



B.

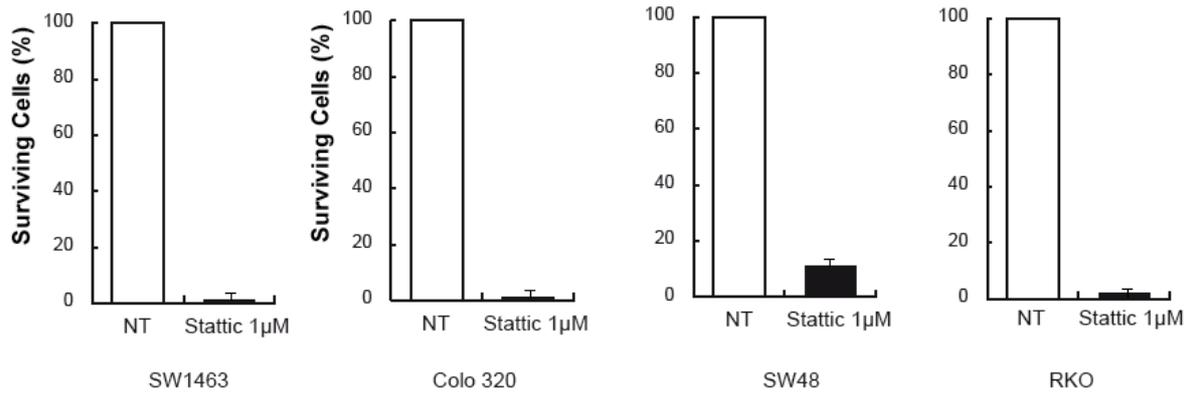


Figure 5

DISCUSSION

~

Chapitre 1

La kinase Cdk5 régule STAT3 pour empêcher les dommages de l'ADN induits par une inhibition des topoisomérases I.

Dans un premier temps, nous avons vu que l'inhibition des topoisomérases de type I induisait uniquement la phosphorylation du résidu sérine 727 de STAT3. Nous n'avons pas été capables de détecter une phosphorylation du résidu 705 de STAT3 dans ces conditions. Puis nous avons montré que cette phosphorylation était due à l'activation de Cdk5, recruté par son coactivateur p35, en réponse au sn38. En effet la kinase se fixe sur le domaine C-terminal du facteur de transcription pour induire sa phosphorylation. Cette voie Cdk5-STAT3, à la suite d'une inhibition des topoisomérases de type I permet la diminution de l'expression de gènes impliqués dans la progression de la phase G1 du cycle cellulaire comme la Cycline D1 et c-Myc afin de favoriser l'expression des gènes de réparation tel que Eme1.

I. Aucune phosphorylation du résidu tyrosine 705 n'a été détectée

Il est connu que STAT3 est activé durant la transition G0-G1 du cycle cellulaire en réponse à une stimulation de cytokines ou de facteurs de croissance. Cette activation se traduit par la phosphorylation du facteur de transcription sur son résidu tyrosine 705, sa dimérisation et sa translocation nucléaire, puis par l'induction de l'expression de ses gènes cibles comme c-Myc, cycline D1, c-Fos ou Cdc25a. La seconde phosphorylation de STAT3 sur son résidu sérine 727 permettrait le contact du dimère de STAT3, phosphorylé sur la tyrosine 705, avec ses coactivateurs transcriptionnels.

Dans la lignée cellulaire colorectale HT29, nous avons détecté l'expression de la phosphotyrosine de STAT3 par western blot ou par immunoprécipitation de chromatine sur les gènes de c-Myc et de la cycline D1, lorsque les cellules étaient stimulées à l'IL-6. Nous n'avons pas été capables de détecter de phosphorylation sur le résidu tyrosine 705 dans les cellules HT29 en croissance par western blot. Cependant, nous avons obtenu des résultats contradictoires en réalisant un CHIP de STAT3 sur les gènes c-Myc et de la cycline D1 dans les mêmes conditions. La phosphorylation de la tyrosine 705 de STAT3 est un événement cytoplasmique furtif, il avait été montré que la demi-vie de phosphorylation de STAT1 était de 15 minutes (Haspel, Salditt-Georgieff *et al.* 1996). Nous pouvons émettre l'hypothèse que STAT3 est phosphorylé sur son résidu tyrosine 705 dans les cellules en croissance mais est rapidement inactivé par différentes phosphatases telles que TC45, SHP1 et SHP2 (Kim *et al.* 2010). Par conséquent, une analyse de son

expression par western blot ne nous permet pas de détecter cette modification. En revanche, lorsque STAT3 est présent sur l'ADN, il forme un homodimère plus stable. Ceci pourrait expliquer pourquoi nous avons détecté la forme phosphorylée de la tyrosine de STAT3 uniquement en utilisant la technique de ChIP.

Néanmoins, d'autres études montrent que la phosphorylation du résidu 705 de STAT3 n'est pas nécessaire à son activité transcriptionnelle. L'équipe de G. Stark a montré que la mutation de la tyrosine 705 de STAT3 ne bloque pas son activité transcriptionnelle, mais au contraire conduit à une seconde vague d'expression de gènes comme RANTES, IL-6, IL-8, MET et MRAS qui ne répondent pas normalement directement à STAT3 lorsqu'il est phosphorylé sur son site 705. De plus, la plupart de ces gènes, répondant à la forme non phosphorylée de STAT3, présentent des éléments κB qui sont activés par un complexe formé de STAT3 et NF-κB, tous deux sous une forme non phosphorylée (U-STAT3/U-NF-κB). Le complexe U-STAT3/U-NF-κB s'accumule dans le noyau grâce au signal de localisation nucléaire de STAT3 puis se fixe et active un groupe de gènes dépendant des éléments κB. Ces travaux suggèrent que les cibles du facteur de transcription STAT3 dépendent de ses modifications post-traductionnelles. Etant donné que nous n'avons pas observé de phosphorylation de STAT3 sur son résidu tyrosine 705 dans les cellules HT29 après une inhibition des topoisomérases de type I, il serait intéressant de savoir si STAT3, sous une forme non phosphorylée, forme un complexe avec d'autres cofacteurs pour activer un nouveau groupe de gènes impliqués dans la réparation.

II. La kinase Cdk5 est-elle la seule kinase qui phosphoryle STAT3 sur son résidu sérine 727 en réponse aux dommages de l'ADN ?

Nous avons remarqué que l'absence de la kinase Cdk5 ne supprime pas la totalité de la phosphorylation du résidu sérine 727. Cette observation nous fait penser que Cdk5 n'est pas la seule kinase responsable de la phosphorylation de STAT3 sur son site 727 à la suite d'une inhibition des topoisomérases de type I. Il serait intéressant de déterminer si d'autres voies de signalisation sont capables d'activer STAT3 en réponse à des dommages de l'ADN.

La voie de réponse aux dommages de l'ADN contrôle les transitions du cycle cellulaire, la réplication de l'ADN et l'apoptose ou la sénescence. Les principaux régulateurs de la réponse aux dommages de l'ADN sont les protéines PIKKs (*Phosphoinositol-3 Kinase-related protein Kinase*), ATM (*Ataxia-Telangiectasia Mutated*) et ATR (*ATM and RAD23-related*). ATM et ATR ont des fonctions similaires comme l'implication dans l'arrêt du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN. ATM est principalement activé à la suite de cassures doubles brins, tandis que ATR est activé et est essentiel lors de dommages des fourches de réplication sur un simple brin d'ADN durant la phase S

(Cimprich and Cortez 2008). La kinase ATM, avec des protéines adaptatrices spécifiques, joue un rôle central dans l'initiation de la voie de signalisation du point de contrôle en réponse à des cassures doubles brins, en phosphorylant et activant ses substrats tels que Chk2 et γ H2AX (Kastan and Lim 2000). La kinase ATR, avec ses protéines adaptatrices spécifiques joue un rôle important dans la coordination de la réplication de l'ADN en réponse aux dommages et une fois activée, elle phosphoryle ses substrats spécifiques comme Chk1 (Cimprich and Cortez 2008). Les voies de réponses aux dommages de l'ADN activées par les couples ATM-Chk2 et ATR-Chk1 sont nombreuses. Il a été montré que le facteur de transcription STAT3 est requis pour une réparation efficace des dommages de l'ADN à la suite d'une irradiation aux UVB. Les cellules MEFs déficientes en STAT3 présentent un système de réparation des dommages moins efficace, suggérant que STAT3 est nécessaire pour une réparation optimale. De plus, une augmentation artificielle du taux de STAT3 est corrélée avec une augmentation de la capacité à réparer l'ADN et restaurer le phénotype défectueux dans les cellules knock-out (Barry *et al.* 2010).

Arnaud Vigneron avait montré, au laboratoire, qu'une inhibition des topoisomérases de type I induisait la phosphorylation de Chk1 sur son résidu sérine 345 dans les lignées cellulaires HCT116 et HT29 (Vigneron *et al.* 2008). Comme expliqué ci-dessus, l'activation de Chk1 est effectuée par la kinase ATR. Cependant, ATM est également capable de phosphoryler et activer Chk1 mais plus faiblement que ATR (Bartek and Lukas 2003). D'après ces travaux, nous pouvons penser qu'à la suite de dommages de l'ADN créés par une inhibition des topoisomérases de type I, la voie de réponse ATM-ATR/Chk1-Chk2 est activée. Etant donné que ces protéines sont des sérine-thréonine kinases, elles pourraient être impliquées dans la phosphorylation de STAT3 sur la sérine 727 à la suite de dommages de l'ADN.

Lors de la réalisation de ces travaux, Sandy Courapied a réalisé, en collaboration avec le Dr Catherine Guette, une immunoprécipitation de STAT3 dans les cellules HT29 traitées au sn38, puis a analysé l'immunoprécipitat par spectrométrie de masse. De cette manière, elle a mis en évidence de nombreux partenaires potentiels de STAT3 à la suite d'une inhibition des topoisomérases de type I. Parmi les différentes protéines trouvées, une protéine a semblé particulièrement intéressante par son rôle dans la réparation des dommages de l'ADN. Il s'agit de la sérine-thréonine kinase DNA-PK (*DNA-protein kinase*). Elle est composée des sous-unités Ku70/80 et d'une sous-unité catalytique DNA-PK_{Cs} et fait partie de la famille des PI-3-K, avec ATM et ATR. Elle a également été décrite comme appartenant au système de réparation NHEJ (*NonHomologous Ends Junctions*) (Collis *et al.* 2005). Ce système NHEJ est actif durant le cycle cellulaire et plus particulièrement durant les phases G0 et G1 et est considéré comme la principale voie de réparation des cassures

doubles brins de l'ADN dans les cellules humaines. Cette kinase est également impliquée dans le système de réparation HR. Lorsque la cellule présente des cassures doubles brins, elle a le choix entre ces deux systèmes de réparation NHEJ ou HR (Kong *et al.* 2011). Cependant, comment la cellule choisit entre ces deux modes de réparation est une question qui reste encore en suspend. Aucune étude n'a montré de lien direct entre DNA-PK et STAT3. De plus, une analyse bio-informatique des sérine-thréonine kinases capables de phosphoryler le résidu sérine 727 de STAT3 a montré que DNA-PK pourrait être un bon candidat (GPS 2.1). Il serait alors pertinent de déterminer si cette kinase phosphoryle STAT3 sur son résidu sérine 727 en réponse à une inhibition des topoisomérases de type I.

Ces premiers travaux nous ont permis de suggérer qu'en réponse à une inhibition des topoisomérases de type I, STAT3 est phosphorylé sur son résidu sérine 727 par la kinase Cdk5 et active l'expression de l'endonucléase de réparation Eme1. Cette protéine participe au système de recombinaison homologue afin de réparer les cassures doubles brins de l'ADN créés par le blocage des fourches de réplication.

Nous avons montré que différentes phosphorylations de STAT3 permettent d'activer différents gènes cibles : la phosphorylation du résidu tyrosine 705 est impliqué dans l'activation des gènes de prolifération en réponse à une stimulation de facteurs de croissance ou de cytokines. En revanche, la phosphorylation du résidu sérine 727 permet l'activation de gènes de réparation à la suite d'une inhibition de topoisomérases de type I.

Nous avons observé que ce traitement induit un arrêt du cycle cellulaire pendant la phase G2-M du cycle cellulaire. Nous nous sommes alors demandé si STAT3 était également phosphorylé sur son résidu lors de la phase G2-M du cycle cellulaire.

Chapitre 2

STAT3 est activé pendant la phase G2 du cycle cellulaire afin de réguler l'expression des gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire.

Dans une deuxième partie de ce travail, nous avons montré que le facteur de transcription STAT3 était également phosphorylé sur son résidu sérine 727 lors de la phase G2 et de la mitose. Cette phosphorylation, due à la kinase Cdk1, permet de réguler l'expression de gènes impliqués dans le déroulement des phases G2 et M du cycle cellulaire, tels que PLK1, STIL, RIC8A, FoxM1, NuMa, Cdc25C.

Ces travaux ont mis en évidence qu'une même modification post-traductionnelle de STAT3 peut conduire à la régulation de gènes différents. Dans des cellules en croissance STAT3, phosphorylé sur son résidu sérine 727, régule l'expression des gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire. Au contraire, lors de dommages de l'ADN, STAT3 phosphorylé sur ce même résidu active l'expression de gènes de réparation au dépend des gènes du cycle cellulaire.

I. Les gènes cibles potentiels de STAT3

Par la méthode de CHIP-on-chip, nous avons mis en évidence de nombreux gènes cibles potentiels de STAT3 impliqués dans la progression de la phase G2 vers la M du cycle cellulaire. Quelques-uns de ces gènes comme STIL, RIC8A, FoxM1, NuMa et Cdc25c ont été confirmés par la technique de CHIP classique. Etant donné que nous avons montré dans la première partie de ce travail que STAT3 était capable d'activer la réparation des dommages de l'ADN en réponse à une inhibition des topoisomérases de type I, nous nous sommes intéressés aux gènes impliqués dans la réparation des dommages de l'ADN et dans la mort cellulaire parmi les gènes cibles potentiels de STAT3 obtenus par la technique de CHIP-on chip.

Le tableau 4 présente les gènes cibles potentiels de STAT3 impliqués dans la réparation des cassures simples et doubles brins d'ADN. Nous avons remarqué qu'un grand nombre de ces gènes appartiennent au système de réparation NER (*Nucleotide Excision Repair*), BER (*Base Excision Repair*), HR (*Homologous Repair*) et MMR (*Mismatch Repair*). Il serait pertinent, dans un premier temps, de confirmer ces gènes en réalisant un CHIP de STAT3 sur ces différents gènes avec ou sans traitement génotoxique. En effet, ces résultats ont été obtenus dans des cellules synchronisées par privation de sérum. Ce qui suggère que STAT3 contrôlerait la réplication de l'ADN en activant des gènes de réparation dans les cellules en croissance.

