

Université de Montréal

**Caractérisation du rôle de la voie Jak/STAT dans la réponse
mitogénique des Récepteurs Couplés aux Protéines G.**



par

François Duhamel

Département de Pharmacologie et
Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie (IRIC),
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de *Maître ès Science* (M.Sc.)
en Pharmacologie

Avril 2005

© François Duhamel, 2005



W

4

U58

2005

v.124

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Caractérisation du rôle de la voie Jak/Stat dans la réponse mitogénique des Récepteurs
Couplés aux Protéines G.

présenté par :
François Duhamel

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Chantal Lambert, Ph.D., président-rapporteur
Sylvain Meloche, Ph.D., directeur de recherche
Jean-François Gauchat, Ph.D., membre du jury

Résumé

La cascade signalétique Janus Kinase (Jak) / STAT est une voie de signalisation intracellulaire ubiquitaire activée par plusieurs cytokines et facteurs de croissance. Cette voie est responsable de l'effet des cytokines sur la prolifération cellulaire, la différenciation, la survie et la résistance de l'hôte aux agents pathogènes, et est impliquée dans plusieurs formes de cancers. Notre laboratoire, ainsi que d'autres, a démontré qu'en plus des cytokines, les agonistes de récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) activent fortement la voie Jak/STAT. Cependant, le rôle de cette voie de signalisation dans la réponse aux GPCRs reste peu défini. Nos récents travaux suggèrent que l'activation des Jaks et de STAT3 est importante pour la croissance induite par les agonistes de GPCRs. Afin d'éclaircir cette fonction, nous avons tout d'abord surexprimé transitoirement SOCS1 (Suppressor of Cytokine Signaling), afin de bloquer la voie de signalisation Jak/STAT, dans des fibroblastes et des cellules musculaires lisses vasculaires (VSMC), puis des lignées clonales stables exprimant fortement SOCS1 ont été produites. Réciproquement, l'impact de l'inactivation de SOCS1, dans des cellules primaires MEFs (Mouse Embryonic Fibroblasts) isolées de souris déficientes en SOCS1, a également été analysé. Nous avons déterminé que SOCS1 a un impact important sur l'activation à long terme de STAT3 en réponse aux GPCRs, et de ce fait, qu'une surexpression de SOCS1 inhibe fortement la prolifération des fibroblastes, en réponses aux GPCRs. Il est intéressant de noter que nous avons également démontré, pour la première fois, que l'acide lysophosphatidique (LPA), un phospholipide agoniste de GPCRs, active fortement la voie de signalisation Jak/STAT. De plus, deux approches complémentaires d'inactivation spécifique des membres de la voie Jak/STAT ont été développées; soit une approche par interférence d'ARN grâce à des vecteurs rétroviraux encodant des shARNs, ainsi qu'une approche de constructions rétrovirales répressibles de formes inactives des protéines de la voie Jak/STAT. Dans toutes ces expériences, plusieurs paramètres de la prolifération cellulaire ont été ou seront examinés: la vitesse de prolifération, ainsi que la synthèse de protéines et d'ADN. Maintenant que nous avons confirmé le rôle de la voie Jak/STAT dans les actions mitogéniques induites par les GPCRs, l'analyse de l'expression et de l'activité des régulateurs du cycle cellulaire permettra de mieux définir les bases moléculaires de cette fonction. De plus, nous pourrions déterminer quelles sont les protéines de la voie Jak/STAT spécifiquement impliquées dans la réponse mitogénique des GPCRs, et s'il existe une redondance fonctionnelle entre les différents membres des Jaks.

Mots-clés : Récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs), Janus Kinases, Signal transducers and activators of transcription (STATs), Thrombine, Acide lysophosphatidique (LPA), Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS), shRNA, Dominants négatifs

Abstract

The Janus kinases (Jak) / STAT signalling cascade is an ubiquitous intracellular signalling pathway activated by many cytokines and growth factors. This pathway is responsible for the effects of cytokines on cellular proliferation, differentiation, survival and host pathogen responses, and is implicated in many types of cancers. Our laboratory and others have shown that, in addition to cytokines, agonists of G protein-coupled receptors (GPCR) also potentially activate the Jak/STAT pathway. However, the role of this signalling pathway, in the response of GPCRs, remains undefined. Our recent work suggests that the activation of Jaks and STAT3 is important for the growth promoting actions of GPCR agonists. As a first approach, we have transiently overexpressed a major negative regulator of the Jak/STAT pathway, SOCS1 (Suppressor of Cytokine Signaling), in order to shut down the pathway in rat fibroblasts and rat vascular smooth muscle cells (VSMC). Then, clonal stable cell lines, strongly overexpressing SOCS1, have been produced. Reciprocally, we have examined the impact of inactivating SOCS1 in primary MEFs (Mouse Embryonic Fibroblasts), isolated from SOCS1 knockout mice. We have determined that SOCS1 has a major impact on the long term activation of STAT3, in response to GPCRs, and so, that an overexpression of SOCS1 inhibit the proliferation of rat fibroblasts in response to GPCRs. Interestingly, we have demonstrated, for the first time, that lysophosphatidic acid (LPA), a phospholipid agonist of GPCRs, potentially activates the Jak/STAT pathway. Moreover, two complementary approaches for inactivating specifically the different members of the Jak/STAT pathway have been developed; retroviral vectors encoding short hairpin RNA (shRNA) and retroviral repressible vectors encoding inactive forms of the proteins of the Jak/STAT pathway. For these experiments, various parameters of cellular proliferation have been, or will be, examined: the proliferation rate and protein and DNA synthesis. Now that we have confirmed the role of the Jak/STAT pathway in the growth promoting actions of GPCRs, the analysis of cell cycle regulator expression and activity will aim at defining the molecular basis of this function. Finally, we will be able to determine which proteins of the Jak/STAT pathway are specifically implicated in the growth promoting actions of GPCRs, and if there is a functional redundancy between the different members of the Jaks.

Keywords : G protein-coupled receptors (GPCRs), Janus Kinases, Signal transducers and activators of transcription (STATs), Thrombin, Lysophosphatidic acid (LPA), Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS), shRNA, Catalytically inactive forms

Tables des matières

Résumé	iii
Abstract	iv
Table des matières	v
Liste des tableaux	ix
Liste des figures	x
Liste des abréviations	xiii
Remerciements	xvi
<i>INTRODUCTION</i>	1
1.1. LA VOIE DE SIGNALISATION JAK/STAT	2
1.1.1. Les Janus Kinases (Jaks)	3
1.1.1.1. Structure des Jaks	4
1.1.1.1.1. Domaine Kinase (JH1)	4
1.1.1.1.2. Domaine Pseudo-Kinase (JH2)	6
1.1.1.1.3. La région N-terminale (JH3-JH7)	7
1.1.1.2. Fonctions des Jaks	8
1.1.1.2.1. Jak 1	9
1.1.1.2.2. Jak 2	9
1.1.1.2.3. Jak3	10
1.1.1.2.4. Tyk2	10
1.1.2. Les STATs (Signal Transducers and Activators of Transcription)	11
1.1.2.1. Structure des STATs	11
1.1.2.2. Fonctions des STATs	16
1.1.2.2.1. STAT 1	17
1.1.2.2.2. STAT 2	18
1.1.2.2.3. STAT 3	18

1.1.2.2.4. STAT 4	20
1.1.2.2.5. STAT 5 A et B	21
1.1.2.2.6. STAT6	22
1.1.3. Régulation de la voie de signalisation Jak/STAT	23
1.1.3.1. Activation des Janus kinases	23
1.1.3.1.1. Par les récepteurs de cytokines	23
1.1.3.1.2. Par les récepteurs couplés aux protéines G; implication des petites protéines G de la famille Rho	26
1.1.3.1.3. Activation des STATs	28
1.1.3.1.4. Rôles biologiques de la voie Jak/STAT dans la réponse aux GPCRs	31
1.1.3.2. Régulation négative de la voie Jak/STAT	35
1.1.3.2.1. Protéines tyrosine Phosphatases (PTPases)	36
1.1.3.2.1.1. PTPases des Jaks	36
1.1.3.2.1.2. PTPases des STATs	37
1.1.3.2.2. SOCS (Boucle de rétro-inhibition)	37
1.1.3.2.2.1. Régulation des Jaks par les SOCS	37
1.1.3.2.2.2. Régulation des STATs par les SOCS	42
1.1.3.2.3. Régulation négative spécifique aux STATs	43
1.1.3.2.3.1. PIAS	43
1.2. LES RÉCEPTEURS PAR-1 ET LPA ₁ EN TANT QUE MODÈLE DE RÉCEPTEURS COUPLÉS AUX PROTÉINES G HÉTÉROTRIMÉRIQUES	44
1.2.1. Le récepteur PAR-1 de la thrombine	45
1.2.1.1. Structure du récepteur PAR-1	46
1.2.1.2. Mécanisme de régulation du récepteur PAR-1	46
1.2.1.2.1. Activation	46
1.2.1.2.2. Inactivation	47
1.2.1.3. Signalisation cellulaire	49
1.2.1.4. Fonctions de la thrombine et du récepteur PAR-1	51
1.2.2. Le récepteur LPA ₁ de l'acide lysophosphatidique (LPA)	53
1.2.2.1. Structure du récepteur LPA ₁	53
1.2.2.2. Mécanisme de régulation du récepteur LPA ₁	55
1.2.2.2.1. Activation	55
1.2.2.2.2. Inactivation	55
1.2.2.3. Signalisation cellulaire	56

1.2.2.4. Fonctions du LPA et du récepteur LPA ₁	58
2. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS	61
3. MATÉRIELS / MÉTHODES	62
3.1 Réactifs, anticorps et plasmides	62
3.2 Culture cellulaire et transfections	63
3.3 Production de MEFs à partir de croisements de souris <i>Tyk2</i> ^{+/-} et mise au point (développement) du protocole de génotypage	64
3.4 Analyse d'immunobuvardage	66
3.5 Vecteurs rétroviraux et génération de lignées stables	67
3.6 Prolifération cellulaire et synthèse de protéines	68
3.7 Interférence à l'ARN	69
4. RÉSULTATS	71
4.1. Activation de la voie de signalisation Jak/STAT par les GPCRs dans les fibroblastes de rat	71
4.2. La phase tardive d'activation de STAT3 en réponse aux GPCRs est dépendante de la voie NF-κB dans les cellules musculaires lisses vasculaires de rat	74
4.3. Les agonistes de GPCRs induisent une activité mitogénique (synthèse d'ADN) et hypertrophique (synthèse protéique) dans les cellules musculaires lisses vasculaires et les fibroblastes de rat	77
4.4. La surexpression de SOCS1 bloque l'activation de la voie Jak/STAT en réponse aux GPCRs et aux cytokines dans les fibroblastes de rat	80
4.5. SOCS1 régule la réponse mitogénique des agonistes de GPCRs dans les fibroblastes de rat	86
4.6. SOCS1 régule l'activation à long terme de la voie de signalisation Jak/STAT en réponse aux GPCRs dans les fibroblastes de souris	88
4.7. L'expression de shRNAs, par des vecteurs rétroviraux, permet de diminuer l'expression de Jak2 et de STAT3 dans les fibroblastes de souris	95
4.8. Jak2 et STAT3 semblent être impliqués dans la survie cellulaire de fibroblastes de rat	97
5. DISCUSSION	103
5.1. Activation de la voie de signalisation Jak/STAT en réponse aux GPCRs	104
5.1.1. Activation tardive de la voie Jak/STAT3 par les GPCRs : NF-kappaB, un nouveau joueur	105

5.1.2. Les Wnts : la famille s'aggrandit	109
5.2. Les SOCS dans la régulation des GPCRs	111
5.2.1. Surexpression de SOCS1 et inhibition de la réponse mitogénique des GPCRs	111
5.2.2. SOCS1, un régulateur naturel de la voie Jak/STAT en réponse aux GPCRs	115
5.3. Approches spécifiques complémentaires	119
5.3.1. Vecteurs encodant des shRNAs vs siRNAs synthétiques	120
5.3.2. Vecteurs encodant des shRNAs	121
5.3.3. siRNAs synthétiques	122
5.3.4. Formes dominantes-négatives	123
5.4. Avenues intéressantes	124
6. CONCLUSIONS	126
7. BIBLIOGRAPHIE	127
Annexe 1. Liste de publications	xvii
Annexe 2. Résumés de communication	xviii
Annexe 3. Prix, Mentions et Bourses nominatives	xx

Liste des tableaux

Tableau 1.1.	Rôles des Janus Kinases, révélés par la délétion du gène chez la souris.	8
Tableau 1.2.	Rôles des protéines STATs, révélés par la délétion du gène chez la souris.	17
Tableau 1.3.	Les membres de la famille de protéines SOCS s'associent avec une variété de protéines et inhibent la signalisation de plusieurs cytokines.	39
Tableau 1.4.	Rôles des protéines SOCS, révélés par la délétion du gène chez la souris.	42
Tableau 1.5.	Rôles du récepteur PAR-1 de la thrombine dans différents tissus.	52
Tableau 1.6.	Principaux effets biologiques du LPA et du récepteur LPA ₁ .	59

Liste des figures

Figure 1.1.	Structure des Janus Kinases.	5
Figure 1.2.	Structure des domaines et des sites de liaison aux protéines des STATs.	14
Figure 1.3.	Activation de la voie de signalisation Jak/STAT en réponse aux cytokines.	24
Figure 1.4.	Modèle proposé du rôle des petites protéines G de la famille Rho dans la régulation de l'activation des Jaks et la transcription dépendante des STATs, en réponses aux GPCRs.	28
Figure 1.5.	Régulation positive et négative de la voie Jak/STAT.	36
Figure 1.6.	Les SOCS : régulateurs négatifs de la voie Jak/STAT.	41
Figure 1.7.	Activation par clivage protéolytique des récepteurs PARs.	47
Figure 1.8.	Voies de signalisation engendrées par le récepteur PAR-1 de la thrombine.	49
Figure 1.9.	Modèle du complexe LPA ₁ -LPA.	54
Figure 1.10.	Principales voies de signalisation activées par le LPA.	57
Figure 3.1.	Analyse génotypique des embryons de souris Tyk2.	65
Figure 3.2.	Structure du vecteur rétroviral pMSCV encodant des shRNAs.	68
Figure 4.1.	Les agonistes de GPCRs activent les Jaks et STAT3 dans les fibroblastes et les cellules musculaires lisses vasculaires de rat.	73
Figure 4.2.	NF-kappaB est essentiel à la phase tardive d'activation de STAT3 en réponse aux GPCRs dans les cellules musculaires lisses vasculaires de rat	75
Figure 4.3.	Les agonistes de GPCRs induisent la prolifération cellulaire et la synthèse protéique dans les fibroblastes et les cellules musculaires lisses vasculaires de rat.	78

- Figure 4.4. La surexpression de SOCS1 bloque l'activation de la voie Jak/STAT en réponse aux GPCRs et aux cytokines dans les fibroblastes de rat. 82
- Figure 4.5. La surexpression de SOCS1 inhibe complètement l'activation de STAT3 en réponse aux agonistes de GPCRs. 83
- Figure 4.6. Une surexpression de SOCS1 n'inhibe pas l'activation des voies de signalisation AKT et Erk1/2 en réponse aux GPCRs dans les fibroblastes de rat. 86
- Figure 4.7. Une surexpression de SOCS1 inhibe la réponse mitogénique des agonistes de GPCRs dans les fibroblastes de rat. 87
- Figure 4.8. Des cellules MEFs *SOCS1*^{-/-} ont une activation de STAT3 prolongée en réponse aux agonistes de GPCRs. 88
- Figure 4.9. L'absence de SOCS1 dans les fibroblastes de souris favorise la prolifération cellulaire. 91
- Figure 4.10. L'absence de SOCS1 dans les fibroblastes de souris favorise l'expression de STAT1 et son activation par le LPA (GPCR). 92
- Figure 4.11. Un milieu conditionné Wnt-3A semble affecter l'activation de STAT3 dans les fibroblastes de rat. 94
- Figure 4.12. L'expression de shRNAs, par des vecteurs rétroviraux, permet de diminuer l'expression de JAK2 et de STAT3 dans les fibroblastes de souris. 95
- Figure 4.13. L'expression de JAK2 et STAT3 de clones stables de fibroblastes de rat ou de souris exprimant des shRNAs contre ces protéines. 96
- Figure 4.14. La survie cellulaire de fibroblastes de rat semble être affectée par l'expression de siRNAs et de shRNAs contre Jak2 et STAT3. 98
- Figure 4.15. Production de constructions rétrovirales répressibles des formes dominantes-négatives des Jaks et de STAT3. 101

Figure 5.1. Modèle d'activation de la voie de signalisation Jak/STAT3 en réponse aux GPCRs.