TABLEAU 4 | Listes de principaux gènes cibles potentiels de STAT3 impliqués dans la réparation des dommages de l'ADN

SYMBOLE	NOMS	RÔLE	RÉFÉRENCES
ERCC2 (XPD)	<i>excision repair cross-complementing 2</i>	NER	(Lehmann 2008)
ERCC4 (RAD1 ou XPF)	<i>excision repair cross-complementing 4</i>	NER	(Rouillon and White 2011)
ERCC6 (RAD26)	<i>excision repair cross-complementing 6</i>	NER	(Troelstra <i>et al.</i> 1992)
EXO1	<i>exonuclease 1</i>	NER	(Sertic <i>et al.</i> 2011)
RAD23B	RAD23B	NER	(Dantuma <i>et al.</i> 2009)
XAB2	<i>XPA binding protein</i>	NER	(Nitta <i>et al.</i> 2000)
XPC	<i>xeroderma pigmentosum</i>	NER	(Friedberg 2001)
FEN1 (RAD2)	<i>flap structure-specific endonuclease 1</i>	NER, BER, HR	(Tsutakawa <i>et al.</i> 2011)
MRE11A	<i>MRE11 meiotic recombination 11 homolog A</i>	HR	(Ricceri <i>et al.</i> 2011)
WRN (RECQL3)	<i>Werner syndrome</i>	HR	(Chu and Hickson 2009)
MLH3	<i>mutL homolog 3</i>	MMR	(Holloway <i>et al.</i> 2011)
PMS1	<i>postmeiotic segregation increased 1</i>	MMR	(Marti <i>et al.</i> 2002)
RAD50	RAD50	phosphoryle ATM	(Gatei <i>et al.</i> 2011)
APTX	<i>Aprataxine</i>	réparation des cassures simples brins	(Crimella <i>et al.</i> 2011)
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>		(Burma, Chen <i>et al.</i> 2001)
RECQL4	RECQL4	maintenance des fourches de réplication	(Masai 2011)

Par la suite, nous avons étudié et sélectionné plusieurs gènes cibles potentiels de STAT3 impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire ou la mort cellulaire. La liste de ces gènes est présentée dans le Tableau 5. Certains d'entre eux sont déjà connus pour être des cibles de STAT3. L'équipe de Ronai a montré que l'expression du dominant négatif de STAT3 ou de c-Jun dans des cellules de mélanomes augmente efficacement l'expression de Fas et sensibilise les cellules à l'apoptose induite par FasL (Ivanov, Bhoumik *et al.* 2001). Les voies de AKT et de STAT3 sont deux voies de signalisation parallèles, mais il a été mis en évidence que STAT3 est nécessaire et suffisant pour induire l'expression de AKT1 (Xu *et al.* 2005). Ces exemples montrent que STAT3 peut réguler négativement l'apoptose dans les cellules en croissance en se liant au promoteur de ses gènes cibles impliqués dans ce processus.

TABLEAU 5 | Listes de principaux gènes cibles potentiels de STAT3 impliqués dans la mort cellulaire

SYMBOLE	NOMS	RÔLE	RÉFÉRENCES
AKT1	AKT1	phosphoryle et inactive les composants de la machinerie apoptotique	(Song <i>et al.</i> 2005)
BAD	<i>BCL2-associated agonist of cell death</i>	régule positivement l'apoptose avec BCL-XL et Bcl-2	(Datta <i>et al.</i> 1997)
BAX	<i>BCL2-associated X protein</i>	forme un hétérodimère avec Bcl-2 et fonctionne comme un activateur de l'apoptose	(Westphal <i>et al.</i> 2011)
BCL2	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>	forme un hétérodimère avec Bcl-2 et fonctionne comme un activateur de l'apoptose	(Adams and Cory 1998)
FAS	<i>TNF receptor superfamily</i>	rôle central dans la régulation du programme de mort cellulaire	(Nagata and Golstein 1995)
NFKB2	<i>Nuclear Factor of kappa in B cells</i>	induit un arrêt du cycle cellulaire et la mort cellulaire en réponse aux dommages de l'ADN	(Barre <i>et al.</i> 2010)
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>	cytokine impliquée dans de nombreux mécanismes cellulaires comme l'apoptose	(Wiley <i>et al.</i> 1995)
TP53	<i>Tumor Protein p53</i>	régule l'expression de gènes cibles impliqués dans de multiples processus cellulaires comme l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose ou la sénescence.	(Negrini <i>et al.</i> 2010)

Ces travaux nous ont suggéré que STAT3 était capable de réguler de nombreux gènes impliqués dans des mécanismes opposés mais complémentaires comme la progression du cycle cellulaire, la réparation des cassures et la mort cellulaire. En effet, lors de dommages de l'ADN, la cellule arrête de proliférer pour activer soit la réparation de ses dommages, soit induire la mort cellulaire.

A partir de ces observations, une question se pose : comment STAT3, dans une cellule en croissance peut-il réguler ces différents groupes de gènes. En effet nous avons montré que lors d'inhibition de topoisomérases de type I, STAT3 phosphorylé sur son résidu sérine 727 se lie au promoteur de Eme1, membre du système de réparation HR, au dépend des gènes impliqués dans la progression de la phase G0 vers la phase G1 du cycle cellulaire. Cependant, STAT3, phosphorylé sur ce même résidu, est également capable d'induire la progression du cycle cellulaire de la phase G2 vers la mitose. Il serait donc important de mieux comprendre, comment un même facteur de transcription, phosphorylé sur son résidu sérine 727 est capable d'activer la progression du cycle

cellulaire de la phase G2 vers la phase M, mais également d'activer la réparation de l'ADN en réponse à un traitement génotoxique.

Trois hypothèses permettraient d'expliquer ces observations : i) STAT3 possède d'autres modifications post-traductionnelles lui permettant de cibler la fixation du facteur de transcription sur ces gènes cibles. ii) STAT3 se lie à des coactivateurs différents. iii) STAT3, soit avec une modification post-traductionnelle différentes, soit avec des partenaires différents, reconnaît des séquences d'ADN spécifiques différentes pour les gènes de réparation et les gènes du cycle cellulaire afin de se stabiliser sur le promoteur.

II. STAT3 possède-t-il d'autres modifications post-traductionnelles ?

L'équipe de GR. Stark a remarqué que STAT3 était méthylé sur son résidu lysine 140 par la méthylase SET9 et déméthylé par LSD1, lorsque celui-ci est présent sur le promoteur de ses gènes cibles en réponse à l'IL-6. Cette modification n'a lieu que lorsque STAT3 est phosphorylé sur son résidu sérine 727. Et elle est considérée une régulation négative parce que STAT3 méthylé sur son site lysine 140 est capable de se lier au promoteur de SOCS3 (Yang, Huang *et al.* 2010). Des résultats préliminaires nous ont montré que STAT3, phosphorylé sur son résidu tyrosine 705 se lie aux promoteurs des gènes de la phase G2. De plus, nous avons observé que STAT3 interagissait avec SET9 durant le cycle cellulaire mais cette interaction diminue lors de la phase G2-M du cycle cellulaire. Il sera nécessaire par la suite de déterminer si SET9 méthyle STAT3 sur son résidu lysine 140 et si cette méthylation de STAT3 stabilise la liaison du facteur de transcription sur le promoteur de ses gènes cibles impliqués dans la progression de la mitose. Par ailleurs, nous pourrions mettre en évidence que SET9 interagit avec STAT3 uniquement lorsqu'il est sous forme d'homodimère et phosphorylé sur son résidu sérine 727 en utilisant des dimères forcés de STAT3 mutés sur le résidu sérine 727 (Bromberg, Wrzeszczynska *et al.* 1999) puis comparer à un monomère STAT3 muté sur le même résidu.

III. Quels sont les partenaires de STAT3 ?

La méthylase SET9 est également connue pour méthyler l'histone H3 sur son résidu lysine 4 en plus de Suv39h1 qui méthyle H3 sur sa lysine 9 (Nishioka *et al.* 2002). La triméthylation de l'histone H3 sur son résidu lysine 9 (H3K9me3) est importante pour le recrutement de l'hétérochromatine HP1 sur l'ADN. Celle-ci permet alors l'établissement et le maintien de régions d'hétérochromatine. Il a été mis en évidence que HP1 et Suv39h1 peuvent interagir avec Rb permettant la répression de la transcription (Nielsen *et al.* 2001). En parallèle, l'équipe de WX. Li a montré, chez la drosophile, que STAT92E interagit avec HP1 pour stabiliser l'hétérochromatine. Cependant, lorsque STAT92E est phosphorylé sur son résidu tyrosine par JAK, HP1 n'interagit plus avec STAT3 et est déplacé sur une autre région de l'ADN, permettant la formation d'euchromatine et l'activation de la transcription des gènes (Shi, Larson *et al.* 2008).

Lors de travaux préliminaires, nous avons observé que STAT3 interagit avec HP1 durant l'interphase mais cette interaction est perdue lors de la mitose. Par CHIP, nous avons trouvé que E2F1 et Rb sont présents sur le promoteur des gènes de G2 lors de la mitose.

Nous pouvons émettre l'hypothèse que, lors de la phase G2, STAT3 est lié à E2F-1 et est présent sous forme d'homodimère phosphorylé sur ses résidus tyrosine 705 et sérine 727. Ce dimère est ensuite reconnu par la méthylase SET9, qui le méthyle sur son résidu lysine 140. Cette nouvelle modification permet de stabiliser le complexe sur les promoteurs des gènes de la phase G2 du cycle cellulaire et d'induire leur transcription.

Cependant, lors de la mitose, STAT3 est uniquement phosphorylé sur la sérine 727. L'absence de la forme d'homodimère ne permet plus à SET9 d'interagir avec STAT3 et de le méthyler. HP1, lié à la lysine 9 méthylée de l'histone H3, remplace alors SET9 et se lie à STAT3. Cette protéine d'hétérochromatine est capable d'interagir avec différentes protéines pour former un complexe multi-protéines (Brasher *et al.* 2000). Il formerait ainsi un complexe avec Suv39h1, STAT3, et Rb afin d'activer la machinerie de répression transcriptionnelle (Figure 43).

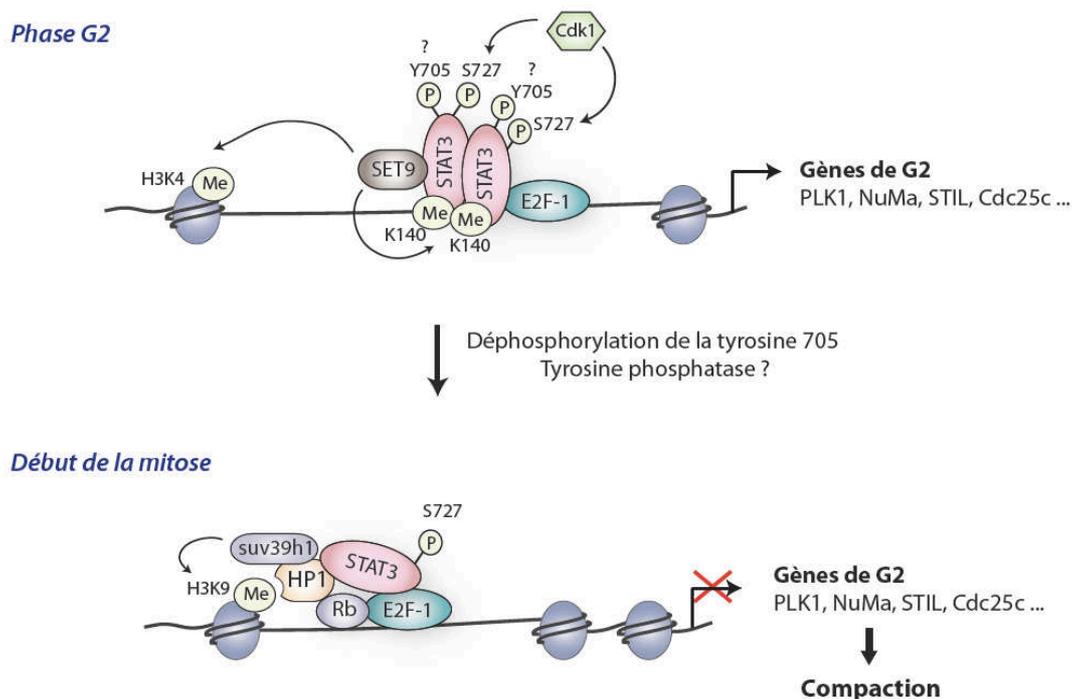


FIGURE 43| SET9 et HP1 entrent en compétition pour fixer STAT3 lors des phases G2 et M du cycle cellulaire. Lors de la phase G2, le dimère STAT3, phosphorylé sur son résidu sérine 727 par Cdk1 interagit avec E2F-1 et se lie aux promoteurs des gènes de G2. SET9 fixe et méthyle le dimère STAT3 sur son résidu lysine 140 permettant de le stabiliser sur les promoteurs. En début de mitose, STAT3 est déphosphorylé sur son résidu tyrosine, ce qui entraîne la dislocation du dimère. SET9 ne peut alors plus interagir avec STAT3. La méthylase suv39h1 méthyle l'histone H3 sur sa lysine 9 favorisant le recrutement de HP1 et de Rb. STAT3, phosphorylé uniquement sur son résidu sérine 727 interagit avec HP1. De cette manière le complexe HP1-Rb-STAT3-E2F-1 active la répression transcriptionnelle des gènes cibles de STAT3.

IV. STAT3 reconnaît des séquences différentes :

Nous avons montré que le facteur de transcription STAT3, phosphorylé sur son résidu sérine 727, est capable de se lier aux promoteurs de gènes impliqués dans la progression de la phase G2 du cycle cellulaire vers la mitose mais également aux promoteurs de gènes impliqués dans la réparation des dommages de l'ADN.

Il serait intéressant de savoir si le facteur de transcription reconnaît la même séquence sur les promoteurs de ces différents gènes.

Des analyses de promoteurs réalisées par différentes équipes ont révélé des séquences consensus correspondant aux sites de liaison de STAT3 (TTCCNGGAA) (Vallania *et al.* 2009).

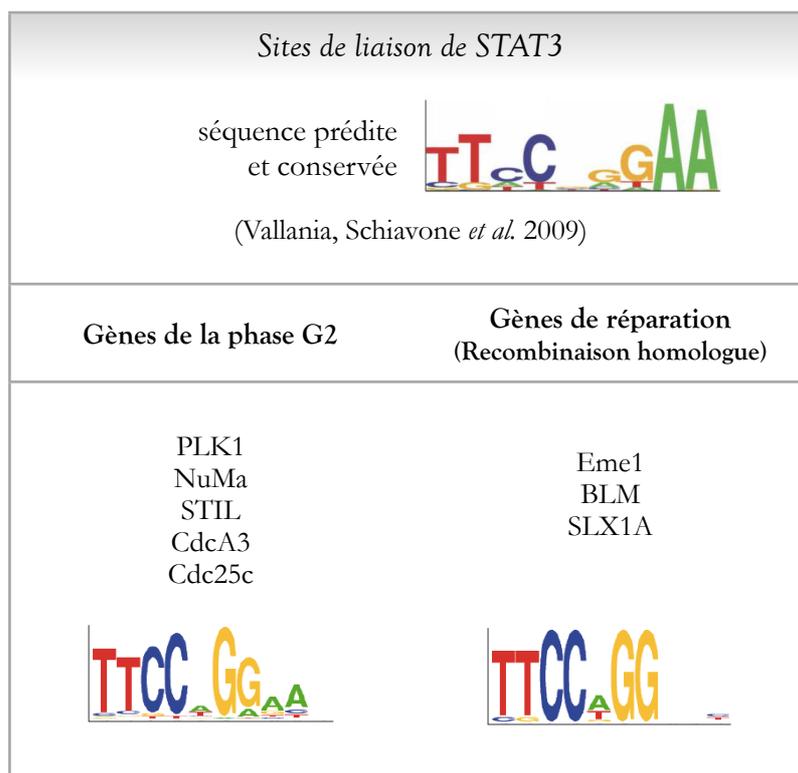


FIGURE 44 | Sites de liaisons de STAT3 retrouvés sur le promoteur des gènes impliqués dans la phase G2 du cycle du cellulaire et des gènes jouant un rôle dans la réparation de l'ADN.

Nous avons alors étudié les sites prédictifs de liaisons de STAT3 sur des gènes impliqués dans la phase G2 du cycle cellulaire et sur des gènes impliqués dans la réparation et particulièrement dans la recombinaison homologue. L'analyse des promoteurs de ces différents gènes nous a permis d'observer une petite différence AA de séquence basée sur deux nucléotides que l'on retrouve entre les gènes du cycle cellulaire et les gènes de réparation (Figure 44).

Ces différences de séquences amènent une seconde hypothèse. Lorsque la cellule répare les dommages de l'ADN, elle bloque la prolifération cellulaire. Nous avons remarqué, qu'en réponse à une inhibition des topoisomérases de type I, l'expression protéique de Eme1 est augmentée, contrairement à celle de PLK1 qui est diminuée. Lors de dommages de l'ADN créés en réponse à un traitement génotoxique ou lors de la réplication, STAT3, phosphorylé sur son résidu sérine 727 pourrait former un complexe sur l'ADN avec un cofacteur permettant de stabiliser les facteurs de transcription sur le promoteur.

Il est connu que STAT3 peut être acétylé sur son résidu lysine 685 par CBP/p300 (Wang *et al.* 2005). L'équipe de D. Haldar suggère que CBP et p300 participent à la réparation des dommages

de l'ADN. Les acétyl-transférases acétylent l'histone H3 sur la lysine 56. Cette modification est colocalisée avec γ -H2AX sur les sites de réparation de l'ADN et semble être une partie intégrale de la voie γ -H2AX, pATM et Chk2 en réponse à des agents génotoxiques comme une γ -irradiation, l'hydroxyurée et la camptothécine (Vempati *et al.* 2010). Une récente étude a montré que l'acétyl-transférase CBP/p300 est également capable d'acétyler les histones lors de la réplication de l'ADN (He *et al.* 2011).

Avec des résultats préliminaires nous avons observé que STAT3 était acétylé sur le résidu lysine 685 en réponse à des dommages de l'ADN due au sn38. Nous émettons alors l'hypothèse que CBP/p300 pourrait acétyler STAT3 en réponse à des dommages de l'ADN lors de la réplication. Cette modification transcriptionnelle de STAT3, décrite en réponse à l'IL-6, permettrait dans ces conditions de stabiliser STAT3 et un cofacteur sur les gènes de réparation afin d'activer leur transcription. Si notre hypothèse s'avère exacte, il serait intéressant de découvrir si cette acétylation permet le recrutement de partenaires spécifiques de STAT3 impliqués dans la réparation des dommages de l'ADN par spectrométrie de masse et si ce mécanisme est le même lors de dommages de l'ADN créés durant la réplication de l'ADN ou créés par un agent génotoxique (Figure 45).

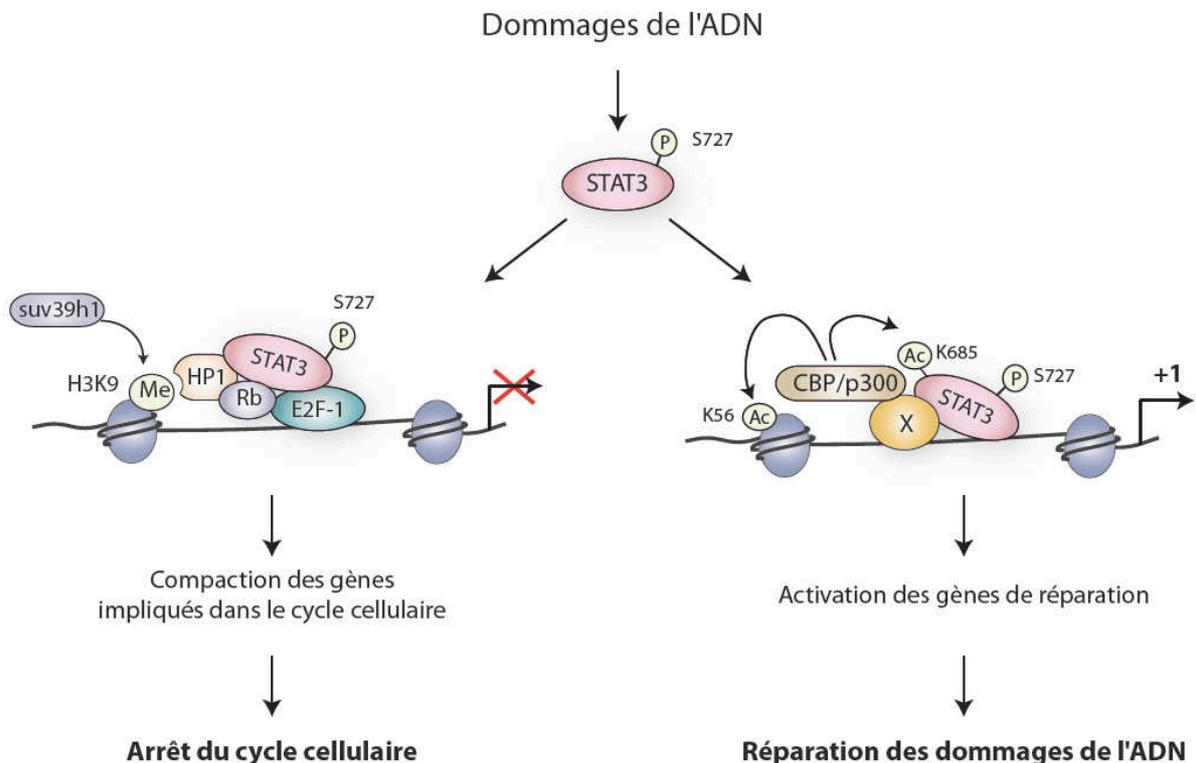


FIGURE 45 | CBP/p300 acétylerait STAT3 afin de stabiliser le complexe STAT3-E2F-1 lors de dommages de l'ADN. Le complexe CBP/p300 reconnaît les cassures de l'ADN en se liant à γ -H2AX. Ces protéines acétylent ensuite STAT3 sur son résidu lysine 685 afin de stabiliser le complexe qu'il forme avec E2F-1 et peut-être un troisième partenaire sur le promoteur de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN.

Chapitre 3

STAT3 est principalement phosphorylé sur son résidu sérine durant le stade précoce de dysplasie du cancer colorectal.

Le cancer colorectal est le troisième cancer le plus diagnostiqué chaque année chez l'homme et le deuxième chez la femme, avec plus de 1,2 millions de nouveaux cas et environ 608 700 décès en 2008 (Jemal *et al.* 2011). Tandis que le nombre de décès dus à cette maladie a été diminué dans plusieurs pays de l'Ouest, résultant de l'amélioration des traitements et de la détection précoce, le nombre de personnes atteintes du cancer colorectal augmente dans plusieurs pays aux ressources et aux infrastructures plus limitées comme l'Amérique Centrale et du Sud et l'Europe de l'Est (Center *et al.* 2009). Mais ce cancer reste encore de nos jours un problème de santé publique. Chez 85% des patients, ce cancer se développe de manière sporadique. Il est retrouvé héréditaire chez moins de 10% des patients.

Le développement du cancer colorectal est caractérisé par le passage d'un stade adénome à un stade carcinome et peut prendre plusieurs dizaines d'années. Deux voies distinctes conduisant à l'établissement du cancer colorectal ont été identifiées : l'instabilité chromosomique (phénotype CIN) ou l'instabilité microsatellite (phénotype MIN) (Lengauer *et al.* 1997). L'instabilité chromosomique se traduit par une altération génétique conduisant à une délétion ou à un gain de chromosomes (les plus retrouvées sont les délétions 1p, 8p et une perte d'hétérozygotie LOH17p et 18q). En revanche, l'instabilité microsatellite est définie par une altération génétique due à un système MMR défectueux (Soreide *et al.* 2006).

Le cancer colorectal est particulièrement bien étudié du fait des différentes altérations génétiques impliquées dans le processus de cancérogenèse. Le facteur de transcription STAT3 joue un rôle important dans le développement de la pathologie (Li Lin and Lin 2011). Il est retrouvé constitutivement activé dans les tissus cancéreux colorectaux, comme dans un grand nombre d'autres tumeurs solides (Corvinus *et al.* 2005). Cette équipe a montré que l'activation constitutive de STAT3, se traduisant par une phosphorylation constitutive sur le résidu tyrosine 705, dans les lignées cellulaires de carcinomes coliques, accélérât la prolifération cellulaire. Pour cela, ils ont utilisé une forme constitutivement active de STAT3 créée par un dimère forcé et un mutant STAT3 pour lequel le résidu tyrosine 705 est muté en phénylalanine. Cet effet a été retrouvé dans d'autres types cellulaires comme le glioblastome (Rahaman *et al.* 2002). Cependant, cet effet n'est pas universel, parce qu'en réalisant les mêmes expériences dans des lignées tumorales mammaires, ils n'ont pas observé d'augmentation du cycle cellulaire.

Cette prolifération est la conséquence de l'activation de l'expression de VEGF, de Cycline D1 et de c-Myc par le facteur de transcription STAT3 lorsqu'il est phosphorylé sur son résidu tyrosine 705. Il a également été montré que p-STAT3 réprime l'expression des gènes Bcl-XL et Mcl-1. De cette manière STAT3 peut réguler la croissance tumorale et la formation de métastases en régulant l'expression des gènes impliqués dans l'invasion tumorale, l'angiogenèse, le cycle cellulaire et la survie cellulaire dans le cancer colorectal (Kusaba, Nakayama *et al.* 2005). L'équipe de Sekine a étudié, dans un groupe de 108 patients présentant un adénocarcinome colorectal, l'expression de la phosphorylation du résidu tyrosine 705 de STAT3 par immunohistochimie sur des coupes de tissus. Ils ont observé que STAT3 était un marqueur de mauvais pronostic car son expression a été corrélée à l'invasion tumorale (Kusaba, Nakayama *et al.* 2006).

Nous avons observé, dans des tumeurs colorectales de différents grades, que STAT3 est phosphorylé sur son résidu sérine 727 dès le stade précoce du cancer colorectal. De plus, nous avons remarqué que STAT3 est également phosphorylé sur son résidu tyrosine 705 à ces mêmes stades. Ces observations ont été effectuées par un marquage immunohistochimique des deux formes phosphorylées de STAT3. Cependant, nous ne savons pas si nous avons une population hétérogène constituée de STAT3 uniquement phosphorylé sur son résidu tyrosine 705 ou sur son résidu sérine 727 ou bien si STAT3 présente les deux phosphorylations.

Nous avons montré, dans la deuxième partie de ce travail, que STAT3 phosphorylé sur son résidu sérine 727 pouvait être impliqué dans la phase G2 du cycle cellulaire et l'instabilité génétique. Nous savons que l'instabilité génétique est un trait majeur du cancer colorectal. Nous pouvons alors émettre l'hypothèse que la phosphorylation du résidu sérine 727 reflèterait l'instabilité génétique de la tumeur. Cependant, STAT3 phosphorylé sur la tyrosine 705 reflète, dans le cancer colorectal, une prolifération excessive.

Par conséquent, la présence de STAT3 doublement positif pour les deux phosphorylations serait un marqueur de très mauvais pronostic parce qu'il reflèterait une prolifération excessive de cellules présentant une instabilité génétique. Cet état pourrait être détecté par la technique Olink BIOSCIENCE® sur des coupes de tissus (Soderberg *et al.* 2006). Cette méthode est basée sur la détection d'une interaction entre deux protéines. Les deux protéines sont reconnues par deux anticorps spécifiques et d'espèces différentes. Dans notre étude, les anticorps seraient dirigés contre les deux formes phosphorylées de STAT3. Puis les deux anticorps sont chacun reconnus par une sonde spécifique. Les deux sondes sont alors liées par une séquence d'oligonucléotides qui est amplifiée sous forme de cercles roulants. Enfin, des sondes fluorescentes s'hybrident avec la séquence amplifiée. De cette manière, nous pourrions savoir, sur des coupes de tissus, si la tumeur

Discussion

est hétérogène et si elle possède un dimère STAT3 constitué des deux phosphorylations tyrosine 705 et sérine 727. Ceci permettrait d'établir un facteur pronostic pour le patient et adapter un nouveau traitement différent et plus efficace.

CONCLUSION GÉNÉRALE

~

L'oncogène STAT3 est connu pour jouer un rôle important dans la transformation d'une cellule normale en une cellule tumorale.

L'ensemble de ces travaux, présentés dans ce manuscrit, ont mis en évidence que le facteur de transcription, phosphorylé sur son résidu sérine 727, est également impliqué dans la voie de réparation des dommages de l'ADN en réponse à un traitement génotoxique mais également dans la progression de la phase G2 du cycle cellulaire vers la mitose. L'étude immunohistochimique a révélé que cette modification post-traductionnelle était présente dès les stades précoces du cancer colorectal.

Il serait intéressant, par la suite, de généraliser le rôle de cette phosphorylation sur le résidu sérine 727 dans l'activation des gènes impliqués dans la recombinaison homologe et dans l'instabilité génétique. De cette manière, l'oncogène STAT3 serait un élément de stratification des tumeurs mais également un marqueur d'agressivité tumorale responsable de la résistance au traitement.