119

Liste des abbréviations

AC : Adénylyl cyclase;
ADP : Adénosine Diphosphate;
AMPC : Adénosine monophosphate cyclique;
ATP : Adénosine Triphosphate;
CCK2(R): *Cholecystokinin 2 (Receptor)*;
CD45 : *Cluster of differentiaon 45 (PTPase membranaire)*;
Cdk : *Cyclin-dependant kinase*;
CIS: *Cytokine-Inducible SH2 containing protein*;
CNTF: *Ciliary Neutrophic Factor*;
CT-1: *Cardiotrophin-1*;
DAG: Diacylglycérol;
EDG : *Endothelial Differentiation Gene*;
EGF: *Epidermal Growth Factor*;
Epo(R) : *Erythropoietin / Érythropoïétine (Receptor/Récepteur)*;
ERK : *Extracellular signal Regulated Kinase*;
ET-1: *Endothelin-1*;
FERM : *Four-point-one/Ezrin/Radixin/Meosin*;
GAP : *GTPase Activating Protein*;
GAS: *Interferon-Gamma-Activated Site*;
GDP : Guanosine Diphosphate;
GEF : *Guanine Exchange Factor*;
GH (R) : *Growth Hormone (Receptor)*;
GMCSF: *Granulocytes Macrophages Colony Stimulating Factor*;
gp130 : glycoprotéine 130;
GPCR : *G Protein-Coupled Receptor*;
GRK: *G Protein Receptor Kinase*;
GTP: Guanosine Triphosphate;

IL-: Interleukine-;
IFN: *Interferon / Interféron*;
IFNAR1: *Interferon- $\alpha\beta\omega$ Receptor-1*;
JAB: *Jak binding protein*;
JH : *Jak Homology*;
Jak : Janus Kinases;
KIR: *Kinase Inhibitory Region*;
KSHV: *Kaposi's Sarcoma HerpesVirus*;
LIF: *Leukaemia Inhibitory Factor*;
LIFRb: *Leukaemia Inhibitory Factor Receptor b*;
LPA : *Lysophosphatidic Acid / Acide lysophosphatidique*;
LPA₁₋₄ : *Lysophosphatidic acid Receptor 1-4*;
MAPK: *Mitogen Activated Protein Kinase*;
MCP-1: *Monocyte Chemoattractant protein-1*;
MTT : Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium;
NF-kB: *Nuclear Factor-kappa B*;
NADPH oxidase: *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate oxidase*;
NK : *Natural Killer cells*;
OSM: *Oncostatin M*;
p125FAK: *p125 Focal Adhesion Kinase*;
PAR: *Protease Activated receptor*;
PCR : *Polymerase Chain Reaction*;
PDGF: *Platelet-Derived Growth Factor*;
PIAS : *Protein Inhibitor of Activated STATs*;
PI3K: *Phosphatidyl-Inositol 3 Kinase*;
PKC: Protéine Kinase C;
PL(A₂/C/D): Phospholipase A₂ /C /D;
PRL : Prolactine;
PTK: Protéine Tyrosine Kinase;
PTP-1B : Protéine Tyrosine Phosphatase-1B;

PTPases : Protéine Tyrosine Phosphatases;
(sh/si) RNA; *short hairpin/ small interfering RNA*;
ROCK : Rho-kinase;
ROS : *Reactive Oxygen Species*;
RTK : Récepteur Tyrosine Kinase;
SCID: *Severe Combined Immonodeficiency*;
SDF-1: *Stromal cell-Derived Factor-1*;
SH2 / 3: *Src Homology domain 2 / 3*;
SHP-1 / 2: *SH2 containing Protein tyrosine Phosphatase-1 / 2*;
SOCS : *Suppressor of Cytokine Signaling*;
SRE: *Serum Response Element*;
SSI-1: *STAT-induced STAT inhibitor-1*;
STAT : *Signal Transducers and Activators of Transcription*;
SUMO: *Small Ubiquitin-related MOdifier*;
TC-PTP: *T-Cell Protein Tyrosin Phosphatase*;
Th1 / 2: *T helper-1 / 2 cells*;
Thr : *Thrombin / Thrombine*;
TRAP: *Thrombin Receptor Activating peptide*;
VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*;
VSMC : *Vascular Smooth Muscle Cell*;
VZG-1: *Ventricular Zone Gene-1*;

Remerciements

Mes remerciements vont, d'abord et avant tout, à mes parents et ma sœur pour leur support moral inconditionnel, depuis toujours. Ce sont les personnes sans qui, il ne fait aucun doute, la pente aurait été beaucoup plus abrupte à monter.

Également, un merci tout spécial à Stéphane Pelletier pour m'avoir formé à mes débuts, et ainsi, à m'avoir inculqué un regard critique envers la science. Un grand merci pour avoir été le premier à croire en mes capacités scientifiques et à m'avoir motivé à poursuivre une carrière en recherche. Sans oublier, Geneviève Rodier et Philippe Coulombe, pour leur aide technique, théorique et humaine durant ces trois années. Vous m'avez permis de développer davantage ma curiosité scientifique, ainsi que mon côté plus « critique » envers la science, particulièrement durant la dernière année et demie (...étant littéralement coincé entre vos « bench »!) À tous ceux et celles qui m'ont encouragé ou soutenu, à un moment ou un autre de cette maîtrise; merci.

Finalement, je voudrais remercier le Dr. Sylvain Meloche de m'avoir permis d'effectuer ma maîtrise dans son laboratoire.

INTRODUCTION

C'est à l'ère moderne, entre autre par le père de la théorie de l'évolution, Charles Darwin, que l'on a pu adopter une attitude scientifique afin de déterminer l'origine de la vie et la soumettre à une vérification expérimentale. L'évolution biologique a permis à l'organisme vivant le plus simple, la cellule primitive, d'élaborer des systèmes métaboliques sophistiqués et, éventuellement, la faculté de former des organismes plus complexes, dit multi- ou pluri- cellulaires. La transformation de ces organismes unicellulaires à pluricellulaires conduisit à un concept nouveau à ce moment, soit la communication intercellulaire. Les communications intracellulaires sont maintenues par la synthèse ou l'altération d'une grande variété de substances différentes qui sont souvent des constituants à part entière des processus qu'ils contrôlent. Les signaux intercellulaires se transmettent par l'intermédiaire de messagers chimiques connus sous le nom d'hormones (autocrines, paracrines ou endocrines), et chez les animaux supérieurs, via des impulsions électrochimiques transmises par les neurones, nommées neurotransmetteurs. Ces voies de communication représentent le moyen utilisé par les cellules afin de transmettre leurs messages à d'autres cellules (paracrines, endocrines), ou à elle-même (autocrines), par l'usage de messagers primaires. Ces molécules fonctionnent en rapport avec d'autres molécules en surface des cellules, que l'on appelle récepteurs membranaires. Dans tous les cas, seules les cellules qui possèdent un récepteur spécifique correspondant à une hormone donnée peuvent réagir à sa présence, même si presque toutes les cellules de l'organisme sont exposées à cette hormone.

Ces récepteurs membranaires se divisent en plusieurs grandes classes, dont les récepteurs tyrosines kinases (RTK), les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) incluant les récepteurs adrénérgiques, les récepteurs canaux ioniques et les récepteurs associés à une tyrosine kinase, tel que les récepteurs de cytokines. Ces récepteurs ont comme rôle d'activer la production de messagers secondaires qui permettront de communiquer le signal jusqu'au centre de traitement de données des cellules, soit leur

noyau. En fait, les différents récepteurs activent diverses voies de signalisation en parallèle, qui peuvent également s'entrecroiser (« *cross-talk* »), afin d'accomplir leur rôle dans la réponse cellulaire. Une de ces voies, conservée au cours de l'évolution, en plus d'être exprimée de façon ubiquitaire et d'être essentielle au développement, est la voie de signalisation Jak (*Janus Kinases*) / STATs (*Signal Transducers and Activators of Transcription*).

1.1 LA VOIE DE SIGNALISATION JAK/STAT

Du milieu des années 50 jusqu'aux années 80, s'enchaînèrent une multitude d'études sur ce qu'il apparut être une série de petites protéines sécrétées, appelées interférons et cytokines. Les bases majeures de reconnaissance et de définition de ces facteurs extracellulaires étaient leur habileté à induire la différenciation et la progression à maturité de différents précurseurs spécifiques de cellules du sang. Leur classification indique que les cytokines de Type I englobent les cytokines à courte chaîne, soit entre autre les Interleukines (IL) -2, -3, -4, -5, -7, -9, -13, -15, et le *Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor* (GM-CSF), et les cytokines à longues chaînes, soit entre autre l'IL-6, l'IL-11, l'Oncostatine M (OSM), le *Ciliary Neutrophilic Factor* (CNTF), la Cardiotrophine-1 (CT-1), le *Leukaemia Inhibitory Factor* (LIF), l'hormone de croissance (*Growth Hormone*, GH), la Prolactine (PrI), l'érythropoïétine (Epo) et finalement, la thrombopoïétine (Tpo). Les cytokines de Type II, quant à elles, sont représentées par les interférons (IFNs) α , β et γ (Leonard et O'Shea, 1998). Durant les années 80, et au début des années 90, se succédèrent diverses études qui disséquèrent les bases moléculaires des voies de signalisation par lesquelles les cytokines extracellulaires agissent sur les molécules intracellulaires. L'identification et le clonage moléculaire des récepteurs de la superfamille des récepteurs de cytokines, ainsi que le clonage des gènes des protéines intracellulaires à travers lesquelles les signaux se transmettent jusqu'au noyau, ont permis de caractériser en détail la voie de signalisation de l'interféron. Cette cascade signalétique, la première voie

des « cytokines » à avoir été caractérisée, débute par l'association du récepteur des IFNs avec des protéines tyrosine kinases cytoplasmiques appelées *Janus kinases* (Jaks), ce qui entraîne son association avec des facteurs de transcription cytoplasmiques latents, appelés STATs pour *Signal Transducers and Activators of Transcription*. Une fois activés, ces facteurs de transcription transloquent au noyau où, en se liant à l'ADN, ils permettent la transcription de différents gènes (Darnell et al., 1994, Ihle et al., 1995a; Leonard, 1996; Horvath et Darnell, 1997; O'Shea, 1997; Bach et al., 1997).

1.1.1 Les Janus kinases (Jaks)

Les Janus kinases sont des kinases relativement grosses, d'environ 1150 acides aminés, avec des masses moléculaires d'environ 120-130 kilo Dalton (kD). Leur transcrit d'ARNm se situe entre 4.4 et 5.4 kilo base (kb) de longueur (Leonard et O'Shea, 1998). La famille des Janus kinases contient 4 membres distincts, soit Jak1, Jak2 et Tyk2, exprimés de façon ubiquitaire, ainsi que Jak3, exprimé principalement au niveau des cellules du système immunitaire. Grâce au séquençage du génome humain, il est maintenant clair que la famille des Janus kinases a été entièrement découverte (O'Shea et al., 2002). Cette famille de protéines tyrosine kinases a d'abord été découverte par le clonage de la kinase Tyk2, par criblage de cDNA provenant de lymphocytes T, en utilisant une sonde correspondante au domaine catalytique de c-fms (Krolewski et al., 1990). Il est aussi intéressant de mentionner que Tyk2 a été la première Jak démontrée comme ayant une implication dans la signalisation des cytokines (Velasquez et al., 1992). En ce qui a trait aux autres Jaks, elles ont été identifiées par PCR à partir de séquences conservées du domaine catalytique des protéines tyrosine kinases (PTKs) (Wilks et al., 1991; Harpur et al., 1992; Rane et Reddy, 1994; Takahashi et Shirasawa, 1994). Bien que cette famille de protéines a d'abord été caractérisée chez les mammifères, il est intéressant de savoir que la voie de signalisation Jak/STAT a été conservée au cours de l'évolution et qu'on la retrouve aussi bien chez les vertébrés que chez les non-vertébrés, des mammifères jusqu'à la drosophile, en passant par le poisson zèbre (Binari et al., 1994; Chang et al., 1996; Aubry et Firtel, 1999; Barillas-Mury et al., 1999).

1.1.1.1 Structure des Jaks

Les Janus kinases, aussi nommées Jaks pour *Just Another Kinase*, tirent leur véritable nom d'un des plus anciens dieux romains, *Janus*, gardien des portes du ciel, qui avait la particularité de posséder deux visages. La comparaison des séquences des différentes Jaks a permis de révéler sept régions distinctes de forte homologie, soit les domaines d'homologie des Jaks JH1 – JH7 (*Jak Homology 1 -7*) (Figure 1.1.). Malgré le fait que l'activité biologique de chacune de ces régions n'a pas été pleinement élucidée et reste plutôt floue, plusieurs domaines ont été bien caractérisés, dont le domaine kinase fonctionnel JH1 ainsi que, récemment, le domaine pseudo-kinase JH2, ne possédant pas d'activité catalytique (Leonard et O'Shea 1998; Ihle, 2001; Saharinen et Silvennoinen, 2002; Saharinen et al., 2003; Feener et al., 2004). C'est précisément de cette caractéristique étrange, de posséder deux domaines « kinases », que leur provient le nom de Janus, en lien avec les deux visages du dieu du même nom.

1.1.1.1.1 Domaine Kinase (JH1)

Le domaine kinase conservé JH1 possède les caractéristiques classiques d'une tyrosine kinase, dont le résidu lysine liant l'ATP dans le sous-domaine II, et qui, lorsque muté empêche l'activité kinase (Leonard et O'Shea, 1998; Hubbard et Till, 2000). Ceci inclut également des résidus tyrosine conservés qui constituent une composante critique de la boucle d'activation dans la régulation de l'activité catalytique de ces kinases (Hubbard et al. 1994). Ces résidus tyrosine sont les Y1038/1039 pour Jak1, Y1007/Y1008 pour Jak2, Y980/Y981 pour Jak3 et Y1054/Y1055 pour Tyk2 (Leonard et O'Shea, 1998). La phosphorylation de ce duo de résidus tyrosine mène à un changement de conformation qui permet la liaison du substrat au site actif (Hubbard et Till, 2000). L'étude des sites de phosphorylation des Jaks a permis de déterminer la fonction de plusieurs d'entre eux. En effet, la mutation des résidus tyrosine de la boucle d'activation des Jaks occasionne différents effets sur leur activité catalytique. La construction de formes mutées a permis de créer des mutants dits constitutivement actifs et dominants négatifs (qui ne peuvent pas

s'activer). Par exemple, en ce qui a trait à Jak2, la mutation de la tyrosine 1007 en phénylalanine inhibe son activité kinase et son habilité à transmettre les signaux relayés par les cytokines (Feng et al., 1997). Cependant, il a également été démontré que les mêmes mutations chez divers membres des Jaks n'occasionnent pas le même effet. En effet, la mutation des résidus tyrosine correspondant à ceux de Jak2 chez Tyk2, soit les tyrosines 1054 et 1055, bloque également la phosphorylation de Tyk2 dépendante de la liaison du ligand à son récepteur, mais n'abolit aucunement son activité catalytique (Gauzzi et al., 1996). De fait, des mutations dans la boucle d'activation ou dans le site de liaison de l'ATP réduisent mais n'abolissent pas la signalisation, bien que des mutations aux deux sites abolissent la signalisation. Des études structurales supportent un modèle qui démontre qu'avant la phosphorylation des résidus tyrosine, la boucle d'activation empêche l'accès du

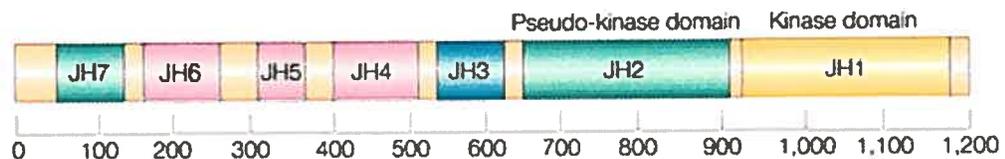


Figure 1.1. Structure des Janus Kinases (tiré de Levy et Darnell, 2002). Les domaines des Janus Kinases (JAKs) 1 à 7 basés principalement sur l'homologie de séquence (JH; *Janus kinases Homology domain*). Les domaines JH1-7 sont des régions d'homologie de séquences dans les quatre Jaks. Les Jaks ont une longueur très similaire d'environ 1200 acides aminés. Le domaine JH1 est le domaine kinase contenant les deux résidus tyrosine catalytiques, et le domaine JH2 est le domaine pseudo-kinase. Les domaines en N-terminal, JH6 et JH7, contiennent le domaine de liaison des Jaks aux récepteurs. L'échelle indique les résidus d'acides aminés.

substrat au site actif de l'enzyme. Suite à la phosphorylation des résidus tyrosine catalytiques, un changement de conformation déplaçant la boucle d'activation permettrait l'accessibilité du substrat au site actif (Leonard et O'Shea, 1998). La différence potentiellement significative de cette région régulatrice, entre les Jaks, est encore présentement sous investigation (Kisseleva et al., 2002).

1.1.1.1.2 Domaine Pseudo-Kinase (JH2)

La présence d'un domaine pseudo-kinase différencie les Jaks des autres protéines tyrosine kinases (Ihle, 2001). Ce domaine possède tous les éléments structurels d'une tyrosine kinase, à l'exception de son activité catalytique et de motifs typiques altérés. Par exemple, le domaine JH2 a en moins la glycine du motif canonique GXGXXG du sous-domaine I. Également, il ne possède pas le résidu acide aspartique invariant des tyrosines et sérines kinases, situé au niveau de la boucle d'activation du sous-domaine VIb. Ce résidu acide aspartique sert d'accepteur de protons dans la réaction de catalyse. Le domaine JH2 est aussi dépourvu d'un résidu phénylalanine conservé dans le motif Asp-Phe-Glu du sous-domaine VII, et qui est important pour la liaison avec l'anneau adénine de l'ATP (Wilks et al., 1991; Velazquez et al. 1995; Frank et al., 1995). Il a été démontré que les formes de Jaks inactivées par des mutations ponctuelles dans le domaine kinase, ou par délétion, ne présentent pas d'activité kinase malgré la présence de ce domaine pseudo-kinase (Guschin et al., 1995; Gauzzi et al., 1996; Feng et al., 1997). Malgré le fait que le rôle de ce domaine ne soit pas encore clair, plusieurs évidences suggèrent qu'il pourrait réguler l'activité du domaine kinase JH1. Par exemple, une mutation ponctuelle dans ce domaine conduit à une hyperactivation dans le cas de Jak2. Ce phénomène de mutation a aussi été rapporté pour l'homologue des Jaks chez la Drosophile, et se nomme Tum-1 (Luo et al., 1997). Cette mutation, menant à une augmentation de la fonction des Jaks chez la Drosophile, provoque une tumeur hématocyte dont la cause a été associée à la mutation de l'acide glutamique (E) 695 en lysine. Même si des mutations analogues chez Jak3 et Tyk2 ne conduisent pas à une hyperactivation, elles semblent moduler leur activité kinase (Velazquez et al., 1995; Candotti et al., 1997; Yeh et al., 2000). Certaines études ont également suggéré que le domaine JH2 pourrait contribuer aux interactions Jak-STAT (Flores-Morales et al., 1998). Finalement, de récentes études ont démontré la présence d'une activité inhibitrice du domaine JH2 sur l'activité catalytique du domaine JH1 des Jaks (Saharinen et Silvennoinen, 2002; Saharinen et al., 2003; Feener et al., 2004). Cette activité inhibitrice du domaine JH2 a également été démontrée *in vivo* dans des tumeurs humaines (James et al., 2005). En effet, les désordres myéloprolifératifs concernent des cellules souches

hématopoïétiques malignes, indépendantes ou hypersensibles à bon nombres de cytokines, entre autres. Un groupe de recherche a démontré que, dans les cas de *Polycythaemia vera*, il y a présence de tumeurs hypersensibles à l'érythropoïétine et d'autres cytokines. Ils ont découvert, dans ces tumeurs, la présence d'une mutation récurrente (V617F) dans le domaine pseudo-kinase (JH2) de Jak2 chez plus de 80% des patients atteints. Cette mutation occasionne une phosphorylation constitutive des tyrosines catalytiques de Jak2 et cause une hypersensibilité aux cytokines, ce qui induit une érythrocytose dans les modèles de souris. De plus, il semble que cette mutation spécifique ait été retrouvée dans d'autres types de désordres myéloprolifératifs (James et al., 2005).

1.1.1.1.3 La région N-Terminale (JH3-JH7)

La région N-terminale des Jaks, qui comprend les domaines d'homologie (JH) 3 à 7, est composée de 550 acides aminés et est relativement divergente entre les différents membres de cette famille de protéines (Kisseleva et al., 2002). Au niveau fonctionnel, cette région a été impliquée dans l'association aux récepteurs et la spécificité de cette liaison (Leonard et O'Shea, 1998; Ihle, 2001). Plusieurs études, effectuées avec des Jaks chimériques en N-terminal, ont indiqué que les JH6-7 servent à un minimum d'interaction pour Jak2 et Jak3 (Chen et al., 1997; Kohlhuber et al., 1997). À l'opposé, un segment JH additionnel est requis pour l'association de Tyk2 avec le IFNAR1 (*IFN- $\alpha\beta$ Receptor-1*) (Yan et al., 1998) et la région N-terminale entière de Jak1 semble être requise pour son association au récepteur de l'IFN- γ (Kohlhuber et al., 1997). Récemment, la modélisation structurale a permis de déterminer que les domaines JH3 et JH4 partagent quelques similarités avec les domaines SH2, et que les régions JH4 à JH7 forment un domaine FERM, pour *Four-point-one*, *Ezrin*, *Radixin*, *Moesin*, domaines qui favorisent les interactions protéines-protéines (Girault et al., 1998). Il est intéressant de noter que le domaine FERM a initialement été impliqué dans les interactions hétérotypiques entre les Jaks et d'autres kinases (Miyazaki et al., 1998; Zhu et al., 1999). Également, de récentes études suggèrent que le domaine FERM de Jak1 serait critique pour son interaction avec la portion cytoplasmique du récepteur gp130 (Hilkens et al., 2001). N'oublions pas que les

interactions des Jaks avec les récepteurs sont complexes, qu'elles peuvent possiblement impliquer des régions discontinues, et que la structure nécessaire aux interactions peut varier d'une Jak à une autre. De plus, la façon dont une Jak s'associe aux parties cytoplasmiques des récepteurs dépend du complexe-récepteur respectif. Il est également possible que les Jaks servent d'adaptateurs dans certaines conditions, suivant la découverte de leurs liaisons à diverses protéines, tel que Btk, Raf, SHP1, SHP2, STAM et SH2-Bb (Yetter et al., 1995; Xia et al., 1996; Takahashi-Tezuka et al., 1997; Yin et al., 1997; Takeshita et al., 1997; Rui et al., 1997).

1.1.1.2 Fonctions des Jaks

L'importance des membres de la famille des Jaks a été soulignée *in vivo* par des modèles murins déficients, dits « *knockout* », pour chacun des membres des Jaks. Ces modèles murins de délétion des gènes permettent de fournir des informations inestimables quant à la fonction de ces molécules. En effet, l'interaction de ces protéines est si complexe qu'un simple modèle *in vitro* ne peut permettre une représentation claire de l'ensemble des interactions moléculaires. Grâce, entre autre, à l'analyse de ces modèles murins, il est maintenant évident que les Jaks ont des fonctions non redondantes *in vivo* (O'Shea et al., 2002) (Tableau 1.1.).

Tableau 1.1. Rôles des Janus Kinases, révélés par la délétion du gène chez la souris (Adapté de Levy et Darnell, 2002).

Enzymes	Phénotypes des souris « <i>knockouts</i> » (^{-/-})
Jak1	Létales au niveau périnatal, probablement causé par une défaillance au niveau de la signalisation des cytokines dans la neurogénèse; défauts immunologiques causés par la défaillance de multiples cytokines hématopoïétiques
Jak2	Létales au niveau embryonnaire, causé par une défaillance de l'érythropoïèse; addition de défauts immunologiques causés par la défaillance de la signalisation des cytokines
Jak3	SCID (<i>Severe Combined Immunodeficiency</i>) causé par une défaillance au niveau de la signalisation des cytokines de récepteurs contenant une chaîne γ_c .
Tyk2	Augmentation de la susceptibilité aux agents pathogènes, causée par un défaut des réponses aux IFNs et à l'IL-12

1.1.1.2.1 Jak1

Plusieurs études biochimiques ont indiqué que Jak1 est impliqué dans la signalisation des membres de la famille du récepteur de l'IL-2, de la famille du récepteur de l'IL-4, de la famille du récepteur gp130 et des récepteurs de cytokines de classe II (Schindler et Strelow, 2000). En accord avec la fonction pléiotropique de ces récepteurs, les souris déficientes en Jak1 ($Jak1^{-/-}$) sont caractérisées par un phénotype létal périnatal (Rodig et al., 1998). Une analyse plus approfondie a permis de découvrir que ces souris souffraient d'une lésion neurologique qui les rendait incapables de se nourrir; une phénocopie d'un problème également retrouvé chez les souris déficientes en LIFRb. Par conséquent, il est suggéré qu'une perte des fonctions du LIF, au niveau neurologique, pourrait occasionner cette défaillance (Li et al., 1995; Ware et al., 1995). En accord avec cette hypothèse, la réponse au LIF et à l'IL-6 est grandement diminuée dans les tissus déficients en Jak1, en plus de l'importante défaillance au niveau des réponses biologiques aux interférons de type I et II, et à l'IL-10. Une défaillance significative dans la production de cellules B et de thymocytes, attribuée à un problème au niveau de la réponse à l'IL-7, a également été observée (von Freeden-Jeffry et al., 1995). Les souris $Jak1^{-/-}$ souffrent également d'immunodéficiência combinée sévère (*Severe Combined Immunodeficiency*, SCID) (O'Shea et al., 2002). Par conséquent, il a été établi que Jak1 joue un rôle primordial dans la réponse de plusieurs récepteurs de cytokines.

1.1.1.2.2 Jak2

En ce qui a trait à Jak2, plusieurs études ont permis de déterminer quel était son implication dans la signalisation des récepteurs à une seule chaîne, tel que les récepteurs de l'érythropoïétine, de la prolactine, de l'hormone de croissance, de la famille des récepteurs de l'IL-3, de la famille du récepteur gp130 et des récepteurs de cytokines de classe II (Schindler et Strehlow, 2000). La mutation de Jak2 ($Jak2^{-/-}$) est létale au niveau embryonnaire, plus précisément à 12.5 jours, chez les modèles murins. Cette létalité est due à une défaillance de l'érythropoïèse, établissant ainsi son implication dans la signalisation

de l'Epo (Wu et al., 1995; Neubauer et al., 1998, Parganas et al., 1998; O'Shea et al., 2002). Les cellules *Jak2^{-/-}* ne répondent pas à l'IL-3, la thrombopoïétine, le GM-CSF, l'IL-5 et l'IFN- γ . Par contre, elles répondent encore à l'IL-6, à l'IFN- α ainsi qu'aux familles de l'IL-2 et de l'IL-4. De plus, il semble que Jak2 ne soit pas essentiel pour le développement des cellules T (O'Shea et al., 2002).

1.1.1.2.3 Jak3

Comme mentionné précédemment, Jak3 est exprimé majoritairement dans les cellules hématopoïétiques, ce qui laisse entrevoir un rôle davantage limité au niveau de la signalisation des cytokines (Leonard et O'Shea, 1998). La signalisation de Jak3 est impliquée au niveau des récepteurs utilisant une chaîne gamma (γ), tel que IL-2R, IL-4R et IL-7R (Leonard et O'Shea, 1998). Les modèles murins déficients en Jak3 (*Jak3^{-/-}*) sont viables dans un environnement spécifiquement libre de tout pathogène (Nosaka et al., 1995; Park et al., 1995; Thomis et al., 1995). Ils démontrent une défaillance sévère dans la lymphopoïèse, similaire à celle observée chez les souris déficientes en chaîne γ avec laquelle s'associe Jak3 (Cao et al. 1995). Ces souris souffrent également de SCID, avec entre autres, un nombre diminué de cellules lymphoïdes (Baird et al., 2000). Ces modèles murins ont une différence majeure avec la déficience de Jak3 chez l'Homme. En effet, les patients souffrent également de SCID avec une diminution de cellules lymphoïdes, mais ils ont des cellules B normales, contrairement aux modèles murins. Cette différence est attribuable au fait que l'IL-7 n'est pas essentiel chez l'Homme pour la croissance des « *pre-B cell* », mais l'est chez la souris (Leonard et O'Shea, 1998). De plus, Jak3 joue un rôle dans la régulation de Bcl-2 et Bax, ce qui explique que les cellules lymphoïdes produites chez les souris *Jak3^{-/-}* sont plus sensibles à l'apoptose (Wen et al., 2001).

1.1.1.2.4 Tyk2

Plusieurs études biochimiques avaient préalablement suggéré que Tyk2 aurait une contribution au niveau de la signalisation de l'IL-6, de l'IL-10 et de l'IL-12 (Schindler et

Strehlow, 2000). Par contre, il semble que, contrairement aux autres Jaks, les fonctions non redondantes de Tyk2 *in vivo* sont moindres. En effet, les modèles murins déficients en Tyk2 (*Tyk2^{-/-}*) ne montrent que de subtiles différences dans la signalisation des IFNs α et β , et seulement lorsqu'utilisés à faibles doses, tandis qu'elles ont une réponse anti-virale normale aux doses standards d'IFNs. Par contre, une défaillance au niveau de la signalisation de l'IL-12 a été observée, bien que celle à l'IL-10 semble pratiquement normale et que celle à l'IL-6 est tout à fait normale (Karaghiosoff et al., 2000; Shimoda et al., 2000). Finalement, les macrophages de souris *Tyk2^{-/-}* présentent une défaillance dans la réponse au LPS (Bogdan et al., 2000).