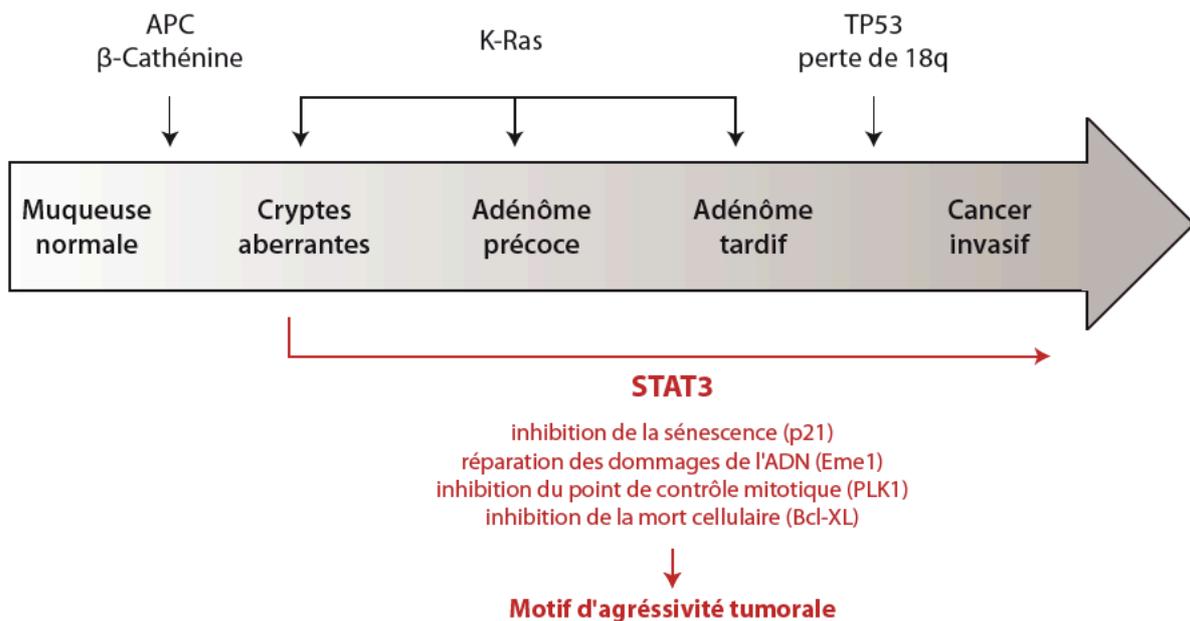


FIGURE 46 | L'oncogène STAT3 comme motif d'agressivité tumorale dans le cancer colorectal

BIBLIOGRAPHIE

A

- Adams, J. M. and S. Cory (1998). "The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival." *Science* **281** (5381): 1322-1326.
- Al Zaid Siddiquee, K. and J. Turkson (2008). "STAT3 as a target for inducing apoptosis in solid and hematological tumors." *Cell Res* **18**(2): 254-267.
- Aoki, Y., G. M. Feldman and G. Tosato (2003). "Inhibition of STAT3 signaling induces apoptosis and decreases survivin expression in primary effusion lymphoma." *Blood* **101**(4): 1535-1542.
- Arbouzova, N. I. and M. P. Zeidler (2006). "JAK/STAT signalling in Drosophila: insights into conserved regulatory and cellular functions." *Development* **133**(14): 2605-2616.
- Azare, J., K. Leslie, H. Al-Ahmadie, W. Gerald, P. H. Weinreb, S. M. Violette and J. Bromberg (2007). "Constitutively activated Stat3 induces tumorigenesis and enhances cell motility of prostate epithelial cells through integrin beta 6." *Mol Cell Biol* **27**(12): 4444-4453.
- Aziz, M. H., B. B. Hafeez, J. M. Sand, D. B. Pierce, S. W. Aziz, N. E. Dreckschmidt and A. K. Verma (2010). "Protein kinase C ϵ mediates Stat3Ser727 phosphorylation, Stat3-regulated gene expression, and cell invasion in various human cancer cell lines through integration with MAPK cascade (RAF-1, MEK1/2, and ERK1/2)." *Oncogene* **29**(21): 3100-3109.

B

- Bacon, K. B., B. A. Premack, P. Gardner and T. J. Schall (1995). "Activation of dual T cell signaling pathways by the chemokine RANTES." *Science* **269**(5231): 1727-1730.
- Ban, R., H. Matsuzaki, T. Akashi, G. Sakashita, H. Taniguchi, S. Y. Park, H. Tanaka, K. Furukawa and T. Urano (2009). "Mitotic regulation of the stability of microtubule plus-end tracking protein EB3 by ubiquitin ligase SIAH-1 and Aurora mitotic kinases." *J Biol Chem* **284**(41): 28367-28381.
- Bandyopadhyay, S. K., D. V. Kalvakolanu and G. C. Sen (1990). "Gene induction by interferons: functional complementation between trans-acting factors induced by alpha interferon and gamma interferon." *Mol Cell Biol* **10**(10): 5055-5063.
- Bartek, J. and J. Lukas (2003). "Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer." *Cancer Cell* **3** (5): 421-429.
- Barre, B., S. Avril and O. Coqueret (2003). "Opposite regulation of myc and p21waf1 transcription by STAT3 proteins." *J Biol Chem* **278**(5): 2990-2996.
- Barre, B., O. Coqueret and N. D. Perkins (2010). "Regulation of activity and function of the p52 NF-kappaB subunit following DNA damage." *Cell Cycle* **9**(24): 4795-4804.
- Barre, B., A. Vigneron and O. Coqueret (2005). "The STAT3 transcription factor is a target for the Myc and riboblastoma proteins on the Cdc25A promoter." *J Biol Chem* **280**(16): 15673-15681.
- Barry, S. P., P. A. Townsend, R. A. Knight, T. M. Scarabelli, D. S. Latchman and A. Stephanou (2010). "STAT3 modulates the DNA damage response pathway." *Int J Exp Pathol* **91**(6): 506-514.
- Benkhart, E. M., M. Siedlar, A. Wedel, T. Werner and H. W. Ziegler-Heitbrock (2000). "Role of Stat3 in lipopolysaccharide-induced IL-10 gene expression." *J Immunol* **165**(3): 1612-1617.

- Bergers, G. and L. E. Benjamin (2003). "Tumorigenesis and the angiogenic switch." Nat Rev Cancer **3** (6): 401-410.
- Bhattacharya, S., R. Eckner, S. Grossman, E. Oldread, Z. Arany, A. D'Andrea and D. M. Livingston (1996). "Cooperation of Stat2 and p300/CBP in signalling induced by interferon-alpha." Nature **383**(6598): 344-347.
- Bhattacharya, S., R. M. Ray and L. R. Johnson (2005). "STAT3-mediated transcription of Bcl-2, Mcl-1 and c-IAP2 prevents apoptosis in polyamine-depleted cells." Biochem J **392**(Pt 2): 335-344.
- Brasher, S. V., B. O. Smith, R. H. Fogh, D. Nietlispach, A. Thiru, P. R. Nielsen, R. W. Broadhurst, L. J. Ball, N. V. Murzina and E. D. Laue (2000). "The structure of mouse HP1 suggests a unique mode of single peptide recognition by the shadow chromo domain dimer." EMBO J **19**(7): 1587-1597.
- Bromberg, J. (2002). "Stat proteins and oncogenesis." J Clin Invest **109**(9): 1139-1142.
- Bromberg, J. F. (2001). "Activation of STAT proteins and growth control." Bioessays **23**(2): 161-169.
- Bromberg, J. F., C. M. Horvath, D. Besser, W. W. Lathem and J. E. Darnell, Jr. (1998). "Stat3 activation is required for cellular transformation by v-src." Mol Cell Biol **18**(5): 2553-2558.
- Bromberg, J. F., M. H. Wrzeszczynska, G. Devgan, Y. Zhao, R. G. Pestell, C. Albanese and J. E. Darnell, Jr. (1999). "Stat3 as an oncogene." Cell **98**(3): 295-303.
- Burma, S., B. P. Chen, M. Murphy, A. Kurimasa and D. J. Chen (2001). "ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks." J Biol Chem **276**(45): 42462-42467.

C

- Caldenhoven, E., T. B. van Dijk, R. Solari, J. Armstrong, J. A. Raaijmakers, J. W. Lammers, L. Koenderman and R. P. de Groot (1996). "STAT3beta, a splice variant of transcription factor STAT3, is a dominant negative regulator of transcription." J Biol Chem **271**(22): 13221-13227.
- Cao, X., A. Tay, G. R. Guy and Y. H. Tan (1996). "Activation and association of Stat3 with Src in v-Src-transformed cell lines." Mol Cell Biol **16**(4): 1595-1603.
- Castiel, A., M. M. Danieli, A. David, S. Moshkovitz, P. D. Aplan, I. R. Kirsch, M. Brandeis, A. Kramer and S. Izraeli (2011). "The Stil protein regulates centrosome integrity and mitosis through suppression of Chfr." J Cell Sci **124**(Pt 4): 532-539.
- Catlett-Falcone, R., T. H. Landowski, M. M. Oshiro, J. Turkson, A. Levitzki, R. Savino, G. Ciliberto, L. Moscinski, J. L. Fernandez-Luna, G. Nunez, W. S. Dalton and R. Jove (1999). "Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells." Immunity **10**(1): 105-115.
- Center, M. M., A. Jemal, R. A. Smith and E. Ward (2009). "Worldwide variations in colorectal cancer." CA Cancer J Clin **59**(6): 366-378.
- Chang, W., D. Gruber, S. Chari, H. Kitazawa, Y. Hamazumi, S. Hisanaga and J. C. Bulinski (2001). "Phosphorylation of MAP4 affects microtubule properties and cell cycle progression." J Cell Sci **114**(Pt 15): 2879-2887.

- Chen, J., S. Larochelle, X. Li and B. Suter (2003). "Xpd/Ercc2 regulates CAK activity and mitotic progression." Nature **424**(6945): 228-232.
- Chen, Z. F. and R. R. Behringer (1995). "twist is required in head mesenchyme for cranial neural tube morphogenesis." Genes Dev **9**(6): 686-699.
- Chi, Y. H., K. Haller, M. D. Ward, O. J. Semmes, Y. Li and K. T. Jeang (2008). "Requirements for protein phosphorylation and the kinase activity of polo-like kinase 1 (Plk1) for the kinetochore function of mitotic arrest deficiency protein 1 (Mad1)." J Biol Chem **283**(51): 35834-35844.
- Chu, W. K. and I. D. Hickson (2009). "RecQ helicases: multifunctional genome caretakers." Nat Rev Cancer **9**(9): 644-654.
- Chun, K. S. and R. Langenbach (2011). "The prostaglandin E(2) receptor, EP2, regulates survivin expression via an EGFR/STAT3 pathway in UVB-exposed mouse skin." Mol Carcinog **50**(6): 439-448.
- Chung, C. D., J. Liao, B. Liu, X. Rao, P. Jay, P. Berta and K. Shuai (1997). "Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3." Science **278**(5344): 1803-1805.
- Chung, J., E. Uchida, T. C. Grammer and J. Blenis (1997). "STAT3 serine phosphorylation by ERK-dependent and -independent pathways negatively modulates its tyrosine phosphorylation." Mol Cell Biol **17**(11): 6508-6516.
- Cimica, V., H. C. Chen, J. K. Iyer and N. C. Reich (2011). "Dynamics of the STAT3 transcription factor: nuclear import dependent on Ran and importin-beta1." PLoS One **6**(5): e20188.
- Cimprich, K. A. and D. Cortez (2008). "ATR: an essential regulator of genome integrity." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(8): 616-627.
- Coffin, J. M., M. Champion and F. Chabot (1978). "Nucleotide sequence relationships between the genomes of an endogenous and an exogenous avian tumor virus." J Virol **28**(3): 972-991.
- Collis, S. J., T. L. DeWeese, P. A. Jeggo and A. R. Parker (2005). "The life and death of DNA-PK." Oncogene **24**(6): 949-961.
- Collum, R. G., S. Brutsaert, G. Lee and C. Schindler (2000). "A Stat3-interacting protein (StIP1) regulates cytokine signal transduction." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(18): 10120-10125.
- Conaway, J. W., T. Kamura and R. C. Conaway (1998). "The Elongin BC complex and the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein." Biochim Biophys Acta **1377**(2): M49-54.
- Constantinescu, S. N., M. Girardot and C. Pecquet (2008). "Mining for JAK-STAT mutations in cancer." Trends Biochem Sci **33**(3): 122-131.
- Copeland, N. G., D. J. Gilbert, C. Schindler, Z. Zhong, Z. Wen, J. E. Darnell, Jr., A. L. Mui, A. Miyajima, F. W. Quelle, J. N. Ihle and et al. (1995). "Distribution of the mammalian Stat gene family in mouse chromosomes." Genomics **29**(1): 225-228.
- Corvinus, F. M., C. Orth, R. Moriggl, S. A. Tsareva, S. Wagner, E. B. Pfitzner, D. Baus, R. Kaufmann, L. A. Huber, K. Zatloukal, H. Beug, P. Ohlschlager, A. Schutz, K. J. Halbhuber and K. Friedrich (2005). "Persistent STAT3 activation in colon cancer is associated with enhanced cell proliferation and tumor growth." Neoplasia **7**(6): 545-555.
- Crimella, C., O. Cantoni, A. Guidarelli, C. Vantaggiato, A. Martinuzzi, M. Fiorani, C. Azzolini, G. Orso, N. Bresolin and M. T. Bassi (2011). "A novel nonsense mutation in the APTX gene associated with delayed DNA single-strand break removal fails to enhance sensitivity to different genotoxic agents." Hum Mutat **32**(4): E2118-2133.

Crocker, B. A., H. Kiu and S. E. Nicholson (2008). "SOCS regulation of the JAK/STAT signalling pathway." Semin Cell Dev Biol **19**(4): 414-422.

Cunningham, D., Y. Humblet, S. Siena, D. Khayat, H. Bleiberg, A. Santoro, D. Bets, M. Mueser, A. Harstrick, C. Verslype, I. Chau and E. Van Cutsem (2004). "Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer." N Engl J Med **351**(4): 337-345.

D

D'Angiolella, V., V. Donato, S. Vijayakumar, A. Saraf, L. Florens, M. P. Washburn, B. Dynlacht and M. Pagano (2010). "SCF(Cyclin F) controls centrosome homeostasis and mitotic fidelity through CP110 degradation." Nature **466**(7302): 138-142.

Dantuma, N. P., C. Heinen and D. Hoogstraten (2009). "The ubiquitin receptor Rad23: at the crossroads of nucleotide excision repair and proteasomal degradation." DNA Repair (Amst) **8**(4): 449-460.

Datta, S. R., H. Dudek, X. Tao, S. Masters, H. Fu, Y. Gotoh and M. E. Greenberg (1997). "Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery." Cell **91**(2): 231-241.

Dechow, T. N., L. Pedrazzini, A. Leitch, K. Leslie, W. L. Gerald, I. Linkov and J. F. Bromberg (2004). "Requirement of matrix metalloproteinase-9 for the transformation of human mammary epithelial cells by Stat3-C." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(29): 10602-10607.

Decker, T., D. J. Lew and J. E. Darnell, Jr. (1991). "Two distinct alpha-interferon-dependent signal transduction pathways may contribute to activation of transcription of the guanylate-binding protein gene." Mol Cell Biol **11**(10): 5147-5153.

Dekker, L. V. and P. J. Parker (1994). "Protein kinase C--a question of specificity." Trends Biochem Sci **19**(2): 73-77.

Dey, A., A. Nishiyama, T. Karpova, J. McNally and K. Ozato (2009). "Brd4 marks select genes on mitotic chromatin and directs postmitotic transcription." Mol Biol Cell **20**(23): 4899-4909.