1.1.2 Les STATs (Signal Transducers and Activators of Transcription)

La signalisation intercellulaire est critique pour la régulation du développement, le contrôle de la croissance, et l'homéostasie des organismes multicellulaires. La voie des STATs a été retrouvée dans les mollusques, les vers, les mouches et les vertébrés, mais elle est absente chez les fungi et les plantes (Darnell, 1997a). Chez les mammifères, la famille des STATs compte sept membres structurellement et fonctionnellement reliés; STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B et STAT6. Il est important de noter que des formes épissées de STAT1, STAT3 et STAT4 (STAT1/3/4b) ont aussi été découvertes (Schindler et Strehlow, 2000). Les STATs ont été caractérisées comme des facteurs de transcription induits par des ligands, d'abord les IFNs, puis par la suite, dans diverses cellules et tissus exposés à plusieurs autres polypeptides (Darnell, 1997b). Au tournant du dernier siècle, le séquençage du génome humain a permis de s'assurer qu'il n'existait aucun autre gène encodant de nouvelles STATs, jusqu'à présent inconnu (Ihle, 2001).

1.1.2.1 Structure des STATs

Les sept protéines STATs, identifiées chez les mammifères, ont une taille se situant entre 750 et 850 acides aminés. Les STATs partagent des domaines structurels et fonctionnels conservés, ce qui s'expliquerait par le fait qu'ils proviendraient tous du même

gène primordial. Au cours de l'évolution, la duplication de ce gène, probablement due à un besoin augmentant de communication cellule-cellule, aurait rendu possible la formation des autres gènes. Les STATs possèdent plusieurs domaines : le domaine N-terminal, le domaine *coiled-coil* (CCD), le domaine de liaison à l'ADN (DBD), le domaine d'activation transcriptionnelle (TAD) situé en C-terminal, le domaine SH2 et finalement le domaine *linker*.

Le domaine N-terminal des STATs est conservé au travers des membres de cette famille et il comprend environ 130 acides aminés. Ce domaine représente une partie stable de la protéine, repliée de façon indépendante, et qui peut être clivée de la protéine pleine longueur par protéolyse limitée (Vinkemeier et al., 1998). Le domaine N-terminal forme un dimère et il est composé d'un ensemble de cinq hélices courtes formant un anneau (Kisseleva et al., 2002). Plusieurs études ont impliqué ce dimère dans la régulation de la translocation nucléaire des STATs, en contribuant à la liaison aux éléments GAS en tandem et à l'interaction de diverses protéines, tel que le co-activateur transcriptionnel CBP/p300, la famille des régulateurs négatifs de STATs, PIAS, ou à certains domaines de récepteurs (Leung et al., 1996; Vinkemeier et al., 1998; Horvath, 2000). Tout récemment, plusieurs études ont proposé que ce domaine est également responsable de la formation de dimères non-phosphorylés des STATs et qu'il pourrait influencer la conformation spatiale de ces mêmes dimères (Ota et al., 2004; Zhong et al., 2005; Mao et al., 2005).

Le domaine *coiled-coil* (CCD) est composé de quatre hélices alpha d'environ 180 acides aminés et il est relié au domaine N-terminal par une chaîne polypeptidique flexible (Kisseleva et al., 2002). La cristallisation des structures des STATs 1 et 3 a permis de découvrir que ce domaine déborde latéralement d'environ 80 Å du noyau de ces structures, ce qui forme une surface hydrophile prédominante disponible pour les interactions spécifiques avec d'autres protéines, tel que p48/IRF9, c-Jun et Nmi (*N-myc interaction protein*) (Horvath et al., 1996; Becker et al., 1998; Chen et al., 1998; Zhu et al., 1999). De récentes études ont également impliqué ce domaine dans la liaison des STATs avec les récepteurs, sa phosphorylation en tyrosine et même son export nucléaire (Begitt et al.,

2000; Zhang et al., 2000). En effet, un groupe de chercheurs a même caractérisé certains résidus essentiels pour la translocation nucléaire de STAT3 en réponse à l'EGF (*Epidermal Growth Factor*) et à l'IL-6; les résidus arginine 214/215 se situant dans l'hélice alpha2 de ce domaine (Ma et al., 2003). Des formes de STAT3, dont ces résidus ont été mutés en alanine, n'entrent pas au noyau bien qu'elles soient phosphorylées en tyrosine de façon normale en réponse à l'EGF et à l'IL-6. Ce même groupe a démontré, pour la première fois, qu'il y avait une séquence localisée dans le domaine *coiled-coil* qui est impliquée dans la translocation nucléaire de STAT3, induite par un ligand.

Le domaine de liaison à l'ADN, appelé DBD pour *DNA binding domain*, est formé d'environ 160 acides aminés. Il est composé de feuillets bêtas enroulés en forme de structures cylindriques, communément appelées barils bêtas. Ces barils bêtas sont repliés de façon similaire aux immunoglobulines et sont positionnés en C-terminal du domaine *coiled-coil* (Kisselevea et al., 2002). Deux sites de liaison distincts des STATs ont été caractérisés dans la réponse aux IFNs, soit ISRE (*IFN stimulated response elements*) pour les IFNs de type I et GAS (*interferon-gamma-activated site*) pour les IFNs de type II (Kessler et al., 1988; Decker et al., 1997; Schindler et Brutsaert, 1999). Ces éléments GAS sont des palindromes comportant des séquences consensus (TTN₅₋₆AA où N représente n'importe lequel des nucléotides) et disposés en tandem (environ 6-10 paires de bases de distance) dans les promoteurs de gènes cibles des STATs, permettant ainsi une différence de sélectivité de liaison. La spécificité de liaison est déterminée en partie par le nombre de nucléotides se trouvant entre les moitiés de séquences palindromiques (Decker et al., 1997; Ehret et al., 2001). De plus, ces sites tandem contiennent souvent des éléments GAS non-consensus (Soldaini et al., 2000, Ehret et al., 2001). Il est intéressant de noter que le contact direct entre les résidus d'acides aminés du domaine DBD des STATs et l'ADN est très limité, ce qui explique la faible constante de dissociation de ces STATs avec l'ADN. Il est donc essentiel de faciliter la liaison à l'ADN des STATs afin d'obtenir une activité transcriptionnelle efficace. Une séquence spécifique de ce domaine (les résidus arginine 414/417) a été démontrée comme régulant la localisation nucléaire de STAT3 ainsi que sa liaison à l'ADN (Ma et al., 2003).

Le domaine *linker* est composé d'environ 88 acides aminés pour STAT1 et de 120 acides aminés pour STAT3. Il relie le domaine DBD au domaine SH2. Des études de cristallographie et de mutagenèse ont permis de déterminer, dans le cas de STAT1, que la capacité de liaison à l'ADN des STATs pourrait être régulée par les changements structuraux du domaine SH2, lorsqu'il lie un résidu phosphotyrosine. De plus, le domaine *linker* pourrait être impliqué dans la régulation de la transcription des STATs (Cheng et al., 1998; Yang et al., 1999).

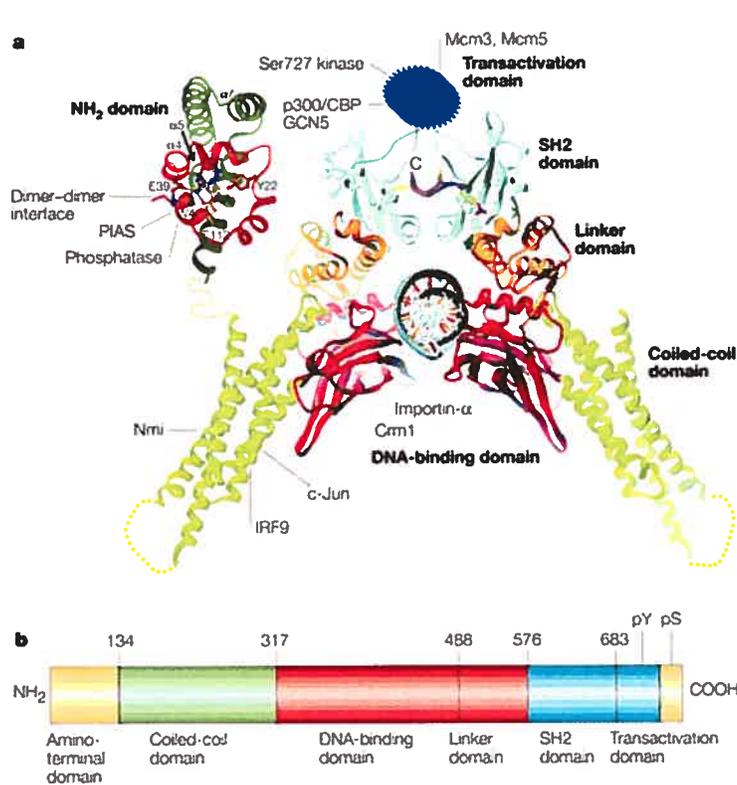


Figure 1.2. Structure des domaines et des sites de liaison aux protéines des STATs (tiré de Levy et Darnell, 2002). a. Le noyau de la structure cristalline de STAT1 (acides aminés 130-712 environ) expose la liaison d'un dimère de STAT1 et la localisation des sites de liaison de plusieurs protéines dans divers domaines. On remarque les domaines SH2 qui sont responsables de la dimérisation des STATs (bleu), les domaines de liaison à l'ADN (rouge) ainsi que les domaines coiled-coil (vert) (CBP, *CREB binding protein*; IRF, *interferon regulatory factor*; Mcm, *minichromosome maintenance*; Nmi, *N-Myc interactor*; PIAS, *protein inhibitor of activated STAT*) b. Domaines caractéristiques des STATs. La région N-terminale (*Amino-terminal domain*), la région *coiled-coil* (*Coiled-coil domain*), le domaine de liaison à l'ADN (*DNA-binding domain*), la région servant de lien avec le domaine C-terminal (*Linker domain*), le domaine SH2 (*SH2 domain*) et le domaine de transactivation (*Transactivation domain*). pY et pS représentent les résidus tyrosine et sérine phosphorylés, respectivement.

Le domaine SH2, composé d'environ 100 acides aminés, est le domaine majoritairement responsable de la dimérisation des STATs, dû à sa capacité de lier de façon

spécifique des résidus tyrosine phosphorylés (Figure 1.2). Ce domaine est le domaine le plus hautement conservé au travers des STATs (Kisseleva et al., 2002). Il est composé d'un feuillet bêta anti-parallèle, flanqué de deux hélices alpha, ce qui forme une poche qui comprend à sa base une arginine conservée (Arg 602 pour Stat1 et 609 pour Stat3). Cette arginine a pour rôle de relayer les interactions avec les phosphates. Ce domaine SH2, en plus de servir à l'interaction directe d'homo- ou d'hétéro- dimérisation entre les STATs (Shuai et al., 1994; Schindler et al., 1995; Gupta et al., 1996; Darnell, 1997b), permet le recrutement des STATs aux différents récepteurs des cytokines par un motif phosphotyrosine, ainsi que leur interaction avec les Jaks activées (Gupta et al., 1996; Barahmand-Pour et al., 1998). Il a été démontré, par cristallographie, que la dimérisation des STATs dépend de l'interaction entre un domaine SH2 d'un monomère, ainsi que du segment de la queue d'un autre monomère de STAT contenant le résidu tyrosine phosphorylé. Plusieurs résidus ont été démontrés comme jouant un rôle important dans la spécificité de l'interaction entre les domaines SH2 et les motifs tyrosine des STATs, soit les résidus en C-terminal de la phosphotyrosine, +1, +3, +5, +6, +7 (Chen et al., 1998). Un domaine SH2 classique s'étend des résidus 580 à 680, suivi du résidu tyrosine phosphorylable aux environs de 700. En C-terminal de ces structures se retrouve le domaine TAD, comprenant de 38-220 résidus de longueur, selon les STATs.

Le domaine d'activation de la transcription, ou TAD (*transcriptional activation domain*), se trouve en C-terminal des STATs et est très peu conservé chez les membres de cette famille de protéines. Cette caractéristique explique la possibilité de chacun des membres de réguler différentes réponses transcriptionnelles (Kisseleva et al., 2002). Comme mentionné précédemment, des isoformes tronquées en C-terminal ont été identifiées pour différentes STATs. C'est avec celle de STAT1 que l'on remarqua cette perte des 38 derniers acides aminés, comparativement à STAT1 pleine longueur (Schindler et al., 1992). Ces isoformes tronquées, appelées β , ont été démontrées comme jouant un rôle de régulateur dominant négatif. Il est primordial de noter que c'est dans ce domaine que se retrouve un résidu sérine, caractérisé comme un des deux résidus phosphorylables des STATs. En effet, plusieurs groupes de recherche ont démontré, par des études de gènes

rapporteurs, l'importance de la phosphorylation de ce résidu sérine de différentes STATs dans la modulation de leur activité transcriptionnelle (Wen et al., 1995; Visconti et al., 2000; Decker et Kovarik, 2000). Il est suggéré que la phosphorylation en sérine favorise une activité transcriptionnelle maximale de certains des gènes cibles des STATs, et qu'elle pourrait affecter leur affinité pour d'autres facteurs de transcription, tel que MCM5 et BRCA1, mais pas pour CBP/P300 (Kisseleva et al., 2002). De plus, des souris « *knock-in* » STAT1 S727A et STAT3 S727A ont été générées. Ces souris démontrent que le domaine TAD, ainsi que la phosphorylation de la sérine 727 de STAT 1 et 3, amène une contribution importante dans l'activité transcriptionnelle de ces mêmes STATs, mais qu'elle augmente uniquement l'expression de certains gènes cibles (Kovarik et al., 2001). Ces souris sont viables, malgré une augmentation de la létalité périnatale. De plus, nous savons maintenant que la sérine 727 contribue à l'activation des macrophages et aux réponses immunes dépendantes de l'IFN- γ *in vivo* (Pilz et al., 2003; Varinou et al., 2003). Dans le cas des souris STAT3 S727A, des croisements ont été effectués avec des souris *STAT3*^{+/-} afin d'étudier l'impact de la compensation de la phosphorylation en tyrosine uniquement, chez ces souris. Il a été observé que ces souris présentent une augmentation de la létalité périnatale. Les souris qui survivent à la naissance présentent une masse d'à peine 50-60% de la masse normale après une semaine d'âge. Également, un niveau anormalement bas d'IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor-1*) dans le sérum, démontre l'importance de la sérine 727 dans la signalisation de l'IGF-1, au niveau du développement embryonnaire et périnatal (Shen et al., 2004).

1.1.2.2 Fonctions des STATs

Tout comme pour les Jaks, les modèles murins « *knockout* » des différentes STATs ont permis de caractériser davantage leur rôle *in vivo*. Ces modèles ont également permis de déterminer si les STATs avaient un rôle redondant ou bien distinct, une par rapport à l'autre, suivant l'agoniste ou le stimulus les activant (Tableau 1.2.).

Tableau 1.2. Rôles des protéines STATs, révélés par la délétion du gène chez la souris (Adapté de Levy et Darnell, 2002).

Protéines STATs	Phénotypes des souris « <i>knockouts</i> » (^{-/-})
STAT1	Défauts des réponses aux IFNs; augmentation de la susceptibilité aux tumeurs; défaut du contrôle de la croissance.
STAT2	Défauts des réponses aux IFNs
STAT3	Létales au niveau embryonnaire; multiples défauts dans les tissus adultes incluant des défauts de survie cellulaire (positive et négative) et des défauts des réponses aux agents pathogènes.
STAT4	Défauts de différenciation des cellules Th1 causés par la perte de réponse à l'IL-12
STAT5 A	Défauts de développement des glandes mammaires causés par la perte de la réponse à la prolactine
STAT5 B	Défauts de croissance causés par la perte de la réponse à l'hormone de croissance
STAT6	Défauts de différenciation des cellules Th2 causés par la perte de la réponse à l'IL-4

1.1.2.2.1 STAT1

La caractérisation de la voie de signalisation des IFNs a permis de découvrir STAT1. En effet, il semble que l'importance de cette STAT pour ces cytokines a été clairement établie, principalement par l'étude des souris déficientes en STAT1 (*STAT1*^{-/-}), confirmant ainsi les découvertes effectuées dans des lignées cellulaires modifiées génétiquement (Darnell et al., 1994; Durbin et al., 1996; Meraz et al., 1996). Ces souris « *knockout* » sont défailtantes dans leurs réponses immunitaires dépendantes aux IFNs, et donc, hautement susceptibles aux infections microbiennes et virales, ainsi qu'à la formation de tumeurs. Ces souris ont également servi de modèle d'étude afin de démontrer l'implication de STAT1 dans le rôle protecteur de l'IFN- γ contre la formation de tumeurs spontanées et induites de façon chimique (Kisseleva et al., 2002). Plusieurs autres cytokines et facteurs de croissance ont été démontrés comme activant STAT1, même si aucune défaillance majeure au niveau de ces voies de signalisation n'a été observée dans les souris *STAT1*^{-/-}. Il semble que STAT1 a un rôle important au niveau d'effets proapoptotiques, en plus de contrôler l'expression de protéines impliquées dans la présentation d'antigènes (Chin et al., 1997; O'Shea et al., 2002). Ces souris ont également permis de démontrer un rôle important de STAT1, *in vivo*, dans la signalisation de facteurs de croissance, tel que le

FGF (*Fibroblast Growth Factor*) (Sahni et al., 1999, Sahni et al., 2001). En résumé, il semble que STAT1 joue davantage un rôle de régulateur négatif de la prolifération cellulaire, contrastant avec les rôles des autres STATs, plus particulièrement STAT3 et STAT5 (O'Shea et al., 2002).

1.1.2.2.2 STAT2

STAT2, le membre le plus divergent de cette famille de protéines, exerce une fonction majeure au niveau de la signalisation de l'IFN- α/β , démontrée en partie par la défaillance de cette signalisation dans les souris déficientes en STAT2. Bien qu'elles soient viables et fertiles, ces souris sont sensibles aux infections virales (Park et al., 2000). Il est intéressant de noter que STAT2 est le seul membre des STATs qui ne lie pas les éléments GAS lorsqu'il est activé, et qu'il possède un domaine TAD unique (Park et al., 1999). De plus, il semble que STAT2, en réponse à l'IFN- α , joue un rôle dans l'expression de STAT1 dans les fibroblastes embryonnaires de souris (MEF), mais pas dans les macrophages (O'Shea et al., 2002). L'identification d'un complexe STAT2/STAT2/p48 dans les cellules déficientes en STAT1 supporte l'existence d'une voie de signalisation alternative de STAT2, en plus de son rôle de partenaire hétérodimérique de STAT1, et de servir à son expression (Bluyssen et Levy, 1997). Plusieurs études ont proposé différents modèles d'activation de STAT2 en réponse à l'IFN- α , sans pour autant pouvoir les généraliser dans différentes espèces ou différentes lignées (Leung et al., 1996; Park et al., 2000; Farrar et al., 2000). Malgré le fait que STAT2 est un des premiers membres de cette famille à avoir été cloné, il reste un des moins caractérisés (Kisseleva et al., 2002).

1.1.2.2.3 STAT3

STAT3 a été identifié à l'origine comme un facteur de transcription de la phase aiguë de la réponse immunitaire activée par l'IL-6, bien que l'on sache maintenant qu'il est activé par une multitude de cytokines et de facteurs de croissance (Akira et al., 1994; O'Shea et al., 2002). Plus récemment, des formes actives de STAT3 ont été retrouvées dans

plusieurs types de tumeurs humaines et murines, provenant de divers types de cancers, tel que le cancer du sein, de la tête et du cou, des poumons, du rein, de la prostate, des ovaires et dans les leucémies (Bowman et al., 2000; Levy et Gilliland, 2000). De plus, STAT3 est caractérisé comme un oncogène, régulant la transformation de fibroblastes dépendante de Src (*Sarcoma*) (Bowman et al., 2000). Il est aussi connu qu'un mutant constitutivement actif de STAT3 induit la tumorigénèse (Bromberg et al., 1999). Ces observations ont donc récemment incité les équipes de chercheurs à mieux comprendre la régulation de la croissance cellulaire par STAT3. STAT3 est exprimé dans la majorité des tissus et, parce que la délétion du gène de STAT3 est létale au niveau embryonnaire à 7.5 jours de gestation, de nouveaux modèles d'études appelés « *knockout* » tissu-spécifique (dont la déficience de la protéine en question est ciblée dans certains tissus uniquement) ont été générés par la technologie Cre-lox (Takeda et al., 1997; Akira, 2000). Les souris déficientes en STAT3 (*STAT3*^{-/-}), de façon tissu-spécifique, n'ont pas de problèmes majeurs de développement. Cependant, les cellules T et les hépatocytes déficients en STAT3 présentent un défaut dans leur réponse à l'IL-6 (Alonzi et al., 2001). Ces cellules T ont perdu l'action proliférative de cette cytokine (Takeda et al., 1998), tandis que les hépatocytes exhibent une défaillance au niveau de l'induction des gènes impliqués dans la phase aiguë de sa réponse immunitaire (Alonzi et al., 2001). Au niveau des macrophages et des neutrophiles *STAT3*^{-/-}, une production exagérée de cytokines est observée, probablement due à la défaillance de la réponse de ces cellules à l'IL-10 (Takeda et al., 1999). De plus, l'absence de STAT3 dans les kératinocytes occasionne des défauts au niveau des cheveux et de la peau (Sano et al., 1999). Dans ces cellules, la réponse à l'EGF, à l'HGF, au TGF- α et à l'IL-6, est altérée dans les essais de cicatrisation et de migration *in vivo*. Les glandes mammaires *STAT3*^{-/-}, quant à elles, présentent un défaut du processus de mort cellulaire programmée qui se produit durant leur involution (Chapman et al., 1999). Des souris déficientes pour l'isoforme STAT3 β exhibent une diminution du rétablissement suite à un choc endotoxique et une réponse exagérée des gènes inductibles par des endotoxines au niveau du foie; une première évidence que les isoformes de STATs ont des rôles essentiels *in vivo* (Yoo et al., 2002). Suivant cette découverte, un autre groupe a étudié le rôle de chacune des isoformes de STAT3 (α et β) afin de déterminer leur rôle spécifique

in vivo. Il a été démontré que l'isoforme STAT3 β ne joue pas un rôle de dominant négatif, mais que son expression peut « sauver » la létalité embryonnaire reliée à une déficience de STAT3, en plus d'avoir la capacité d'induire l'expression de gènes cibles spécifiques de STAT3 (Maritano et al., 2004). Il est important de mentionner que l'isoforme α de STAT3 a également un rôle non-redondant, dont la modulation des réponses cellulaires à l'IL-6 ainsi que la médiation des fonctions de l'IL-10 dans la macrophages (Maritano et al., 2004). STAT3 est activé en réponse aux récepteurs de facteurs de croissance et facilite l'expansion cellulaire en transactivant des gènes encodant des protéines qui augmentent la survie, tel que Bcl-2 et Bcl-XL (Sakai et Kraft, 1997; Grad et al., 2000). De plus, STAT3 et STAT5 sont souvent activés dans plusieurs autres types cellulaires transformés par différents oncogènes, comme v-Src et BCR-Abl (Nelson et al., 1998; Danial et Rothman, 2000; Bowman et al., 2001). Donc, ces STATs semblent fonctionner de façon à promouvoir la croissance et/ou la survie de cellules transformées, à l'opposé de STAT1, qui lui, inhibe ces fonctions.

1.1.2.2.4 STAT4

Contrairement aux autres STATs, STAT4 qui a été identifié par un criblage d'homologues de STATs, n'est exprimé que dans les cellules NK (*Natural Killer*), les cellules dendritiques et les lymphocytes T. Il est, entre autre, impliqué dans la signalisation de l'IL-12, jouant un rôle prédominant dans le développement des cellules Th1 (*T helper-1*) (Schindler et Strehlow, 2000). Ces observations ont été confirmées par la génération de souris déficientes en STAT4 (*STAT4^{-/-}*) (Kaplan et al., 1996b; Thierfelder et al., 1996). En effet, une défaillance au niveau de la différenciation des cellules T naïves CD4⁺ en Th1 et de la production d'IFN- γ en réponse à l'IL-12, a été observée. Somme toute, ces souris ont des phénotypes très similaires aux souris *IL-12^{-/-}* et *IL-12R^{-/-}* (Wurster et al., 2000). Les souris *STAT4^{-/-}* sont moins sensibles aux maladies autoimmunes, tel que l'arthrite et le diabète, mais elles le sont davantage aux infections microbiennes (Chitnis et al., 2001). En résumé, il semble que STAT4 relaye uniquement les signaux provenant de l'IL-12 et donc, joue un rôle prédominant dans le développement des cellules Th1, incluant l'expression des

récepteurs de l'IL-12 et de l'IL-18 sur ces cellules (Lawless et al., 2000). Par contre, les gènes cibles de STAT4 qui exercent ces actions n'ont toujours pas été identifiés, bien que de récentes études suggèrent que STAT4 joue principalement un rôle dans la production d'IFN- γ , qui lui, serait essentiel pour la différenciation des cellules Th1 (Lund et al., 2004).

1.1.2.2.5 STAT5 A et B

Plusieurs études biochimiques tentant d'identifier des facteurs de transcription de l'IL-3, ainsi que divers criblages de cDNA, ont permis d'identifier STAT5 A et B. Ce sont deux séquences hautement similaires, encodées par deux gènes ayant 96% d'homologie entre eux, et ne différant qu'à leur extrémité C-terminal (Azam et al., 1995; Mui et al., 1995). Ces deux STATs sont exprimés dans tous les tissus, en plus d'être activés par une panoplie de cytokines de la famille de l'IL-3 et de l'IL-2, de différents facteurs de croissance et de la prolactine (Arnould et al., 1999; Asao et al., 2001). Par des études *in vitro*, utilisant des formes inactives de STAT5, il a été permis de démontrer une redondance fonctionnelle entre les deux isoformes de STAT5 (Moriggl et al., 1996). Il est intéressant de noter que les souris « *knockout* » simple pour STAT5 A ou B ont des phénotypes très distincts, et que les souris dites double « *knockout* » ($STAT5A^{-/-}B^{-/-}$) exhibent un phénotype combiné. Les souris $STAT5A^{-/-}$ sont défailantes au niveau du développement des glandes mammaires dépendant de la prolactine (Liu et al., 1997). Les souris $STAT5B^{-/-}$, quant à elles, ont un retard de développement sexuel dimorphique et exhibent des défauts similaires aux souris déficientes pour le récepteur du GH (Udy et al., 1997). De plus, ces souris développent une perte de masse corporelle dramatique avec l'âge (Fain et al., 1999). Il est intéressant de noter que les souris double « *knockout* » présentent ces mêmes défauts, mais de façon beaucoup plus sévères que les souris simple « *knockout* » (Teglund et al., 1998). Les souris $STAT5A^{-/-}B^{-/-}$ ont permis d'évaluer le rôle de STAT5 dans le développement de tumeurs hématopoïétiques, incluant celles attribuées aux oncogènes TEL-Jak2 et v-Abl/BCR-Abl. Il a été démontré que la perte de STAT5 empêche la transformation par TEL-Jak, mais pas celle induite par v-Abl ou BCR-Abl (Schwaller et al., 2000; Sexl et al., 2000). Un fait intéressant est que la transformation des lignées myéloïdes peut être

substituée par l'expression d'OSM (*Oncostatin M*), un gène cible de STAT5, l'impliquant dans la pathogénèse de cette maladie. De plus, il est à noter que ce phénomène crée un lien avec STAT3, qui lui, est activé par l'OSM (O'Shea et al., 2002). D'autre part, la perte de STAT5 a une conséquence désastreuse sur le développement des cellules immunitaires. Les lymphocytes T des souris double « *knockout* » présentent des défauts importants; les cellules T ont une défaillance majeure dans leur habilité à proliférer en réponse à l'IL-2 et il y a absence de cellules NK (Suzuki et al., 1995; Moriggl et al., 1999). Ces souris, tout comme les souris *IL-2^{-/-}*, développent des maladies autoimmunes (O'Shea et al., 2002).

1.1.2.2.6 STAT6

STAT6, qui a été purifié d'extraits de cellules stimulées à l'IL-4, est également activé par l'IL-13 qui partage une chaîne de récepteurs avec l'IL-4 (Hou et al., 1994; Lin et al., 1995). Il est important de noter que l'IL-4 et l'IL-13 jouent un rôle important dans la régulation de l'immunité acquise. Les souris *STAT6^{-/-}* ont un défaut au niveau de la différenciation des cellules Th2, plus sévère que celui observé chez les souris *IL-4^{-/-}*, dû à la défaillance combinée de la signalisation de l'IL-4 et de l'IL-13 (Kaplan et al., 1996a; Shimoda et al., 1996; Takeda et al., 1996). Il a été suggéré que STAT6 régule l'expression de GATA-3 et c-Maf, deux facteurs de transcription importants pour les fonctions des cellules Th2 (Ouyang et al., 1998). En plus d'observer une augmentation de l'activité anti-tumorale chez les souris *STAT6^{-/-}*, ce modèle de souris présente une augmentation du taux de mortalité, d'inflammation et de production de cytokines, en réponse à un choc endotoxique non infectieux. Par contre, dans des modèles infectieux, le taux de mortalité est réduit et il y a présence d'une défense accrue contre les bactéries (Terabe et al., 2000; Lentsch et al., 2001; Matsukawa et al., 2001).

1.1.3 Régulation de la voie de signalisation Jak/STAT

La voie de signalisation Jak/STAT est importante pour plusieurs réponses de l'hôte incluant la réponse aux agents pathogènes, la différenciation, la prolifération et l'oncogénèse. Ce n'est donc pas surprenant qu'il existe plusieurs niveaux de régulation afin de finement moduler l'activité de cette voie de signalisation. L'effet de ces processus de régulation détermine l'efficacité de la transduction des signaux des STATs, et ceci est effectué en partie par les Jaks. Il est important de mentionner que la récente découverte de l'implication des petites protéines G dans l'activation de la voie Jak/STAT en réponse aux GPCRs, complexifie grandement la compréhension de la signalisation intracellulaire de cette voie. En effet, non seulement les GPCRs activent plusieurs voies en parallèle, mais il est également connu que les petites protéines G, dont Rac particulièrement, sont impliquées dans divers phénomènes physiologiques tel que la migration et la prolifération cellulaire, mais également dans plusieurs voies de signalisation, dont NF-kB (Boyer L et al., 2004).