Dionne, M. A., L. Howard and D. A. Compton (1999). "NuMA is a component of an insoluble matrix at mitotic spindle poles." Cell Motil Cytoskeleton **42**(3): 189-203.

Dhavan, R. and L. H. Tsai (2001). "A decade of CDK5." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(10): 749-759.

E

Ekas, L. A., T. J. Cardozo, M. S. Flaherty, E. A. McMillan, F. C. Gonsalves and E. A. Bach (2010). "Characterization of a dominant-active STAT that promotes tumorigenesis in *Drosophila*." Dev Biol **344**(2): 621-636.

Ekert, P. G., S. H. Read, J. Silke, V. S. Marsden, H. Kaufmann, C. J. Hawkins, R. Gerl, S. Kumar and D. L. Vaux (2004). "Apaf-1 and caspase-9 accelerate apoptosis, but do not determine whether factor-deprived or drug-treated cells die." J Cell Biol **165**(6): 835-842.

- Elias, M. C., K. R. Tozer, J. R. Silber, S. Mikheeva, M. Deng, R. S. Morrison, T. C. Manning, D. L. Silbergeld, C. A. Glackin, T. A. Reh and R. C. Rostomily (2005). "TWIST is expressed in human gliomas and promotes invasion." Neoplasia **7**(9): 824-837.
- Erez, A., A. Castiel, L. Trakhtenbrot, M. Perelman, E. Rosenthal, I. Goldstein, N. Stettner, A. Harmelin, H. Eldar-Finkelman, S. Campaner, I. Kirsch and S. Izraeli (2007). "The SIL gene is essential for mitotic entry and survival of cancer cells." Cancer Res **67**(9): 4022-4027.

F

- Fearnley, I. M., J. Carroll, R. J. Shannon, M. J. Runswick, J. E. Walker and J. Hirst (2001). "GRIM-19, a cell death regulatory gene product, is a subunit of bovine mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I)." J Biol Chem **276**(42): 38345-38348.
- Feron, O. (2009). "Pyruvate into lactate and back: from the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells." Radiother Oncol **92**(3): 329-333.
- Friedberg, E. C. (2001). "How nucleotide excision repair protects against cancer." Nat Rev Cancer **1**(1): 22-33.
- Fu, A. K., W. Y. Fu, A. K. Ng, W. W. Chien, Y. P. Ng, J. H. Wang and N. Y. Ip (2004). "Cyclin-dependent kinase 5 phosphorylates signal transducer and activator of transcription 3 and regulates its transcriptional activity." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(17): 6728-6733.
- Fu, M., C. Wang, Z. Li, T. Sakamaki and R. G. Pestell (2004). "Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions." Endocrinology **145**(12): 5439-5447.
- Fung, T. K., W. Y. Siu, C. H. Yam, A. Lau and R. Y. Poon (2002). "Cyclin F is degraded during G2-M by mechanisms fundamentally different from other cyclins." J Biol Chem **277**(38): 35140-35149.

G

- Garcia, R., T. L. Bowman, G. Niu, H. Yu, S. Minton, C. A. Muro-Cacho, C. E. Cox, R. Falcone, R. Fairclough, S. Parsons, A. Laudano, A. Gazit, A. Levitzki, A. Kraker and R. Jove (2001). "Constitutive activation of Stat3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells." Oncogene **20**(20): 2499-2513.
- Gatei, M., B. Jakob, P. Chen, A. W. Kijas, O. J. Becherel, N. Gueven, G. Birrell, J. H. Lee, T. T. Paull, Y. Lerenthal, S. Fazry, G. Taucher-Scholz, R. Kalb, D. Schindler, R. Waltes, T. Doerk and M. F. Lavin (2011). "ATM-dependent phosphorylation of RAD50 regulates DNA repair and cell cycle control." J Biol Chem.
- Geiss-Friedlander, R. and F. Melchior (2007). "Concepts in sumoylation: a decade on." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(12): 947-956.
- Gerhartz, C., B. Heesel, J. Sasse, U. Hemmann, C. Landgraf, J. Schneider-Mergener, F. Horn, P. C. Heinrich and L. Graeve (1996). "Differential activation of acute phase response factor/STAT3 and STAT1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130. I. Definition of a novel phosphotyrosine motif mediating STAT1 activation." J Biol Chem **271**(22): 12991-12998.
- Germain, D. and D. A. Frank (2007). "Targeting the cytoplasmic and nuclear functions of signal transducers and activators of transcription 3 for cancer therapy." Clin Cancer Res **13**(19): 5665-5669.

- Gerner, E. W. and F. L. Meyskens, Jr. (2004). "Polyamines and cancer: old molecules, new understanding." Nat Rev Cancer **4**(10): 781-792.
- Gingras, S., J. Simard, B. Groner and E. Pfitzner (1999). "p300/CBP is required for transcriptional induction by interleukin-4 and interacts with Stat6." Nucleic Acids Res **27**(13): 2722-2729.
- Giraud, S., F. Bienvenu, S. Avril, H. Gascan, D. M. Heery and O. Coqueret (2002). "Functional interaction of STAT3 transcription factor with the coactivator NcoA/SRC1a." J Biol Chem **277**(10): 8004-8011.
- Giraud, S., A. Hurlstone, S. Avril and O. Coqueret (2004). "Implication of BRG1 and cdk9 in the STAT3-mediated activation of the p21waf1 gene." Oncogene **23**(44): 7391-7398.
- Gough, D. J., A. Corlett, K. Schlessinger, J. Wegrzyn, A. C. Larner and D. E. Levy (2009). "Mitochondrial STAT3 supports Ras-dependent oncogenic transformation." Science **324**(5935): 1713-1716.
- Gouilleux, F., H. Wakao, M. Mundt and B. Groner (1994). "Prolactin induces phosphorylation of Tyr694 of Stat5 (MGF), a prerequisite for DNA binding and induction of transcription." EMBO J **13**(18): 4361-4369.
- Grandis, J. R., S. D. Drenning, Q. Zeng, S. C. Watkins, M. F. Melhem, S. Endo, D. E. Johnson, L. Huang, Y. He and J. D. Kim (2000). "Constitutive activation of Stat3 signaling abrogates apoptosis in squamous cell carcinogenesis in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(8): 4227-4232.
- Greenlund, A. C., M. O. Morales, B. L. Viviano, H. Yan, J. Krolewski and R. D. Schreiber (1995). "Stat recruitment by tyrosine-phosphorylated cytokine receptors: an ordered reversible affinity-driven process." Immunity **2**(6): 677-687.
- Griner, E. M. and M. G. Kazanietz (2007). "Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer." Nat Rev Cancer **7**(4): 281-294.
- Gritsko, T., A. Williams, J. Turkson, S. Kaneko, T. Bowman, M. Huang, S. Nam, I. Eweis, N. Diaz, D. Sullivan, S. Yoder, S. Enkemann, S. Eschrich, J. H. Lee, C. A. Beam, J. Cheng, S. Minton, C. A. Muro-Cacho and R. Jove (2006). "Persistent activation of stat3 signaling induces survivin gene expression and confers resistance to apoptosis in human breast cancer cells." Clin Cancer Res **12**(1): 11-19.
- Gupta, S., H. Yan, L. H. Wong, S. Ralph, J. Krolewski and C. Schindler (1996). "The SH2 domains of Stat1 and Stat2 mediate multiple interactions in the transduction of IFN-alpha signals." EMBO J **15**(5): 1075-1084.
- 
- Hagihara, K., T. Nishikawa, Y. Sugamata, J. Song, T. Isobe, T. Taga and K. Yoshizaki (2005). "Essential role of STAT3 in cytokine-driven NF-kappaB-mediated serum amyloid A gene expression." Genes Cells **10**(11): 1051-1063.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.
- Haspel, R. L., M. Salditt-Georgieff and J. E. Darnell, Jr. (1996). "The rapid inactivation of nuclear tyrosine phosphorylated Stat1 depends upon a protein tyrosine phosphatase." EMBO J **15**(22): 6262-6268.

- He, H., F. X. Yu, C. Sun and Y. Luo (2011). "CBP/p300 and SIRT1 Are Involved in Transcriptional Regulation of S-Phase Specific Histone Genes." PLoS One **6**(7): e22088.
- Heim, M. H., I. M. Kerr, G. R. Stark and J. E. Darnell, Jr. (1995). "Contribution of STAT SH2 groups to specific interferon signaling by the Jak-STAT pathway." Science **267**(5202): 1347-1349.
- Ho, J. M., B. K. Beattie, J. A. Squire, D. A. Frank and D. L. Barber (1999). "Fusion of the ets transcription factor TEL to Jak2 results in constitutive Jak-Stat signaling." Blood **93**(12): 4354-4364.
- Hofmann, E. R., M. Boyanapalli, D. J. Lindner, X. Weihua, B. A. Hassel, R. Jagus, P. L. Gutierrez and D. V. Kalvakolanu (1998). "Thioredoxin reductase mediates cell death effects of the combination of beta interferon and retinoic acid." Mol Cell Biol **18**(11): 6493-6504.
- Holloway, J. K., S. Mohan, G. Balmus, X. Sun, A. Modzelewski, P. L. Borst, R. Freire, R. S. Weiss and P. E. Cohen (2011). "Mammalian BTBD12 (SLX4) protects against genomic instability during mammalian spermatogenesis." PLoS Genet **7**(6): e1002094.
- Honda, R., R. Korner and E. A. Nigg (2003). "Exploring the functional interactions between Aurora B, INCENP, and survivin in mitosis." Mol Biol Cell **14**(8): 3325-3341.
- Horvath, C. M. (2000). "STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals." Trends Biochem Sci **25**(10): 496-502.
- Horvath, C. M., G. R. Stark, I. M. Kerr and J. E. Darnell, Jr. (1996). "Interactions between STAT and non-STAT proteins in the interferon-stimulated gene factor 3 transcription complex." Mol Cell Biol **16**(12): 6957-6964.
- Horvath, C. M., Z. Wen and J. E. Darnell, Jr. (1995). "A STAT protein domain that determines DNA sequence recognition suggests a novel DNA-binding domain." Genes Dev **9**(8): 984-994.
- Hou, J., U. Schindler, W. J. Henzel, T. C. Ho, M. Bresseur and S. L. McKnight (1994). "An interleukin-4-induced transcription factor: IL-4 Stat." Science **265**(5179): 1701-1706.
- Hou, S. X., Z. Zheng, X. Chen and N. Perrimon (2002). "The Jak/STAT pathway in model organisms: emerging roles in cell movement." Dev Cell **3**(6): 765-778.
- Hou, T., S. Ray, C. Lee and A. R. Brasier (2008). "The STAT3 NH2-terminal domain stabilizes enhanceosome assembly by interacting with the p300 bromodomain." J Biol Chem **283**(45): 30725-30734.
- Huang, D. C. and A. Strasser (2000). "BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death." Cell **103**(6): 839-842.
- Huang, E., D. Qu and D. S. Park (2010). "Cdk5: Links to DNA damage." Cell Cycle **9**(16): 3142-3143.
- Hynes, N. E. and G. MacDonald (2009). "ErbB receptors and signaling pathways in cancer." Curr Opin Cell Biol **21**(2): 177-184.

1

- Ihle, J. N. (1996). "STATs: signal transducers and activators of transcription." Cell **84**(3): 331-334.

Ivanov, V. N., A. Bhoumik, M. Krasilnikov, R. Raz, L. B. Owen-Schaub, D. Levy, C. M. Horvath and Z. Ronai (2001). "Cooperation between STAT3 and c-jun suppresses Fas transcription." Mol Cell **7**(3): 517-528.

J

Jain, N., T. Zhang, W. H. Kee, W. Li and X. Cao (1999). "Protein kinase C delta associates with and phosphorylates Stat3 in an interleukin-6-dependent manner." J Biol Chem **274**(34): 24392-24400.

Jemal, A., F. Bray, M. M. Center, J. Ferlay, E. Ward and D. Forman (2011). "Global cancer statistics." CA Cancer J Clin **61**(2): 69-90.

Jenuwein, T. and C. D. Allis (2001). "Translating the histone code." Science **293**(5532): 1074-1080.

K

Kallunki, T., T. Deng, M. Hibi and M. Karin (1996). "c-Jun can recruit JNK to phosphorylate dimerization partners via specific docking interactions." Cell **87**(5): 929-939.

Kastan, M. B. and D. S. Lim (2000). "The many substrates and functions of ATM." Nat Rev Mol Cell Biol **1**(3): 179-186.

Kim, D. J., M. L. Tremblay and J. Digiovanni (2010). "Protein tyrosine phosphatases, TC-PTP, SHP1, and SHP2, cooperate in rapid dephosphorylation of Stat3 in keratinocytes following UVB irradiation." PLoS One **5**(4): e10290.

Kim, T. K. and T. Maniatis (1996). "Regulation of interferon-gamma-activated STAT1 by the ubiquitin-proteasome pathway." Science **273**(5282): 1717-1719.

Kiuchi, N., K. Nakajima, M. Ichiba, T. Fukada, M. Narimatsu, K. Mizuno, M. Hibi and T. Hirano (1999). "STAT3 is required for the gp130-mediated full activation of the c-myc gene." J Exp Med **189**(1): 63-73.

Kong, X., Y. Shen, N. Jiang, X. Fei and J. Mi (2011). "Emerging roles of DNA-PK besides DNA repair." Cell Signal **23**(8): 1273-1280.

Konnikova, L., M. C. Simeone, M. M. Kruger, M. Kotecki and B. H. Cochran (2005). "Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) regulates human telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression in human cancer and primary cells." Cancer Res **65**(15): 6516-6520.

Kumanovics, A., S. L. Perkins, H. Gilbert, M. H. Cessna, N. H. Augustine and H. R. Hill (2010). "Diffuse large B cell lymphoma in hyper-IgE syndrome due to STAT3 mutation." J Clin Immunol **30**(6): 886-893.

Kunigal, S., S. S. Lakka, P. K. Sodadasu, N. Estes and J. S. Rao (2009). "Stat3-siRNA induces Fas-mediated apoptosis in vitro and in vivo in breast cancer." Int J Oncol **34**(5): 1209-1220.

Kusaba, T., T. Nakayama, K. Yamazumi, Y. Yakata, A. Yoshizaki, K. Inoue, T. Nagayasu and I. Sekine (2006). "Activation of STAT3 is a marker of poor prognosis in human colorectal cancer." Oncol Rep **15**(6): 1445-1451.

- Kusaba, T., T. Nakayama, K. Yamazumi, Y. Yakata, A. Yoshizaki, T. Nagayasu and I. Sekine (2005). "Expression of p-STAT3 in human colorectal adenocarcinoma and adenoma; correlation with clinicopathological factors." J Clin Pathol **58**(8): 833-838.
- Kwok, W. K., M. T. Ling, T. W. Lee, T. C. Lau, C. Zhou, X. Zhang, C. W. Chua, K. W. Chan, F. L. Chan, C. Glackin, Y. C. Wong and X. Wang (2005). "Up-regulation of TWIST in prostate cancer and its implication as a therapeutic target." Cancer Res **65**(12): 5153-5162.
- Kyo, S., J. Sakaguchi, S. Ohno, Y. Mizumoto, Y. Maida, M. Hashimoto, M. Nakamura, M. Takakura, M. Nakajima, K. Masutomi and M. Inoue (2006). "High Twist expression is involved in infiltrative endometrial cancer and affects patient survival." Hum Pathol **37**(4): 431-438.
- L
- Lacronique, V., A. Boureux, V. D. Valle, H. Poirel, C. T. Quang, M. Mauchauffe, C. Berthou, M. Lessard, R. Berger, J. Ghysdael and O. A. Bernard (1997). "A TEL-JAK2 fusion protein with constitutive kinase activity in human leukemia." Science **278**(5341): 1309-1312.
- Laoukili, J., M. R. Kooistra, A. Bras, J. Kauw, R. M. Kerkhoven, A. Morrison, H. Clevers and R. H. Medema (2005). "FoxM1 is required for execution of the mitotic programme and chromosome stability." Nat Cell Biol **7**(2): 126-136.
- Lee, C. W., C. M. Raskett, I. Prudovsky and D. C. Altieri (2008). "Molecular dependence of estrogen receptor-negative breast cancer on a notch-survivin signaling axis." Cancer Res **68**(13): 5273-5281.
- Lee, J. L., M. J. Wang and J. Y. Chen (2009). "Acetylation and activation of STAT3 mediated by nuclear translocation of CD44." J Cell Biol **185**(6): 949-957.
- Lehmann, A. R. (2008). "XPD structure reveals its secrets." DNA Repair (Amst) **7**(11): 1912-1915.
- Lengauer, C., K. W. Kinzler and B. Vogelstein (1997). "Genetic instability in colorectal cancers." Nature **386**(6625): 623-627.
- Letai, A., M. C. Bassik, L. D. Walensky, M. D. Sorcinelli, S. Weiler and S. J. Korsmeyer (2002). "Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics." Cancer Cell **2**(3): 183-192.
- Levy, D. E., D. S. Kessler, R. Pine and J. E. Darnell, Jr. (1989). "Cytoplasmic activation of ISGF3, the positive regulator of interferon-alpha-stimulated transcription, reconstituted in vitro." Genes Dev **3**(9): 1362-1371.
- Levy, D. E., D. S. Kessler, R. Pine, N. Reich and J. E. Darnell, Jr. (1988). "Interferon-induced nuclear factors that bind a shared promoter element correlate with positive and negative transcriptional control." Genes Dev **2**(4): 383-393.
- Lewis, R. S. and A. C. Ward (2004). "Conservation, duplication and divergence of the zebrafish stat5 genes." Gene **338**(1): 65-74.
- Li, H. H., C. S. Chiang, H. Y. Huang and G. J. Liaw (2009). "Mars and Tosl-like kinase act in parallel to ensure chromosome fidelity in Drosophila." J Biomed Sci **16**: 51.

- Li Lin, A. L., Zhengang Peng, Huey-Jen Lin, Pui-Kai Li, Chenglong Li, and Jiayuh and B. H. Lin (2011). "STAT3 is necessary for proliferation and survival in colon cancer-initiating cells." Cancer Res.
- Lim, C. P. and X. Cao (1999). "Serine phosphorylation and negative regulation of Stat3 by JNK." J Biol Chem **274**(43): 31055-31061.
- Lim, C. P. and X. Cao (2001). "Regulation of Stat3 activation by MEK kinase 1." J Biol Chem **276**(24): 21004-21011.
- Lim, H. H. and U. Surana (2003). "Tome-1, wee1, and the onset of mitosis: coupled destruction for timely entry." Mol Cell **11**(4): 845-846.
- Lindsten, T., A. J. Ross, A. King, W. X. Zong, J. C. Rathmell, H. A. Shiels, E. Ulrich, K. G. Waymire, P. Mahar, K. Frauwirth, Y. Chen, M. Wei, V. M. Eng, D. M. Adelman, M. C. Simon, A. Ma, J. A. Golden, G. Evan, S. J. Korsmeyer, G. R. MacGregor and C. B. Thompson (2000). "The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues." Mol Cell **6**(6): 1389-1399.
- Liu, H., Y. Ma, S. M. Cole, C. Zander, K. H. Chen, J. Karras and R. M. Pope (2003). "Serine phosphorylation of STAT3 is essential for Mcl-1 expression and macrophage survival." Blood **102**(1): 344-352.
- Lo, H. W., S. C. Hsu, W. Xia, X. Cao, J. Y. Shih, Y. Wei, J. L. Abbruzzese, G. N. Hortobagyi and M. C. Hung (2007). "Epidermal growth factor receptor cooperates with signal transducer and activator of transcription 3 to induce epithelial-mesenchymal transition in cancer cells via up-regulation of TWIST gene expression." Cancer Res **67**(19): 9066-9076.
- Lu, Z., S. Ghosh, Z. Wang and T. Hunter (2003). "Downregulation of caveolin-1 function by EGF leads to the loss of E-cadherin, increased transcriptional activity of beta-catenin, and enhanced tumor cell invasion." Cancer Cell **4**(6): 499-515.
- Lufei, C., T. H. Koh, T. Uchida and X. Cao (2007). "Pin1 is required for the Ser727 phosphorylation-dependent Stat3 activity." Oncogene **26**(55): 7656-7664.
- Lufei, C., J. Ma, G. Huang, T. Zhang, V. Novotny-Diermayr, C. T. Ong and X. Cao (2003). "GRIM-19, a death-regulatory gene product, suppresses Stat3 activity via functional interaction." EMBO J **22**(6): 1325-1335.
- Luger, K., A. W. Mader, R. K. Richmond, D. F. Sargent and T. J. Richmond (1997). "Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution." Nature **389**(6648): 251-260.

M

- Ma, J. and X. Cao (2006). "Regulation of Stat3 nuclear import by importin alpha5 and importin alpha7 via two different functional sequence elements." Cell Signal **18**(8): 1117-1126.
- Ma, J., T. Zhang, V. Novotny-Diermayr, A. L. Tan and X. Cao (2003). "A novel sequence in the coiled-coil domain of Stat3 essential for its nuclear translocation." J Biol Chem **278**(31): 29252-29260.
- Ma, X. T., S. Wang, Y. J. Ye, R. Y. Du, Z. R. Cui and M. Somsouk (2004). "Constitutive activation of Stat3 signaling pathway in human colorectal carcinoma." World J Gastroenterol **10**(11): 1569-1573.

- Majello, B., G. Napolitano, A. Giordano and L. Lania (1999). "Transcriptional regulation by targeted recruitment of cyclin-dependent CDK9 kinase in vivo." Oncogene **18**(32): 4598-4605.
- Major, M. L., R. Lepe and R. H. Costa (2004). "Forkhead box M1B transcriptional activity requires binding of Cdk-cyclin complexes for phosphorylation-dependent recruitment of p300/CBP coactivators." Mol Cell Biol **24**(7): 2649-2661.
- Mao, D. and P. W. Hinds (2010). "p35 is required for CDK5 activation in cellular senescence." J Biol Chem **285**(19): 14671-14680.
- Marani, M., T. Teney, D. Hancock, J. Downward and N. R. Lemoine (2002). "Identification of novel isoforms of the BH3 domain protein Bim which directly activate Bax to trigger apoptosis." Mol Cell Biol **22**(11): 3577-3589.
- Maritano, D., M. L. Sugrue, S. Tininini, S. Dewilde, B. Strobl, X. Fu, V. Murray-Tait, R. Chiarle and V. Poli (2004). "The STAT3 isoforms alpha and beta have unique and specific functions." Nat Immunol **5**(4): 401-409.
- Marti, T. M., C. Kunz and O. Fleck (2002). "DNA mismatch repair and mutation avoidance pathways." J Cell Physiol **191**(1): 28-41.
- Masai, H. (2011). "RecQL4: a helicase linking formation and maintenance of a replication fork." J Biochem **149**(6): 629-631.
- Masuda, M., H. Y. Ruan, A. Ito, T. Nakashima, S. Toh, T. Wakasaki, R. Yasumatsu, Y. Kutratomi, S. Komune and I. B. Weinstein (2007). "Signal transducers and activators of transcription 3 up-regulates vascular endothelial growth factor production and tumor angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma." Oral Oncol **43**(8): 785-790.
- Masutomi, K., E. Y. Yu, S. Khurts, I. Ben-Porath, J. L. Currier, G. B. Metz, M. W. Brooks, S. Kaneko, S. Murakami, J. A. DeCaprio, R. A. Weinberg, S. A. Stewart and W. C. Hahn (2003). "Telomerase maintains telomere structure in normal human cells." Cell **114**(2): 241-253.
- Mayer, B. J., P. K. Jackson, R. A. Van Etten and D. Baltimore (1992). "Point mutations in the abl SH2 domain coordinately impair phosphotyrosine binding in vitro and transforming activity in vivo." Mol Cell Biol **12**(2): 609-618.
- Meyer, T. and U. Vinkemeier (2004). "Nucleocytoplasmic shuttling of STAT transcription factors." Eur J Biochem **271**(23-24): 4606-4612.
- Minegishi, Y., M. Saito, S. Tsuchiya, I. Tsuge, H. Takada, T. Hara, N. Kawamura, T. Ariga, S. Pasic, O. Stojkovic, A. Metin and H. Karasuyama (2007). "Dominant-negative mutations in the DNA-binding domain of STAT3 cause hyper-IgE syndrome." Nature **448**(7157): 1058-1062.
- Mochizuki, T., C. Kitanaka, K. Noguchi, T. Muramatsu, A. Asai and Y. Kuchino (1999). "Physical and functional interactions between Pim-1 kinase and Cdc25A phosphatase. Implications for the Pim-1-mediated activation of the c-Myc signaling pathway." J Biol Chem **274**(26): 18659-18666.
- Motoyama, N., F. Wang, K. A. Roth, H. Sawa, K. Nakayama, I. Negishi, S. Senju, Q. Zhang, S. Fujii and et al. (1995). "Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice." Science **267**(5203): 1506-1510.

N

- Nagata, S. and P. Golstein (1995). "The Fas death factor." Science **267**(5203): 1449-1456.
- Nakajima, H., P. K. Brindle, M. Handa and J. N. Ihle (2001). "Functional interaction of STAT5 and nuclear receptor co-repressor SMRT: implications in negative regulation of STAT5-dependent transcription." EMBO J **20**(23): 6836-6844.
- Nakajima, K., Y. Yamanaka, K. Nakae, H. Kojima, M. Ichiba, N. Kiuchi, T. Kitaoka, T. Fukada, M. Hibi and T. Hirano (1996). "A central role for Stat3 in IL-6-induced regulation of growth and differentiation in M1 leukemia cells." EMBO J **15**(14): 3651-3658.
- Nakayama, K., I. Negishi, K. Kuida, Y. Shinkai, M. C. Louie, L. E. Fields, P. J. Lucas, V. Stewart, F. W. Alt and et al. (1993). "Disappearance of the lymphoid system in Bcl-2 homozygous mutant chimeric mice." Science **261**(5128): 1584-1588.
- Negrini, S., V. G. Gorgoulis and T. D. Halazonetis (2010). "Genomic instability--an evolving hallmark of cancer." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(3): 220-228.
- Neupert, W. and J. M. Herrmann (2007). "Translocation of proteins into mitochondria." Annu Rev Biochem **76**: 723-749.
- Newton, A. C. (1997). "Regulation of protein kinase C." Curr Opin Cell Biol **9**(2): 161-167.
- Nielsen, S. J., R. Schneider, U. M. Bauer, A. J. Bannister, A. Morrison, D. O'Carroll, R. Firestein, M. Cleary, T. Jenuwein, R. E. Herrera and T. Kouzarides (2001). "Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters." Nature **412**(6846): 561-565.
- Nishioka, K., S. Chuikov, K. Sarma, H. Erdjument-Bromage, C. D. Allis, P. Tempst and D. Reinberg (2002). "Set9, a novel histone H3 methyltransferase that facilitates transcription by precluding histone tail modifications required for heterochromatin formation." Genes Dev **16**(4): 479-489.
- Nitta, M., M. Saijo, N. Kodo, T. Matsuda, Y. Nakatsu, H. Tamai and K. Tanaka (2000). "A novel cytoplasmic GTPase XAB1 interacts with DNA repair protein XPA." Nucleic Acids Res **28**(21): 4212-4218.

O

- Oates, A. C., A. Brownlie, S. J. Pratt, D. V. Irvine, E. C. Liao, B. H. Paw, K. J. Dorian, S. L. Johnson, J. H. Postlethwait, L. I. Zon and A. F. Wilks (1999). "Gene duplication of zebrafish JAK2 homologs is accompanied by divergent embryonic expression patterns: only jak2a is expressed during erythropoiesis." Blood **94**(8): 2622-2636.
- Oates, A. C., P. Wollberg, S. J. Pratt, B. H. Paw, S. L. Johnson, R. K. Ho, J. H. Postlethwait, L. I. Zon and A. F. Wilks (1999). "Zebrafish stat3 is expressed in restricted tissues during embryogenesis and stat1 rescues cytokine signaling in a STAT1-deficient human cell line." Dev Dyn **215**(4): 352-370.
- Olayioye, M. A., I. Beuvink, K. Horsch, J. M. Daly and N. E. Hynes (1999). "ErbB receptor-induced activation of stat transcription factors is mediated by Src tyrosine kinases." J Biol Chem **274**(24): 17209-17218.

Ookata, K., S. Hisanaga, M. Sugita, A. Okuyama, H. Murofushi, H. Kitazawa, S. Chari, J. C. Bulinski and T. Kishimoto (1997). "MAP4 is the in vivo substrate for CDC2 kinase in HeLa cells: identification of an M-phase specific and a cell cycle-independent phosphorylation site in MAP4." Biochemistry **36**(50): 15873-15883.

Opferman, J. T., A. Letai, C. Beard, M. D. Sorcinelli, C. C. Ong and S. J. Korsmeyer (2003). "Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1." Nature **426**(6967): 671-676.

ϕ

Perry, E., R. Tsruya, P. Levitsky, O. Pomp, M. Taller, S. Weisberg, W. Parris, S. Kulkarni, H. Malovani, T. Pawson, S. Shpungin and U. Nir (2004). "TMF/ARA160 is a BC-box-containing protein that mediates the degradation of Stat3." Oncogene **23**(55): 8908-8919.

Petkovic, M., T. Dietschy, R. Freire, R. Jiao and I. Stagljär (2005). "The human Rothmund-Thomson syndrome gene product, RECQL4, localizes to distinct nuclear foci that coincide with proteins involved in the maintenance of genome stability." J Cell Sci **118**(Pt 18): 4261-4269.

Pickart, C. M. (2001). "Mechanisms underlying ubiquitination." Annu Rev Biochem **70**: 503-533.

Pilati, C., M. Amessou, M. P. Bihl, C. Balabaud, J. T. Nhieu, V. Paradis, J. C. Nault, T. Izard, P. Bioulac-Sage, G. Couchy, K. Poussin and J. Zucman-Rossi (2011). "Somatic mutations activating STAT3 in human inflammatory hepatocellular adenomas." J Exp Med **208**(7): 1359-1366.