1.1.3.1 Activation des Janus kinases

1.1.3.1.1 Par les récepteurs de cytokines

Le mode d'activation des Jaks par les cytokines est un mécanisme qui a été largement étudié et caractérisé. Bien que la voie Jak/STAT a été découverte en lien avec les IFNs, nous nous attarderons davantage aux cytokines de la famille de l'IL-6 dans cette section. C'est en 1994 qu'il a été montré que les cytokines de la famille de l'IL-6 utilisaient des tyrosines kinases de la famille des Jaks, ainsi que les STATs, comme médiateurs majeurs de la transduction de leurs signaux; ce qu'ils partagent avec plusieurs autres cytokines tel que l'IFN, ainsi que plusieurs facteurs de croissance (Lütticken et al., 1994; Stahl et al., 1994; Darnell et al., 1994). L'oligomérisation d'un récepteur de cytokines, induite par sa liaison avec un ligand, permet aux Jaks associées aux sous-unités gp130 d'être mises à proximité l'une de l'autre. Ainsi, les Jaks peuvent s'activer par trans- et auto-phosphorylation sur leurs résidus tyrosine catalytiques et phosphoryler les sous-unités gp130 (Ihle et al., 1995b; Pellegrini et Dusanter-Fourt, 1997; Duhé et al., 1998). Plusieurs

résidus phosphotyrosine de gp130 sont des sites d'ancrage des STATs, principalement STAT 1 et 3, qui peuvent s'y lier par leur domaine SH2 (Stahl et al., 1995; Gerhartz et al., 1996). Une fois recrutées, les STATs sont phosphorylées par les Jaks, forment des dimères et transloquent au noyau où elles régulent la transcription de plusieurs gènes (Figure 1.3.).

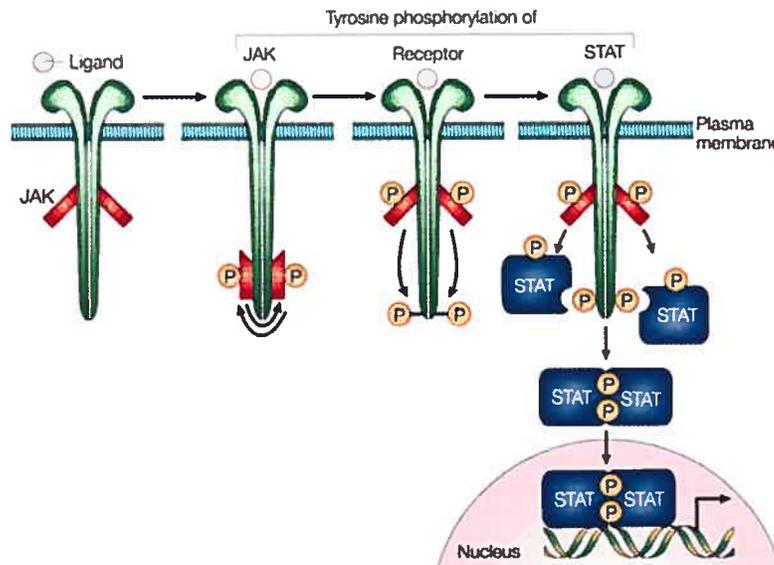


Figure 1.3. Activation de la voie de signalisation Jak/STAT en réponse aux cytokines (tiré de Levy et Darnell, 2002). La phosphorylation séquentielle de résidus tyrosine induite par l'interaction d'une cytokine avec son récepteur. La dimérisation du récepteur permet la transphosphorylation et l'activation des Janus Kinases (JAKs). L'étape suivante est la phosphorylation de la queue cytoplasmique du récepteur suivie du recrutement des protéines *Signal Transducers and Activators of Transcription* (STATs) par leur domaine SH2. Par la suite, se produit la phosphorylation en tyrosine des STATs, la dimérisation des STATs activées (phosphorylées en tyrosine) et, finalement, la translocation nucléaire des dimères de STATs.

Il est intéressant de noter que la phosphatase SHP2 lie la forme phosphorylée de gp130 (Stahl et al., 1995) formant un lien avec la voie des MAPKs qui est aussi activée en réponse aux cytokines de la famille de l'IL-6. Il est important de noter que lorsque les Jaks sont surexprimées très fortement dans les cellules de mammifères ou d'insectes, elles deviennent phosphorylées sur leurs résidus tyrosine catalytiques et, par conséquent, présentent une activité kinase même en l'absence d'un stimulus exogène (Quelle et al.,

1994; Duhé et al., 1995; Lai et al., 1995). Ceci semble démontrer qu'un contact rapproché entre ces kinases peut être suffisant pour induire leur activation.

Une question importante encore floue, est le rôle hiérarchique et la redondance fonctionnelle des Jaks dans l'activation de cette voie de signalisation. En effet, il a été démontré que Jak1 est essentiel dans l'activation de la voie Jak/STAT en réponse aux cytokines de la famille de l'IL-6. Des cellules déficientes en chacune des Jaks ont permis de pousser un peu plus loin cette observation. Effectivement, Jak2 et Tyk2, bien que phosphorylées, n'ont pas permis de substituer Jak1 dans les cellules déficientes en Jak1, en réponse à l'IL-6 (Guschin et al., 1995). Par contre, au niveau de l'activation par l'IL-11, Jak1 joue un rôle équivalent aux autres Jaks (Dahmen et al., 1998). De plus, diverses lignées cellulaires dérivées de souris déficientes en Jak1 n'ont pas la capacité de manifester les réponses biologiques des cytokines de la famille de l'IL-6 (Rodig et al., 1998), bien que des cellules dérivées de souris déficientes en Jak2 le peuvent (Parganas et al., 1998). Cependant, il est important de noter que la surexpression de formes dominantes-négatives de Jak2 inhibe la signalisation via gp130, ce qui indique que Jak2 et Jak1 pourraient compétitionner pour des sites de liaisons communs sur le récepteur (Guschin et al., 1995; Schiemann et al., 1997). Finalement, les études de reconstitution de cellules déficientes en Jaks, par des formes inactives, ont permis de déterminer que Tyk2 a un rôle moins important que Jak1, qui est essentiel dans la réponse à l'IFN α . Ces études de reconstitution sont basées sur l'utilisation de cellules déficientes en une protéine X (X^{-/-}) et sur l'expression dans ces cellules, d'une forme inactive de cette même protéine. De ce fait, il est possible d'étudier le rôle de l'activité catalytique spécifique à cette protéine. Par ces modèles d'étude, il a été déterminé que la phosphorylation de Tyk2 n'est pas affectée par la perte de son activité catalytique (Gauzzi et al., 1996). De plus, la perte de l'activité kinase de Jak1 n'affecte pas la phosphorylation de Jak2 et l'activation des STATs en réponse à l'IFN γ . Finalement, la perte de l'activité catalytique de Jak2 entraîne une perte de la réponse à l'IFN γ (Muller et al., 1993). Il est donc possible de conclure qu'en plus de leur activité catalytique, les Jaks peuvent avoir un rôle structural, et que l'activité catalytique de certaines Jaks n'est pas nécessairement essentielle en réponse à tous les stimuli.

1.1.3.1.2 Par les récepteurs couplés aux protéines G; implication des petites protéines G de la famille Rho

Bien que la voie de signalisation Jak/STAT ait été découverte en lien avec son activation par les cytokines, plusieurs études ont démontré que cette voie peut également être activée par d'autres récepteurs, dont les GPCRs. Évidemment, ce mécanisme d'activation est beaucoup moins caractérisé, mais plusieurs groupes de chercheurs y ont porté une attention particulière au cours des dernières années. De plus en plus de GPCRs différents sont maintenant reconnus comme des activateurs de la voie Jak/STAT (Mellado et al., 1998; Rodriguez-Frade et al., 1999; Ju et al., 2000; Lukashova et al., 2001; Wong et al., 2001). Par contre, le mécanisme d'activation de la voie Jak/STAT en réponse aux GPCRs reste encore très peu caractérisé, contrairement au mécanisme de la réponse aux cytokines. Au cours des dernières années, il a été démontré que Jak2 doit être catalytiquement active afin d'être recrutée au récepteur AT1, ce qui laissait supposer un mécanisme d'activation des Jaks autre que celui déjà connu pour les cytokines. L'autophosphorylation des Jaks pourrait donc être l'étape préliminaire et essentielle à leur recrutement aux GPCRs ainsi que pour la signalisation subséquente (Marrero et al., 1995; Ali et al., 1997; Ali et al., 1998; Ali et al., 2000). Notre groupe a démontré que les petites protéines G ont un rôle prédominant dans l'activation des Jaks, et conséquemment des STATs, en réponse aux GPCRs. En effet, il est bien connu que les récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques activent également une autre famille de protéines, appelées petites protéines G. La superfamille des petites protéines G monomériques contient plus d'une centaine de membres qui sont généralement classés par similarité structurale en cinq sous-familles, soit la famille des GTPases Ras (Ras, Rap et Ral), la famille des GTPases Rho (Rho, Rac et Cdc42), la famille des GTPases Arf (Arf 1 à 6, Arf 11 à 17 et Sar), la famille des GTPases Rab (plus de 60 membres) et la famille des GTPases Ran (Takai et al., 2001). Ces GTPases fonctionnent comme des interrupteurs moléculaires qui contrôlent les fonctions cellulaires eucaryotiques en prenant deux formes interchangeable; une forme inactive liée au GDP et une forme active liée au GTP (Bos, 1998; Takai et al., 2001) L'étape

limitante de l'échange GDP/GTP, qui est la dissociation du GDP, est induite par l'association d'un GEF (*Guanine Exchange Factor*) dont l'activité peut être régulée par un signal en amont, comme par exemple, une protéine G hétérotrimérique. La liaison du GTP mène à un changement de conformation dans le domaine de liaison de l'effecteur en aval de la protéine G, de manière à ce que cette région interagisse avec un ou l'autre de ces effecteurs, dont la fonction est d'activer ou d'inactiver une variété de voies de signalisation. La forme liée au GTP des petites protéines G est convertie en forme liée au GDP, dû à leur activité GTPase intrinsèque stimulée par une GAP (*GTPase-activating protein*) (Bos, 1998; Takai et al, 2001). Les petites protéines G ont été impliquées dans plusieurs phénomènes durant la dernière décennie, dont la production de radicaux libres oxygénés (*ROS*) ainsi que la migration et la prolifération cellulaire (Sah et al., 2000).

Notre groupe a démontré que Rac et Rho sont essentiels à l'activation de la voie Jak/STAT par les GPCRs. Plus précisément, nous avons proposé que l'activation de Rac par les GPCRs, permet la production de *ROS* par le complexe NADPH oxydase qui, par la suite, permet l'activation des Jaks, possiblement en inhibant l'activité de protéines tyrosine phosphatases (PTPases) (Pelletier et al., 2003b) (Figure 1.4.). Il est connu que l'oxydation d'un résidu cystéine dans le site actif des PTPases les rend inactive, ce qui débalance l'équilibre phosphorylation-déphosphorylation des Jaks, favorisant leur autophosphorylation et ainsi, leur activation (Caselli et al., 1998, Cunnick et al., 1998). Nous avons également démontré que Rho est essentiel au niveau de l'activité transcriptionnelle des STATs, en réponse aux agonistes de GPCRs, sans pour autant contribuer à l'activation des Jaks ou à la phosphorylation en tyrosine des STATs (Pelletier et al., 2003b). Par la suite, il a été décrit par un autre groupe que le rôle de RhoA, au niveau de l'activité transcriptionnelle de STAT5 en réponse au GH, est d'inhiber l'activité de l'histone déacétylase 6 (HDAC6), recruté par le co-facteur transcriptionnel p300, et que ce rôle est dépendant de la Rho-kinase (ROCK) (Ling et al., 2004).

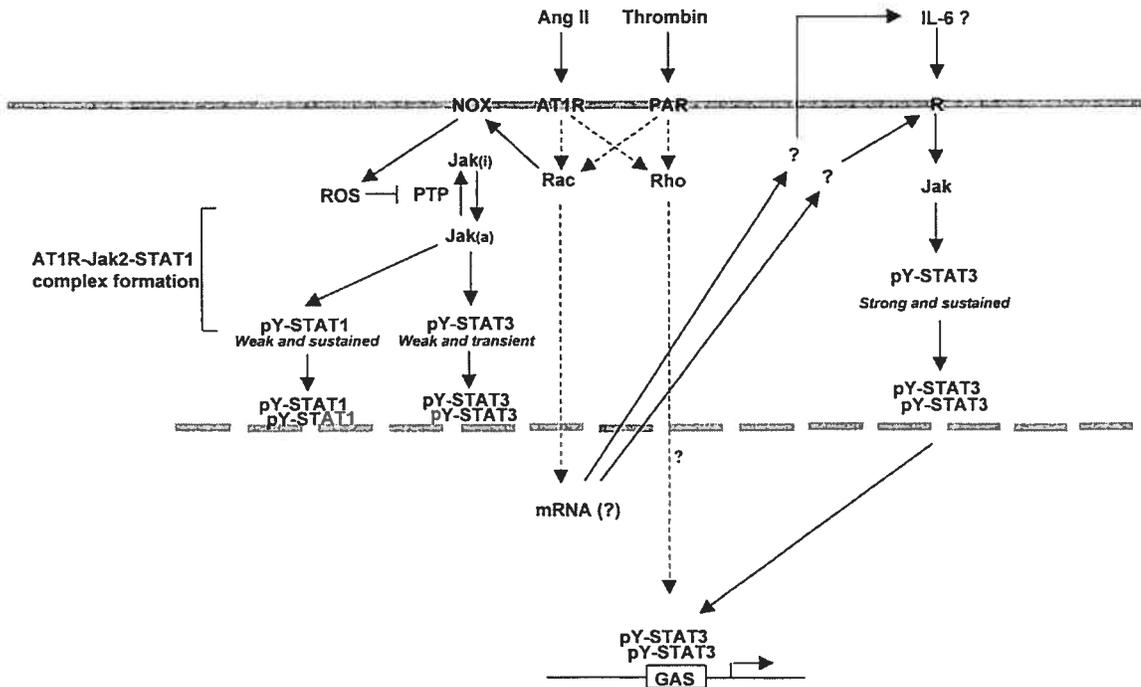


Fig 1.4. Modèle proposé du rôle des petites protéines G de la famille Rho dans la régulation de l'activation des Jaks et la transcription dépendante des STATs, en réponse aux GPCRs (tiré de Pelletier et al., 2003).

D'une part, nos travaux ont permis d'établir un lien entre les GPCRs et l'activation des Jaks, et d'autre part, d'observer que l'activation des Jaks est rapide et soutenue suite à la stimulation d'un GPCR (Pelletier et al., 2003b). Après la découverte de ce modèle d'activation de la voie Jak/STAT par les GPCRs, ayant comme acteur principal les GTPases de la famille Rho, certains groupes de chercheurs l'ont appliqué à leur système (Lo, 2003; Lo, 2004). Néanmoins, ce mécanisme d'activation de la voie Jak/STAT, en réponse aux GPCRs, est encore relativement innovateur et peu de publications en font mention pour l'instant.