Pinskaya, M., S. Gourvennec and A. Morillon (2009). "H3 lysine 4 di- and tri-methylation deposited by cryptic transcription attenuates promoter activation." EMBO J **28**(12): 1697-1707.

Pommier, Y. (2006). "Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond." Nat Rev Cancer **6**(10): 789-802.

Pranada, A. L., S. Metz, A. Herrmann, P. C. Heinrich and G. Muller-Newen (2004). "Real time analysis of STAT3 nucleocytoplasmic shuttling." J Biol Chem **279**(15): 15114-15123.

Print, C. G., K. L. Loveland, L. Gibson, T. Meehan, A. Stylianou, N. Wreford, D. de Kretser, D. Metcalf, F. Kontgen, J. M. Adams and S. Cory (1998). "Apoptosis regulator bcl-w is essential for spermatogenesis but appears otherwise redundant." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(21): 12424-12431.

Puthier, D., R. Bataille and M. Amiot (1999). "IL-6 up-regulates mcl-1 in human myeloma cells through JAK / STAT rather than ras / MAP kinase pathway." Eur J Immunol **29**(12): 3945-3950.

Q

Qin, H. R., H. J. Kim, J. Y. Kim, E. M. Hurt, G. J. Klarmann, B. T. Kawasaki, M. A. Duhagon Serrat and W. L. Farrar (2008). "Activation of signal transducer and activator of transcription 3 through a phosphomimetic serine 727 promotes prostate tumorigenesis independent of tyrosine 705 phosphorylation." Cancer Res **68**(19): 7736-7741.

Radulescu, A. E. and D. W. Cleveland (2010). "NuMA after 30 years: the matrix revisited." Trends Cell Biol **20**(4): 214-222.

- Rahaman, S. O., P. C. Harbor, O. Chernova, G. H. Barnett, M. A. Vogelbaum and S. J. Haque (2002). "Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses proliferation and induces apoptosis in glioblastoma multiforme cells." Oncogene **21**(55): 8404-8413.
- Ramieri, M. T., R. Murari, C. Botti, E. Pica, G. Zotti and P. L. Alo (2010). "Detection of HER2 amplification using the SISH technique in breast, colon, prostate, lung and ovarian carcinoma." Anticancer Res **30**(4): 1287-1292.
- Rathmell, J. C., T. Lindsten, W. X. Zong, R. M. Cinalli and C. B. Thompson (2002). "Deficiency in Bak and Bax perturbs thymic selection and lymphoid homeostasis." Nat Immunol **3**(10): 932-939.
- Ray, S., I. Boldogh and A. R. Brasier (2005). "STAT3 NH2-terminal acetylation is activated by the hepatic acute-phase response and required for IL-6 induction of angiotensinogen." Gastroenterology **129**(5): 1616-1632.
- Rebouissou, S., M. Amessou, G. Couchy, K. Poussin, S. Imbeaud, C. Pilati, T. Izard, C. Balabaud, P. Bioulac-Sage and J. Zucman-Rossi (2009). "Frequent in-frame somatic deletions activate gp130 in inflammatory hepatocellular tumours." Nature **457**(7226): 200-204.
- Reich, N. C. (2009). "STAT3 revs up the powerhouse." Sci Signal **2**(90): pe61.
- Ren, Z. and T. S. Schaefer (2002). "ErbB-2 activates Stat3 alpha in a Src- and JAK2-dependent manner." J Biol Chem **277**(41): 38486-38493.
- Ricceri, F., P. Porcedda, A. Allione, V. Turinetti, S. Polidoro, S. Guarrera, F. Rosa, F. Voglino, A. Pezzotti, V. Minieri, L. Accomasso, E. C. Rocchietti, L. Orlando, C. Giachino and G. Matullo (2011). "Involvement of MRE11A and XPA gene polymorphisms in the modulation of DNA double-strand break repair activity: A genotype-phenotype correlation study." DNA Repair (Amst).
- Rogers, R. S., C. M. Horvath and M. J. Matunis (2003). "SUMO modification of STAT1 and its role in PIAS-mediated inhibition of gene activation." J Biol Chem **278**(32): 30091-30097.
- Ross, A. J., K. G. Waymire, J. E. Moss, A. F. Parlow, M. K. Skinner, L. D. Russell and G. R. MacGregor (1998). "Testicular degeneration in Bclw-deficient mice." Nat Genet **18**(3): 251-256.
- Rouillon, C. and M. F. White (2011). "The evolution and mechanisms of nucleotide excision repair proteins." Res Microbiol **162**(1): 19-26.

S

- Salvesen, G. S. and C. S. Duckett (2002). "IAP proteins: blocking the road to death's door." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(6): 401-410.
- Scarzello, A. J., A. L. Romero-Weaver, S. G. Maher, T. D. Veenstra, M. Zhou, A. Qin, R. P. Donnelly, F. Sheikh and A. M. Gamero (2007). "A Mutation in the SH2 domain of STAT2 prolongs tyrosine phosphorylation of STAT1 and promotes type I IFN-induced apoptosis." Mol Biol Cell **18**(7): 2455-2462.
- Schaefer, T. S., L. K. Sanders and D. Nathans (1995). "Cooperative transcriptional activity of Jun and Stat3 beta, a short form of Stat3." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(20): 9097-9101.

- Schindler, C., X. Y. Fu, T. Improta, R. Aebersold and J. E. Darnell, Jr. (1992). "Proteins of transcription factor ISGF-3: one gene encodes the 91- and 84-kDa ISGF-3 proteins that are activated by interferon alpha." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(16): 7836-7839.
- Schindler, C., K. Shuai, V. R. Prezioso and J. E. Darnell, Jr. (1992). "Interferon-dependent tyrosine phosphorylation of a latent cytoplasmic transcription factor." Science **257**(5071): 809-813.
- Schuringa, J. J., H. Schepers, E. Vellenga and W. Kruijer (2001). "Ser727-dependent transcriptional activation by association of p300 with STAT3 upon IL-6 stimulation." FEBS Lett **495**(1-2): 71-76.
- Scoazec, J. Y. (2007). "[Dysplasia in glandular digestive tissues: new concepts, new classifications]." Ann Pathol **27**(6): 398-416.
- Seidel, H. M., L. H. Milocco, P. Lamb, J. E. Darnell, Jr., R. B. Stein and J. Rosen (1995). "Spacing of palindromic half sites as a determinant of selective STAT (signal transducers and activators of transcription) DNA binding and transcriptional activity." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(7): 3041-3045.
- Sertic, S., S. Pizzi, R. Cloney, A. R. Lehmann, F. Marini, P. Plevani and M. Muzi-Falconi (2011). "Human exonuclease 1 connects nucleotide excision repair (NER) processing with checkpoint activation in response to UV irradiation." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(33): 13647-13652.
- Simmons, G., J. D. Reeves, S. Hibbitts, J. T. Stine, P. W. Gray, A. E. Proudfoot and P. R. Clapham (2000). "Co-receptor use by HIV and inhibition of HIV infection by chemokine receptor ligands." Immunol Rev **177**: 112-126.
- Smith, A., S. Simanski, M. Fallahi and N. G. Ayad (2007). "Redundant ubiquitin ligase activities regulate wee1 degradation and mitotic entry." Cell Cycle **6**(22): 2795-2799.
- Soderberg, O., M. Gullberg, M. Jarvius, K. Ridderstrale, K. J. Leuchowius, J. Jarvius, K. Wester, P. Hydbring, F. Bahram, L. G. Larsson and U. Landegren (2006). "Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation." Nat Methods **3**(12): 995-1000.
- Song, G., G. Ouyang and S. Bao (2005). "The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival." J Cell Mol Med **9**(1): 59-71.
- Soreide, K., E. A. Janssen, H. Soiland, H. Korner and J. P. Baak (2006). "Microsatellite instability in colorectal cancer." Br J Surg **93**(4): 395-406.
- Stancato, L. F., M. David, C. Carter-Su, A. C. Larner and W. B. Pratt (1996). "Preassociation of STAT1 with STAT2 and STAT3 in separate signalling complexes prior to cytokine stimulation." J Biol Chem **271**(8): 4134-4137.
- Stark, G. R., Y. Wang and T. Lu (2011). "Lysine methylation of promoter-bound transcription factors and relevance to cancer." Cell Res **21**(3): 375-380.
- Starr, R. and D. J. Hilton (1999). "Negative regulation of the JAK/STAT pathway." Bioessays **21**(1): 47-52.
- Strasser, A. (2005). "The role of BH3-only proteins in the immune system." Nat Rev Immunol **5**(3): 189-200.
- Sun, T. and L. Kim (2011). "Tyrosine phosphorylation-mediated signaling pathways in dictyostelium." J Signal Transduct **2011**: 894351.

- Suzuki, M., R. J. Youle and N. Tjandra (2000). "Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization." Cell **103**(4): 645-654.
- Shamas-Din, A., H. Brahmabhatt, B. Leber and D. W. Andrews (2011). "BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis." Biochim Biophys Acta **1813**(4): 508-520.
- Shay, J. W. and I. B. Roninson (2004). "Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy." Oncogene **23**(16): 2919-2933.
- Shi, S., K. Larson, D. Guo, S. J. Lim, P. Dutta, S. J. Yan and W. X. Li (2008). "Drosophila STAT is required for directly maintaining HP1 localization and heterochromatin stability." Nat Cell Biol **10**(4): 489-496.
- Shields, B. J., N. W. Court, C. Hauser, P. E. Bukczynska and T. Tiganis (2008). "Cell cycle-dependent regulation of SFK, JAK1 and STAT3 signalling by the protein tyrosine phosphatase TCPTP." Cell Cycle **7**(21): 3405-3416.
- Shin, S., B. J. Sung, Y. S. Cho, H. J. Kim, N. C. Ha, J. I. Hwang, C. W. Chung, Y. K. Jung and B. H. Oh (2001). "An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7." Biochemistry **40**(4): 1117-1123.
- Shirogane, T., T. Fukada, J. M. Muller, D. T. Shima, M. Hibi and T. Hirano (1999). "Synergistic roles for Pim-1 and c-Myc in STAT3-mediated cell cycle progression and antiapoptosis." Immunity **11**(6): 709-719.
- Shuai, K., C. Schindler, V. R. Prezioso and J. E. Darnell, Jr. (1992). "Activation of transcription by IFN-gamma: tyrosine phosphorylation of a 91-kD DNA binding protein." Science **258**(5089): 1808-1812.
- Shuai, K., G. R. Stark, I. M. Kerr and J. E. Darnell, Jr. (1993). "A single phosphotyrosine residue of Stat91 required for gene activation by interferon-gamma." Science **261**(5129): 1744-1746.
- T**
- Takeda, K., K. Noguchi, W. Shi, T. Tanaka, M. Matsumoto, N. Yoshida, T. Kishimoto and S. Akira (1997). "Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(8): 3801-3804.
- Tanaka, T., M. A. Soriano and M. J. Grusby (2005). "SLIM is a nuclear ubiquitin E3 ligase that negatively regulates STAT signaling." Immunity **22**(6): 729-736.
- Tian, B., Q. Yang and Z. Mao (2009). "Phosphorylation of ATM by Cdk5 mediates DNA damage signalling and regulates neuronal death." Nat Cell Biol **11**(2): 211-218.
- Timofeev, O., O. Cizmecioglu, F. Settele, T. Kempf and I. Hoffmann (2010). "Cdc25 phosphatases are required for timely assembly of CDK1-cyclin B at the G2/M transition." J Biol Chem **285**(22): 16978-16990.
- Toillon, R. A., S. Descamps, E. Adriaenssens, J. M. Ricort, D. Bernard, B. Boilly and X. Le Bourhis (2002). "Normal breast epithelial cells induce apoptosis of breast cancer cells via Fas signaling." Exp Cell Res **275**(1): 31-43.

- Troelstra, C., A. van Gool, J. de Wit, W. Vermeulen, D. Bootsma and J. H. Hoeijmakers (1992). "ERCC6, a member of a subfamily of putative helicases, is involved in Cockayne's syndrome and preferential repair of active genes." Cell **71**(6): 939-953.
- Tsai, Y. C. and Y. H. Sun (2004). "Long-range effect of upd, a ligand for Jak/STAT pathway, on cell cycle in *Drosophila* eye development." Genesis **39**(2): 141-153.
- Tsujimoto, Y. (1998). "Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria?" Genes Cells **3**(11): 697-707.
- Tsutakawa, S. E., S. Classen, B. R. Chapados, A. S. Arvai, L. D. Finger, G. Guenther, C. G. Tomlinson, P. Thompson, A. H. Sarker, B. Shen, P. K. Cooper, J. A. Grasby and J. A. Tainer (2011). "Human flap endonuclease structures, DNA double-base flipping, and a unified understanding of the FEN1 superfamily." Cell **145**(2): 198-211.
- Thomas, S. M., F. M. Coppelli, A. Wells, W. E. Gooding, J. Song, J. Kassis, S. D. Drenning and J. R. Grandis (2003). "Epidermal growth factor receptor-stimulated activation of phospholipase Cgamma-1 promotes invasion of head and neck squamous cell carcinoma." Cancer Res **63**(17): 5629-5635.

U

- Ulane, C. M., J. J. Rodriguez, J. P. Parisien and C. M. Horvath (2003). "STAT3 ubiquitylation and degradation by mumps virus suppress cytokine and oncogene signaling." J Virol **77**(11): 6385-6393.
- Ungureanu, D., S. Vanhatupa, N. Kotaja, J. Yang, S. Aittomaki, O. A. Janne, J. J. Palvimo and O. Silvennoinen (2003). "PIAS proteins promote SUMO-1 conjugation to STAT1." Blood **102**(9): 3311-3313.

V

- Vallania, F., D. Schiavone, S. Dewilde, E. Pupo, S. Garbay, R. Calogero, M. Pontoglio, P. Provero and V. Poli (2009). "Genome-wide discovery of functional transcription factor binding sites by comparative genomics: the case of Stat3." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(13): 5117-5122.
- Vanhatupa, S., D. Ungureanu, M. Paakkunainen and O. Silvennoinen (2008). "MAPK-induced Ser727 phosphorylation promotes SUMOylation of STAT1." Biochem J **409**(1): 179-185.
- Vaquero, A., A. Loyola and D. Reinberg (2003). "The constantly changing face of chromatin." Sci Aging Knowledge Environ **2003**(14): RE4.
- Veis, D. J., C. M. Sorenson, J. R. Shutter and S. J. Korsmeyer (1993). "Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair." Cell **75**(2): 229-240.
- Vempati, R. K., R. S. Jayani, D. Notani, A. Sengupta, S. Galande and D. Haldar (2010). "p300-mediated acetylation of histone H3 lysine 56 functions in DNA damage response in mammals." J Biol Chem **285**(37): 28553-28564.
- Verdecia, M. A., H. Huang, E. Dutil, D. A. Kaiser, T. Hunter and J. P. Noel (2000). "Structure of the human anti-apoptotic protein survivin reveals a dimeric arrangement." Nat Struct Biol **7**(7): 602-608.

Vigneron, A., E. Gamelin and O. Coqueret (2008). "The EGFR-STAT3 oncogenic pathway up-regulates the Eme1 endonuclease to reduce DNA damage after topoisomerase I inhibition." Cancer Res **68**(3): 815-825.

Vogelstein, B., E. R. Fearon, S. E. Kern, S. R. Hamilton, A. C. Preisinger, Y. Nakamura and R. White (1989). "Allelotype of colorectal carcinomas." Science **244**(4901): 207-211.

W

Waksman, G., D. Kominos, S. C. Robertson, N. Pant, D. Baltimore, R. B. Birge, D. Cowburn, H. Hanafusa, B. J. Mayer, M. Overduin, M. D. Resh, C. B. Rios, L. Silverman and J. Kuriyan (1992). "Crystal structure of the phosphotyrosine recognition domain SH2 of v-src complexed with tyrosine-phosphorylated peptides." Nature **358**(6388): 646-653.

Wang, D., R. Moriggl, D. Stravopodis, N. Carpino, J. C. Marine, S. Teglund, J. Feng and J. N. Ihle (2000). "A small amphipathic alpha-helical region is required for transcriptional activities and proteasome-dependent turnover of the tyrosine-phosphorylated Stat5." EMBO J **19**(3): 392-399.

Wang, R., P. Cherukuri and J. Luo (2005). "Activation of Stat3 sequence-specific DNA binding and transcription by p300/CREB-binding protein-mediated acetylation." J Biol Chem **280**(12): 11528-11534.

Wang, R., G. He, M. Nelman-Gonzalez, C. L. Ashorn, G. E. Gallick, P. T. Stukenberg, M. W. Kirschner and J. Kuang (2007). "Regulation of Cdc25C by ERK-MAP kinases during the G2/M transition." Cell **128**(6): 1119-1132.

Wang, Y. and D. E. Levy (2006). "C. elegans STAT: evolution of a regulatory switch." FASEB J **20**(10): 1641-1652.

Warburg, O. (1956). "On respiratory impairment in cancer cells." Science **124**(3215): 269-270.

Warburg, O. (1956). "On the origin of cancer cells." Science **123**(3191): 309-314.

Wegrzyn, J., R. Potla, Y. J. Chwae, N. B. Sepuri, Q. Zhang, T. Koeck, M. Derecka, K. Szczepanek, M. Szelag, A. Gornicka, A. Moh, S. Moghaddas, Q. Chen, S. Bobbili, J. Cichy, J. Dulak, D. P. Baker, A. Wolfman, D. Stuehr, M. O. Hassan, X. Y. Fu, N. Avadhani, J. I. Drake, P. Fawcett, E. J. Lesniewsky and A. C. Larner (2009). "Function of mitochondrial Stat3 in cellular respiration." Science **323**(5915): 793-797.

Wen, Z., Z. Zhong and J. E. Darnell, Jr. (1995). "Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation." Cell **82**(2): 241-250.

Westphal, D., G. Dewson, P. E. Czabotar and R. M. Kluck (2011). "Molecular biology of Bax and Bak activation and action." Biochim Biophys Acta **1813**(4): 521-531.

Wiley, S. R., K. Schooley, P. J. Smolak, W. S. Din, C. P. Huang, J. K. Nicholl, G. R. Sutherland, T. D. Smith, C. Rauch, C. A. Smith and et al. (1995). "Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis." Immunity **3**(6): 673-682.

Woodard, G. E., N. N. Huang, H. Cho, T. Miki, G. G. Tall and J. H. Kehrl (2010). "Ric-8A and Gi alpha recruit LGN, NuMA, and dynein to the cell cortex to help orient the mitotic spindle." Mol Cell Biol **30**(14): 3519-3530.

X

- Xiang, Z., A. A. Ahmed, C. Moller, K. Nakayama, S. Hatakeyama and G. Nilsson (2001). "Essential role of the prosurvival bcl-2 homologue A1 in mast cell survival after allergic activation." J Exp Med **194**(11): 1561-1569.
- Xiao, H., J. Chung, H. Y. Kao and Y. C. Yang (2003). "Tip60 is a co-repressor for STAT3." J Biol Chem **278**(13): 11197-11204.
- Xie, T. X., D. Wei, M. Liu, A. C. Gao, F. Ali-Osman, R. Sawaya and S. Huang (2004). "Stat3 activation regulates the expression of matrix metalloproteinase-2 and tumor invasion and metastasis." Oncogene **23**(20): 3550-3560.
- Xu, Q., J. Briggs, S. Park, G. Niu, M. Kortylewski, S. Zhang, T. Gritsko, J. Turkson, H. Kay, G. L. Semenza, J. Q. Cheng, R. Jove and H. Yu (2005). "Targeting Stat3 blocks both HIF-1 and VEGF expression induced by multiple oncogenic growth signaling pathways." Oncogene **24**(36): 5552-5560.

Y

- Yahata, Y., Y. Shirakata, S. Tokumaru, K. Yamasaki, K. Sayama, Y. Hanakawa, M. Detmar and K. Hashimoto (2003). "Nuclear translocation of phosphorylated STAT3 is essential for vascular endothelial growth factor-induced human dermal microvascular endothelial cell migration and tube formation." J Biol Chem **278**(41): 40026-40031.
- Yan, S. J., S. J. Lim, S. Shi, P. Dutta and W. X. Li (2011). "Unphosphorylated STAT and heterochromatin protect genome stability." FASEB J **25**(1): 232-241.
- Yang, C. P. and S. S. Fan (2008). "Drosophila mars is required for organizing kinetochore microtubules during mitosis." Exp Cell Res **314**(17): 3209-3220.
- Yang, E., L. Lerner, D. Besser and J. E. Darnell, Jr. (2003). "Independent and cooperative activation of chromosomal c-fos promoter by STAT3." J Biol Chem **278**(18): 15794-15799.
- Yang, H. S. and P. W. Hinds (2003). "Increased ezrin expression and activation by CDK5 coincident with acquisition of the senescent phenotype." Mol Cell **11**(5): 1163-1176.
- Yang, J., M. Chatterjee-Kishore, S. M. Staugaitis, H. Nguyen, K. Schlessinger, D. E. Levy and G. R. Stark (2005). "Novel roles of unphosphorylated STAT3 in oncogenesis and transcriptional regulation." Cancer Res **65**(3): 939-947.
- Yang, J., J. Huang, M. Dasgupta, N. Sears, M. Miyagi, B. Wang, M. R. Chance, X. Chen, Y. Du, Y. Wang, L. An, Q. Wang, T. Lu, X. Zhang, Z. Wang and G. R. Stark (2010). "Reversible methylation of promoter-bound STAT3 by histone-modifying enzymes." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(50): 21499-21504.
- Yang, J., X. Liao, M. K. Agarwal, L. Barnes, P. E. Auron and G. R. Stark (2007). "Unphosphorylated STAT3 accumulates in response to IL-6 and activates transcription by binding to NFkappaB." Genes Dev **21**(11): 1396-1408.
- Yang, J., S. A. Mani, J. L. Donaher, S. Ramaswamy, R. A. Itzykson, C. Come, P. Savagner, I. Gitelman, A. Richardson and R. A. Weinberg (2004). "Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis." Cell **117**(7): 927-939.

- Yang, J. and G. R. Stark (2008). "Roles of unphosphorylated STATs in signaling." Cell Res **18**(4): 443-451.
- Yang, T., K. M. Kozopas and R. W. Craig (1995). "The intracellular distribution and pattern of expression of Mcl-1 overlap with, but are not identical to, those of Bcl-2." J Cell Biol **128**(6): 1173-1184.
- Yoo, J. Y., D. L. Huso, D. Nathans and S. Desiderio (2002). "Specific ablation of Stat3beta distorts the pattern of Stat3-responsive gene expression and impairs recovery from endotoxic shock." Cell **108**(3): 331-344.
- Yoshida, Y., A. Kumar, Y. Koyama, H. Peng, A. Arman, J. A. Boch and P. E. Auron (2004). "Interleukin 1 activates STAT3/nuclear factor-kappaB cross-talk via a unique TRAF6- and p65-dependent mechanism." J Biol Chem **279**(3): 1768-1776.
- You, J., Q. Li, C. Wu, J. Kim, M. Ottinger and P. M. Howley (2009). "Regulation of aurora B expression by the bromodomain protein Brd4." Mol Cell Biol **29**(18): 5094-5103.
- You, M., D. H. Yu and G. S. Feng (1999). "Shp-2 tyrosine phosphatase functions as a negative regulator of the interferon-stimulated Jak/STAT pathway." Mol Cell Biol **19**(3): 2416-2424.
- Yu, C. L., D. J. Meyer, G. S. Campbell, A. C. Larner, C. Carter-Su, J. Schwartz and R. Jove (1995). "Enhanced DNA-binding activity of a Stat3-related protein in cells transformed by the Src oncoprotein." Science **269**(5220): 81-83.
- Yu, H. and R. Jove (2004). "The STATs of cancer--new molecular targets come of age." Nat Rev Cancer **4**(2): 97-105.
- Yu, H., D. Pardoll and R. Jove (2009). "STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3." Nat Rev Cancer **9**(11): 798-809.
- Yu, Q., Y. Geng and P. Sicinski (2001). "Specific protection against breast cancers by cyclin D1 ablation." Nature **411**(6841): 1017-1021.
- Yu, Z., W. Zhang and B. C. Kone (2002). "Signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) inhibits transcription of the inducible nitric oxide synthase gene by interacting with nuclear factor kappaB." Biochem J **367**(Pt 1): 97-105.
- Yuan, Z. L., Y. J. Guan, D. Chatterjee and Y. E. Chin (2005). "Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue." Science **307**(5707): 269-273.
- Yuen, H. F., Y. P. Chan, M. L. Wong, W. K. Kwok, K. K. Chan, P. Y. Lee, G. Srivastava, S. Y. Law, Y. C. Wong, X. Wang and K. W. Chan (2007). "Upregulation of Twist in oesophageal squamous cell carcinoma is associated with neoplastic transformation and distant metastasis." J Clin Pathol **60**(5): 510-514.

Z

- Zushi, S., Y. Shinomura, T. Kiyohara, Y. Miyazaki, S. Kondo, M. Sugimachi, Y. Higashimoto, S. Kanayama and Y. Matsuzawa (1998). "STAT3 mediates the survival signal in oncogenic ras-transfected intestinal epithelial cells." Int J Cancer **78**(3): 326-330.
- Zhang, B., I. Gojo and R. G. Fenton (2002). "Myeloid cell factor-1 is a critical survival factor for multiple myeloma." Blood **99**(6): 1885-1893.

- Zhang, J., J. Yang, S. K. Roy, S. Tininini, J. Hu, J. F. Bromberg, V. Poli, G. R. Stark and D. V. Kalvakolanu (2003). "The cell death regulator GRIM-19 is an inhibitor of signal transducer and activator of transcription 3." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(16): 9342-9347.
- Zhang, Q., H. Y. Wang, M. Marzec, P. N. Raghunath, T. Nagasawa and M. A. Wasik (2005). "STAT3- and DNA methyltransferase 1-mediated epigenetic silencing of SHP-1 tyrosine phosphatase tumor suppressor gene in malignant T lymphocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(19): 6948-6953.
- Zhang, X., J. Blenis, H. C. Li, C. Schindler and S. Chen-Kiang (1995). "Requirement of serine phosphorylation for formation of STAT-promoter complexes." Science **267**(5206): 1990-1994.
- Zhang, X., V. Mar, W. Zhou, L. Harrington and M. O. Robinson (1999). "Telomere shortening and apoptosis in telomerase-inhibited human tumor cells." Genes Dev **13**(18): 2388-2399.
- Zhang, X., M. H. Wrzeszczynska, C. M. Horvath and J. E. Darnell, Jr. (1999). "Interacting regions in Stat3 and c-Jun that participate in cooperative transcriptional activation." Mol Cell Biol **19**(10): 7138-7146.
- Zhong, Z., Z. Wen and J. E. Darnell, Jr. (1994). "Stat3 and Stat4: members of the family of signal transducers and activators of transcription." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(11): 4806-4810.
- Zhong, Z., Z. Wen and J. E. Darnell, Jr. (1994). "Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6." Science **264**(5155): 95-98.

TITRE

Réponse à la chimiothérapie et progression du cycle cellulaire : rôle de l'oncogène STAT3 dans le cancer colorectal

RÉSUMÉ

Les facteurs de transcription STAT3 sont des protéines cytoplasmiques qui induisent l'activation de gènes en réponse à une stimulation de facteurs de croissance ou de cytokines. A la suite d'une phosphorylation sur son résidu tyrosine 705, STAT3 se dimérise et est transloqué dans le noyau afin d'activer ses gènes cibles spécifiques impliqués dans la progression de la phase G1 vers la phase S du cycle cellulaire. Néanmoins, en absence de phosphorylation du résidu tyrosine 705, STAT3 est capable d'induire l'activation de ses gènes cibles, ces observations ont été corrélées avec la phosphorylation du résidu sérine 727 localisée dans le domaine de transactivation. Dans ce cas, il a été montré que les gènes cibles sont différents de ceux activés par STAT3 phosphorylé sur son résidu tyrosine. Ces résultats suggèrent que les modifications post-traductionnelles de STAT3 jouent un rôle important dans la spécificité de son activité transcriptionnelle.

Nous avons observé que le facteur de transcription est phosphorylé sur son résidu sérine 727 en réponse à un traitement génotoxique par la kinase Cdk5. Dans ces conditions, cette voie Cdk5-STAT3 permet la diminution de l'expression de gènes impliqués dans la progression de la phase G1 du cycle cellulaire comme la cycline D1 et c-Myc afin de favoriser l'expression des gènes de réparation tel que Eme1. En parallèle, nous avons montré que STAT3 est également phosphorylé sur son résidu sérine 727 lors de la phase G2 et de la mitose. Cette phosphorylation, due à la kinase Cdk1, permet de réguler l'expression de gènes impliqués dans le déroulement des phases G2 et M du cycle cellulaire, tels que PLK1, STIL, RIC8A, FoxM1, NuMa, Cdc25C. Par ailleurs, grâce à une étude immunohistochimique, nous avons remarqué que STAT3 est phosphorylé sur son résidu sérine 727 dès les stades précoces du cancer colorectal.

L'ensemble de ces résultats suggère que la sérine 727 est un site de phosphorylation majeur dans le cancer colorectal. Cette phosphorylation lui permet d'activer deux voies distinctes : la réparation des dommages de l'ADN en réponse à un traitement génotoxique et la progression du cycle cellulaire de la phase G2 vers la mitose.

MOTS CLÉS

STAT3, Cdk5, Eme1, dommages de l'ADN, phase G2 du cycle cellulaire, PLK1

SPÉCIALITÉ

Biologie Cellulaire

Hélène Sellier
INSERM U892
Institut de Cancérologie de l'Ouest
2, Rue Moll
49 933 ANGERS Cedex 09