1.1.3.1.3 Activation des STATs

L'enchaînement moléculaire conduisant à l'activation transcriptionnelle des STATs suit un mode d'action finement orchestré. Il est essentiel de se rappeler que les STATs

possèdent un domaine SH2, spécifique à chacune d'entre elles. Cette spécificité de domaine leur permet d'être recrutée sélectivement à certains récepteurs afin d'être phosphorylée par les Jaks. Les STATs sont phosphorylées par les Jaks sur leur résidu tyrosine catalytique, situé en C-terminal, puis il s'ensuit la formation d'homo- ou d'hétéro-dimères avec d'autres STATs. La dimérisation des STATs s'effectue par l'interaction d'un résidu tyrosine phosphorylé d'une STAT et le domaine SH2 d'une autre STAT. Il est important de comprendre que la dimérisation entre STATs, de par sa nature bivalente, est favorisée par rapport à la liaison aux récepteurs (Leonard et O'Shea, 1998). L'hétérodimérisation des STATs peut s'expliquer, en partie, par le fait que certains récepteurs de cytokines possèdent plusieurs sites de liaison aux STATs, suggérant que plusieurs STATs différentes pourraient être activées simultanément. Récemment, il a été décrit que l'acétylation des STATs influence leur dimérisation. En effet, l'acétylation de la lysine 685 de STAT3 est critique pour la formation de dimères stables, nécessaire à sa liaison à l'ADN et à la régulation de son activité transcriptionnelle. Il a également été démontré que la stabilité des dimères, engendrée par cette acétylation, est impliquée au niveau de l'augmentation de la transcription de gènes reliés à la croissance cellulaire et à la progression du cycle cellulaire, en réponse à l'oncostatine M (OSM) (Yuan et al., 2005).

Un des principes généraux de l'activation des STATs est leur translocation nucléaire. En effet, afin de pouvoir exercer leur activité transcriptionnelle sur différents promoteurs, il est primordial que le dimère de STATs formé soit relocalisé au noyau, puis qu'il interagisse avec l'ADN. Bien peu de choses sont connues, encore de nos jours, sur le mécanisme de translocation nucléaire des STATs. Par contre, il a été démontré que, peu après leur phosphorylation et leur dimérisation, les STATs s'accumulent au noyau grâce à un transport facilité. La liaison de STAT1 à l'importine α -5, une des sous-unités de la machinerie de transport nucléocytoplasmique, a été décrite comme étant un élément crucial pour son transport nucléaire. Également, il a été établi que les acides aminés L407, K410 et K413 du domaine de liaison à l'ADN de STAT1 remplissent un rôle essentiel dans sa translocation nucléaire (McBride et al., 2002; Fagerlund et al., 2002).

Il a été proposé que la phosphorylation et la dimérisation des STATs dévoile une séquence de localisation nucléaire (NLS), inconnue pour l'instant, leur permettant de transloquer au noyau. Par contre, dans certains types cellulaires, une forme non-phosphorylée de STAT1 peut entrer au noyau, ce qui n'est pas affecté par la mutation de la Leucine 407 (Meyer et al., 2002). Il est donc possible de conclure qu'il existe un rôle transcriptionnel de la forme non-phosphorylée de STAT1, bien que son implication transcriptionnelle majeure soit effectuée par sa forme phosphorylée. Ces formes non-phosphorylées de STATs auraient comme rôle hypothétique d'interagir avec d'autres facteurs de transcription sur l'ADN, et ainsi d'aider à stimuler la transcription (Chatterjee-Kishore et al., 2000).

Suite à la translocation nucléaire, afin d'exécuter leur activité transcriptionnelle, les dimères de STATs lient des séquences spécifiques de l'ADN. Tout comme pour la translocation nucléaire, l'étude de STAT1 a permis de comprendre davantage ce phénomène. En effet, la structure cristalline de STAT1 a permis de déterminer que son dimère s'associe de part et d'autre du brin d'ADN. Les homodimères de STATs s'associent aux éléments de réponse GAS de différents promoteurs de gènes cibles, comme mentionné précédemment, et stimulent leur transcription. Il est important de se rappeler que la spécificité des STATs pour ces éléments GAS est dictée par le nombre de nucléotides se retrouvant dans sa portion centrale (Ehret et al., 2001).

Il est maintenant clairement établi que la voie Jak/STAT est sujette à une régulation croisée avec d'autres voies de signalisation. En effet, en plus d'être phosphorylées sur leur résidu tyrosine catalytique, les STATs sont phosphorylées sur leur résidu sérine (727 pour STAT1 et 3), comme mentionné précédemment, par une protéine kinase indépendante. Il semble que la phosphorylation de la sérine des STATs est effectuée par différentes kinases, dépendant du type cellulaire et du stimulus (Decker et Kovarik, 2000). Par exemple, Erk1/2 serait impliqué dans des fibroblastes en réponse à des facteurs de croissance et mTOR dans des neuroblastomes en réponse au CNTF (*Ciliary neurotrophic factor*) (Chung et al., 1997b; Yokogami et al., 2000). Finalement, il a été démontré que la méthylation d'un

résidu arginine, en N-terminal de STAT1, influence son activité transcriptionnelle en inhibant son interaction avec PIAS-1 (*Protein Inhibitory of Activated STAT-1*). La perte de cette méthylation en arginine serait potentiellement impliquée dans la résistance aux IFNs de cellules cancéreuses (Liu et al., 2001 ; Mowen et al., 2001), bien que ce concept ait récemment été mis en doute (Meissner et al., 2004 ; Komyod et al., 2005). De plus, il est essentiel de noter que notre laboratoire a démontré que l'activation de STAT3 en réponse aux GPCRs est transitoire et biphasique; que la première phase d'activation est la résultante directe de l'activation des GPCRs, tandis que la seconde phase nécessite la synthèse d'un facteur autocrine, possiblement une cytokine de la famille de l'IL-6 (Pelletier et al., 2003b).

1.1.3.1.4 Rôles biologiques de la voie Jak/STAT dans la réponse aux GPCRs

Malgré la multitude d'études couvrant la voie de signalisation Jak/STAT, encore de nos jours cette voie est associée presque exclusivement aux effets physiologiques des cytokines de Type I et II. Ces réponses biologiques vont de la prolifération à la survie cellulaire, en passant par la migration cellulaire et la réponse de l'hôte aux agents pathogènes (Leonard et O'Shea, 1998; O'Shea et al., 2002). Jusqu'à présent, les études qui ont été effectuées sur le rôle de la voie Jak/STAT en réponse aux GPCRs n'ont fait qu'effleurer la question et restent incomplètes. Au cours des dernières années, quelques études ont été effectuées sans pour autant réellement cibler la question. Dans cette section, il sera fait mention de ces études, de leurs approches et de leurs conclusions.

C'est en 1994 que Bhat et al. démontrèrent pour la première fois que la voie de signalisation Jak/STAT s'active en réponse aux GPCRs, à l'angiotensine II (AngII) dans ce cas précis (Bhat et al., 1994). Plusieurs études s'enchaînèrent simultanément afin de clairement démontrer que les agonistes de GPCRs, la thrombine et l'AngII principalement, stimulent la phosphorylation des Jaks et des STATs, en plus d'induire la liaison des STATs à l'ADN et de stimuler leur activité transcriptionnelle (Bhat et al., 1994; Rodriguez-Linares et al., 1994; Marrero et al., 1995). Quelques années plus tard, certaines études tentèrent de

caractériser le rôle de la voie Jak/STAT en réponse à l'AngII (Marrero et al., 1997). À l'aide d'un inhibiteur pharmacologique « spécifique » de Jak2 (AG490) et de l'électroporation d'anticorps spécifiques, il a été observé que Jak2 et les STATs 1 et 3 sont essentiels à la prolifération cellulaire des cellules musculaires lisses vasculaires (VSMC). De plus, ces auteurs observèrent qu'en stimulant les cellules avec l'AngII, suivant un pré-traitement à l'AG490, Raf-1 et la voie des MAP kinases n'étaient plus activées. C'était les premières évidences que la voie Jak/STAT a un rôle à jouer dans la prolifération cellulaire en réponse aux GPCRs. Le problème majeur de cette étude réside dans le fait que l'AG490 est un inhibiteur reconnu comme étant de moins en moins spécifique pour Jak2. En effet, plusieurs études ont confirmé que l'utilisation d'AG490 entraîne l'inhibition de plusieurs autres voies de signalisation régulées par des tyrosines kinases. L'AG490 inhibe, entre autres, l'activation des kinases dépendantes de cyclines (Cdk) et cause l'arrêt de la croissance des cellules en phase G₁ (Kleinberger-Doron et al., 1998). Il inhibe également la synthèse d'ADN et la croissance cellulaire induite par le sérum de veau (CS) et est un inhibiteur partiel de l'activité de c-Src (Kleinberger-Doron et al., 1998; Oda et al., 1999). De façon plus critique, l'AG490 inhibe l'autophosphorylation du récepteur de l'EGF (*Epidermal Growth Factor*) de manière plus prononcée qu'il inhibe l'activité kinase de Jak2 (Osherov et al., 1993). Malgré tout, cette étude est encore considérée comme un des meilleurs exemples que la voie Jak/STAT est impliquée dans la réponse proliférative des GPCRs. Il est intéressant de mentionner que, simultanément à ces études, il a été observé que l'AMPC inhibe la synthèse protéique en réponse à l'AngII dans les VSMC. Plus précisément, il a été démontré que l'AMPC inhibe l'activation de la protéine tyrosine kinase Tyk2 (Giasson et al., 1997). Suivant cette étude, il a été démontré que la voie de signalisation Jak/STAT a un rôle prédominant dans les actions vasoconstrictrices de l'AngII dans les VSMCs (Giasson et al., 1997; Meloche S et al., 2000).

Les années qui suivirent les découvertes de Marrero et al. (1997) entraînèrent une série d'études sur l'activation de la voie Jak/STAT en réponse aux GPCRs dans différents modèles d'études, de lignées cellulaires et d'espèces. Certaines de ces études démontrèrent également un rôle important de la voie Jak/STAT dans la réponse mitogénique des GPCRs.

Entre autre, une étude démontra, encore une fois à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques et de formes dominantes-négatives, que la voie Jak/STAT régule les protéines « *heat shock* » et la croissance des VSCMs en réponse à la thrombine (Madamanchi et al., 2001). Également, certaines études *in vivo* tentèrent de caractériser le rôle de la voie Jak/STAT en réponse à l'AngII dans des modèles de déficiences cardiaques (Omura et al., 2000; Seki et al., 2000; Omura et al., 2001; Booz et al., 2002). Il ressortit de ces études que la voie Jak/STAT n'est pas uniquement impliquée au niveau de la prolifération cellulaire des VSMCs en réponse à l'AngII. À ce moment, il a été observé que la voie Jak/STAT participait à l'activation des macrophages et la migration de divers types cellulaires, tel que les cellules hématopoïétiques et les astrocytes, et ce, en réponses à divers GPCRs de familles récemment découvertes. Ces familles incluent le RANTES et plusieurs chemokines tel que MCP-1 (*Monocyte chemoattractant protein-1*) et SDF-1 (*Stromal cell-derived factor-1*) (Mellado M et al., 1998; Vila-Cora et al., 1999; Wong et al., 2001; Zhang et al., 2001; Biswas et al., 2002; Soriano et al., 2003). Récemment, il a même été proposé que Jak3, précisément, serait crucial pour le développement des cellules T principalement dû à la transduction de sa réponse aux chemokines. Il semble que cette réponse soit essentielle pour la migration et la différenciation des thymocytes (Soldevila et al., 2004). Il est intéressant de noter que plusieurs groupes de recherche suggérèrent l'existence d'une voie de régulation croisée entre les chemokines (GPCRs) et les cytokines (Bakhiet et al., 2001; Soriano et al., 2002; Soldevila et al., 2004). Ces développements majeurs quant à l'implication de la voie Jak/STAT dans la migration cellulaire en réponse aux chemokines, ont encouragé les chercheurs à porter une attention particulière à cette réponse biologique. C'est ainsi que, récemment, une étude a proposé que la migration induite par la thrombine dans les VSMCs, dépend de l'expression de cPLA₂ (*calcium-dependent cytosolic phospholipase A2*) via STAT3 (Dronadula et al., 2005). Une double approche d'inhibiteurs de cPLA₂ et d'un dominant négatif de STAT3 (mutant double Y705F/S727A) a été utilisée dans cette étude.

Cependant, peu d'informations sont connues sur l'implication *in vivo* de la voie Jak/STAT en réponse aux GPCRs dans des conditions pathophysiologiques. C'est

précisément ce qu'un petit nombre de groupes de recherche ont tenté d'élucider récemment. Il a été démontré que la voie Jak/STAT est impliquée au niveau de la prolifération et l'invasion de cellules cancéreuses. Une première étude démontra que la thrombine inhibe la croissance de cellules cancéreuses via l'augmentation de l'expression de p21^(waf/cip) et de caspases de manière dépendante de STAT1 (Huang et al., 2000). Récemment, il a été décrit que Jak2 participe directement au potentiel d'invasion d'une forme active de STAT3 dans des cellules T cancéreuses (Opdam et al., 2004). Dans le même ordre d'idées, il a été observé que la capacité de transformation et les réponses angiogéniques relayées via les récepteurs KSHV-GPCR et CXCR2 s'effectuent via la signalisation dépendante de Jak2/STAT3 (Burger et al., 2005). Effectivement, le virus KSHV (*Kaposi's Sarcoma Herpes Virus*) encode un GPCR de chemokines appelé KSHV-GPCR et dont l'homologue humain le plus rapproché est le récepteur CXCR2. L'expression du KSHV-GPCR, qui est constitutivement actif, mène à la transformation et la surcroissance vasculaire. Il a été observé que l'expression d'une forme constitutivement active de CXCR2, ou du récepteur normal mais continuellement stimulé, induit également la transformation des cellules (Burger et al., 1999). Avec une approche d'inhibiteurs pharmacologiques, en l'occurrence l'AG490, ce groupe a déterminé que Jak2 et STAT3 participent aux réponses migratoires et à la capacité de transformation impliquées dans le développement de tumeurs, des métastases et de l'angiogénèse des cellules exprimant ces deux récepteurs (Burger et al., 2005). Finalement, un nouveau mécanisme d'activation de Jak2, par le récepteur du CCK2, a été proposé (Ferrand et al., 2005). Il a été suggéré que le récepteur du CCK2, principalement couplé aux protéines Gαq, active Jak2 et STAT3. L'application de ce mécanisme dans un contexte pathophysiologique de cellules tumorales pancréatiques, exprimant de façon endogène ce récepteur, a permis de déterminer que l'activation de Jak2/STAT3 par ce récepteur est impliquée dans ces effets prolifératifs. Ils ont également démontré *in vivo* que l'expression ciblée de ce récepteur dans le pancréas de souris *Elas-CCK2* mène à l'activation de Jak2/STAT3. Cette voie pourrait donc être impliquée dans l'augmentation de la croissance du pancréas ainsi que dans la formation de lésions pré-néoplastiques, menant au développement de tumeurs pancréatiques observées chez les animaux transgéniques (Ferrand et al., 2005).

Malgré le bon nombre d'études effectuées au cours des dernières années sur les rôles biologiques de la voie de signalisation Jak/STAT en réponse aux GPCRs, il est intéressant de noter que les rôles biologiques de Jak1 et Tyk2 dans cette réponse demeurent peu présents dans la littérature.

1.1.3.2 Régulation négative de la voie Jak/STAT

Dans tout processus cellulaire, l'important est d'obtenir un équilibre entre les signaux d'activation et les signaux d'inhibition des voies de signalisation. Par conséquent, suite à son activation, une voie de signalisation doit pouvoir être inhibée. En ce qui a trait aux Jaks, plusieurs moyens sont utilisés afin d'obtenir une régulation fine.

D'une part, les Jaks peuvent être déphosphorylées et d'autre part, elles peuvent être directement dégradées. De ce fait, deux modes sont actuellement connus permettant l'inactivation de ces tyrosines kinases : l'action de protéines tyrosine phosphatases (PTPases) et l'action d'une famille de protéines nommée SOCS (*Suppressor Of Cytokine Signaling*). En plus d'être influencée de façon indirecte par la régulation de l'activité des Jaks, l'activité des STATs peut également être régulée de façon négative par des modifications directes, notamment par la déphosphorylation de leurs résidus phosphorylables, la génération d'isoformes tronquées ou l'acétylation d'un résidu lysine (Sasse et al., 1997; Aoki et al., 2000; O'Shea et al., 2005) (Figure 1.5.).

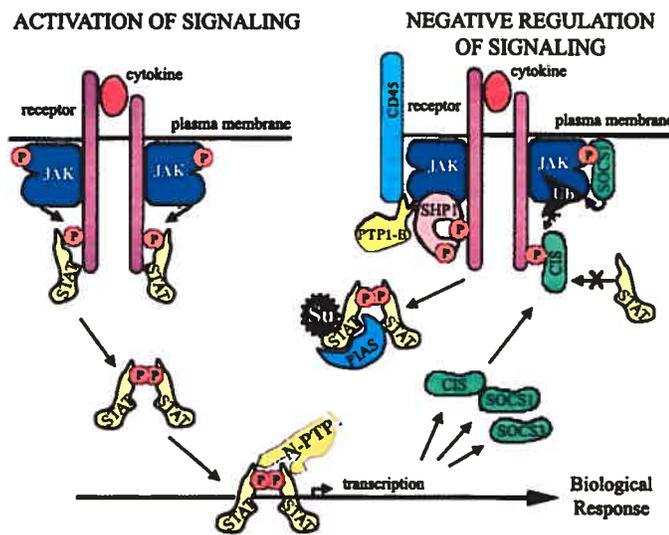


Figure 1.5. Régulation positive et négative de la voie Jak/STAT (tiré de O'Shea et al., 2002). L'activation de la voie Jak/STAT par la liaison d'une cytokine à son récepteur, entraîne l'oligomérisation du récepteur. Cette action permet aux Jaks liées à ces récepteurs, d'être mises à proximité, de se transphosphoryler, et de phosphoryler le récepteur, permettant aux STATs d'être recrutées par leur domaine SH2. Par la suite, ces STATs sont phosphorylées par les Jaks sur leur résidu tyrosine catalytique, permettant leur dimérisation et leur

translocation nucléaire subséquente. Au noyau, elles se lient à l'ADN et induisent la transcription de certains gènes. Plusieurs étapes de régulation négative sont effectives par la suite ; les tyrosines phosphatases SHP-1, CD45 et PTP-1b, entre autres, peuvent déphosphoryler le récepteur et les Jaks. Les STATs peuvent à leur tour être déphosphorylées dans le noyau. De plus, les PIAS peuvent les lier et les sumoyler. Finalement, des gènes transcrits par les STATs encodent des régulateurs des Jaks appelés SOCS. D'une part, ils peuvent lier et inhiber l'activité des Jaks, lier le récepteur et empêcher le recrutement des STATs, ou d'autre part, induire l'ubiquitination et la dégradation des Jaks via le complexe ubiquitine-protéasome.

1.1.3.2.1 Protéines Tyrosines Phosphatases (PTPases)

1.1.3.2.1.1 PTPases des Jaks

Comme mentionné précédemment, l'activation des Jaks est dépendante de leur phosphorylation en résidus tyrosine catalytiques. Il n'est donc pas surprenant que plusieurs PTPases régulent négativement l'activité des Jaks, soit SHP1 et SHP2 (*SH2-containing Protein Tyrosine Phosphatase-1 et 2*), PTP-1B, TC-PTP et CD45 (Klingmuller et al., 1995; David et al., 1995; Myers et al., 2001; Harashima et al., 2002; Simoncic et al., 2002). L'expression de SHP1 est largement restreinte aux tissus hématopoïétiques, tandis que SHP2 est exprimée de façon beaucoup plus générale. Certaines études de délétion ont démontré que la liaison des SHP 1 et 2 à leur récepteur est essentielle pour l'inactivation de la voie Jak/STAT, tandis que d'autres ont suggéré qu'elles interagissent directement avec les Jaks et les déphosphorylent (Chapelle et al., 1993; Yi et al., 1993; Klingmuller et al.,

1995; Ohtani et al., 2000). Ces observations indiquent que les phosphatases jouent un rôle prédominant dans la régulation négative de l'activation des Jaks.

1.1.3.2.1.2 PTPases des STATs

Quelques études suggèrent une action directe sur la déphosphorylation des STATs, entre autre que STAT 1, 3 et 5 B seraient des substrats de TC-PTP et que STAT5 A, pour sa part, serait un substrat de PTP-1B. Il est également intéressant de noter que certaines PTPases ont comme rôle de déphosphoryler les sites de recrutement des STATs sur les différents récepteurs (You et al., 1999; Aoki et al., 2000). L'importance de ces phosphatases a d'ailleurs été confirmée par des mutations retrouvées chez l'Homme, ainsi que par l'utilisation de souris transgéniques (Klingmuller et al., 1995; Dong et al., 2001). Par exemple, l'absence de PTP-1B chez la souris mène à une réponse accrue à la leptine ainsi qu'une phosphorylation en tyrosine de STAT3 augmentée, probablement due à une défaillance au niveau de la déphosphorylation de Jak1 (Zabolotny et al., 2002). Par contre, ce domaine de régulation négative des STATs demeure très peu caractérisé pour l'instant (ten Hoeve et al, 2002; Yamamoto et al., 2002; Aoki et al., 2002).

1.1.3.2.2 SOCS (Boucle de rétro-inhibition)

1.1.3.2.2.1 Régulation des Jaks par les SOCS

La signalisation des cytokines est régulée négativement au niveau de l'intensité et de la durée du signal et il est maintenant clair que la famille des protéines *Suppressor Of Cytokines Signaling* (SOCS) contribue de façon significative à ce processus. La famille des SOCS comprend 8 membres soit, SOCS-1 à SOCS-7 ainsi que CIS, pour *Cytokine-Inducible SH2-containing protein*. Parmi ces protéines, SOCS1 / SSI-1 (*STAT-induced STAT Inhibitor-1*) / JAB (*Jak-binding protein*) a été cloné en 1997 par trois groupes de chercheurs distincts qui ont utilisé différentes approches expérimentales (Starr et al., 1997; Endo et al., 1997; Naka et al., 1997), et a été associé au gène CIS précédemment cloné (Yoshimura et al., 1995). Les protéines SOCS sont des inhibiteurs qui forment une boucle

de rétro-inhibition, leur expression étant finement régulée au niveau transcriptionnel par les STATs, principalement pour CIS, SOCS1 et SOCS3. Le promoteur de SOCS1, par exemple, contient des sites de liaisons pour STAT1, STAT3 et STAT6, et une forme inactive de STAT3 inhibe l'expression de son ARNm en réponse à l'IL-6 et au LIF (Naka et al., 1997; Saito et al., 2000). Les transcrits encodant SOCS1, SOCS2, SOCS3 et CIS sont induits en réponse à la stimulation aux cytokines et également aux GPCRs. Ils sont souvent présents à un faible niveau ou indétectable dans les cellules, mais sont rapidement induits par un large spectre de cytokines.

Il a également été démontré que les ligands de GPCRs, dont les chemokines, induisent une augmentation des transcrits qui encodent SOCS1 et SOCS3 (Garzon et al., 2004; Torsino et al., 2004; Yang et al., 2004). Habituellement, le profil d'expression des SOCS en réponse aux cytokines n'est pas simple. En effet, une cytokine en particulier peut induire l'expression de certaines SOCS dans une certaine lignée cellulaire et d'autres SOCS dans une autre lignée cellulaire, comme par exemple l'IFN- γ dans les NIH-3T3 versus la lignée de cellules M1 (Sakamoto et al., 1998). De plus, il a été démontré, par des études de surexpression, que les protéines SOCS inhibent la signalisation des cytokines (Tableau 1.3.).

Les membres de la famille des protéines SOCS peuvent inhiber la signalisation des cytokines par différents mécanismes. Plusieurs études montrent que SOCS1 interagit directement avec JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2, et de ce fait, inhibe leur activité catalytique (Naka et al., 1997; Endo et al., 1997; Nicholson et al., 1999; Yasukawa et al., 1999). SOCS3 inhibe également l'activité de Jak2, mais comparativement à SOCS1, il lie Jak2 avec une plus faible affinité et est un inhibiteur beaucoup moins efficace (Suzuki et al., 1998; Pezet et al., 1999). Contrairement à SOCS 1 et 3, CIS et SOCS2 ne lient pas et n'inhibent pas les JAKs (Pezet et al., 1999; Yasukawa et al., 1999). Bien qu'il y ait eu plusieurs progrès récents dans la compréhension du mécanisme par lequel les SOCS antagonisent la voie de signalisation Jak/STAT, beaucoup de questions restent sans réponse. Il est maintenant de plus en plus clair que les SOCS ne régulent pas uniquement la

signalisation des cytokines, mais qu'ils ont un rôle beaucoup plus large dans la régulation de l'activité de plusieurs familles de protéines. Par souci de clarté, je me limiterai ici à la description des membres les plus caractérisés des SOCS, soit SOCS-1 / 3 et CIS.

Tableau 1.3. Les membres de la famille de protéines SOCS s'associent avec une variété de protéines et inhibent la signalisation de plusieurs cytokines (Adapté de Krebs et Hilton 2001; Ilangumaran et al., 2004).

Nom	Inhibent la signalisation de :	S'associent avec :
CIS	IL-2, IL-3, prolactine (PRL), Epo, IGF-1, GH	EpoR, IL-3R, GHR, IL-2R, PKC
SOCS1	IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, GH, PRL, Epo, LIF, IFN- γ , IFN- α , OSM, TSLP, Tpo, IGF-1	Jak1, Jak2, Jak3, Tyk2, Grb2, Vav, FGFR, Pyk2, GHR, KitR, Flt3R, IGF-1R, Élongines BC, IL-2R, p65/Rel, TRIM8/GERP, PI3K p85, Nck, Fyn, Itk, Pim-1, Tec, Vav, FAK, IR, IRS-1, IRS-2, IRAK1, HPV-E7, EGFR
SOCS2	GH, IL-6, LIF, IGF-1, PRL	IGF-1R, PRLR, GHR
SOCS3	IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, GH, PRL, Epo, LIF, IFN- γ , IFN- α , CNTF, leptine, OSM, IGF-1, insuline	Lck, FGFR, Pyk2, GHR, EpoR, leptineR, gp130, IGF-1R, Jak1, G-CSFR, IR, CD28, Elongine BC, p120RasGAP, IL-2R, IL-12R, CXCR4
SOCS4	Inconnue	Inconnue
SOCS5	IL6	IL-4R
SOCS6	Inconnue	Elongine BC, IR, IRS-4, PI3K p85, Kit
SOCS7	Inconnue	Ash, Nck, PLC γ , IRS-3, PI3K p85, EGFR

De façon générale, les SOCS ont plusieurs modes d'action afin d'inhiber l'activation de la voie Jak/STAT; soit d'interagir directement avec les Jaks afin d'inhiber leur activité catalytique, de lier les sites phosphorylés en tyrosine des récepteurs pour empêcher les STATs d'être recrutées, ou de dégrader les Jaks via leur *SOCS-box* et le système ubiquitine-protéasome. Par plusieurs approches biochimiques, dont l'utilisation de mutants tronqués des SOCS, plusieurs groupes de chercheurs ont mis en évidence le mécanisme d'inhibition des SOCS sur l'activité des Jaks. En effet, il semble que SOCS1 inhibe l'activité catalytique de Jak2 en se liant sur son résidu tyrosine catalytique 1007 phosphorylé (Yasukawa et al., 1999; Flowers et al., 2004). Le domaine SH2 de SOCS1 est suffisant pour sa liaison à Jak2, même si les 24 résidus directement en N-terminal du domaine SH2 sont requis pour sa liaison de forte affinité et l'inhibition de Jak2 (Narazaki et

al., 1998; Nicholson et al., 1999; Yasukawa et al., 1999). C'est dans ces 24 résidus que se retrouve le domaine KIR, pour *Kinase Inhibitory Region*, un domaine de 12 résidus homologue entre SOCS1 et SOCS3 essentiel à l'inhibition de l'activité de Jak2 (Yasukawa et al., 1999). Ce domaine ressemble à la boucle d'activation des Jaks, qui comprend d'ailleurs leurs résidus tyrosine catalytiques, et a un rôle de pseudo-substrat, ce qui prévient l'accès aux véritables substrats des Jaks à leur poche catalytique (Yasukawa et al., 1999).

Bien que SOCS1 et SOCS3 inhibent les Jaks de façon semblable, grâce à leur domaine KIR, il semble que leur recrutement aux Jaks est différent (Figure 1.6.). En effet, un autre mode d'action des SOCS est de lier les sites de phosphorylation des récepteurs de cytokines. Comme mentionné précédemment, SOCS3 lie Jak2 avec une très faible affinité bien qu'il inhibe très fortement l'activation de la voie Jak/STAT en réponse aux cytokines. Récemment, un groupe de chercheurs a démontré que SOCS3 lie avec une haute affinité la tyrosine 757 de la sous-unité gp130 du récepteur de la famille de l'IL-6 (Nicholson et al., 2000). Ils ont démontré que la mutation de cette tyrosine en phénylalanine réduit de façon significative l'impact de SOCS3 sur l'inhibition de la voie Jak/STAT, malgré que l'effet de SOCS1 est toujours aussi important (Nicholson et al., 2000; Schmitz et al., 2000). Il a aussi été démontré que ce modèle d'inhibition de SOCS3 s'applique aux récepteurs de la leptine et de l'érythropoïétine (Sasaki et al., 1999; Sasaki et al., 2000). Il est proposé que SOCS3 soit d'abord recruté aux récepteurs activés afin de pouvoir, par son domaine KIR, inhiber l'activité des Jaks (Krebs et Hilton, 2001).

Finalement, le dernier mode d'action connu des SOCS est leur action de ciblage vers le protéasome de diverses protéines, dont les Jaks, grâce à leur domaine *SOCS-box* (Zhang et al., 1999; Krebs et Hilton, 2001; Ungureanu et al., 2002). Les SOCS remplissent le rôle de E3 ligase d'un complexe ubiquitine-protéasome contenant les élongines B et C associées à Cullin-2 (Kamura et al., 1998; Hang et al., 1999). C'est par leur domaine *SOCS-box* qu'ils s'associent aux élongines tandis que leur domaine SH2 s'associe à une protéine cible phosphorylée en résidu tyrosine, qui est ensuite polyubiquitinée, dirigée vers le protéasome et dégradée. Le complexe de dégradation des SOCS est analogue à celui de la

protéine suppresseur de tumeurs von Hippel-Lindau (VHL) qui contient un domaine homologue au domaine *SOCS-box* des SOCS (Maxwell et al., 1999). Il a par ailleurs été démontré que les SOCS sont aptes à ubiquitiner diverses protéines tel que le GEF Vav, le récepteur du GH ainsi que la protéine virale E7, ce qui induit leur dégradation via le protéasome (De Sepulveda et al., 2000; Kamio et al., 2004).

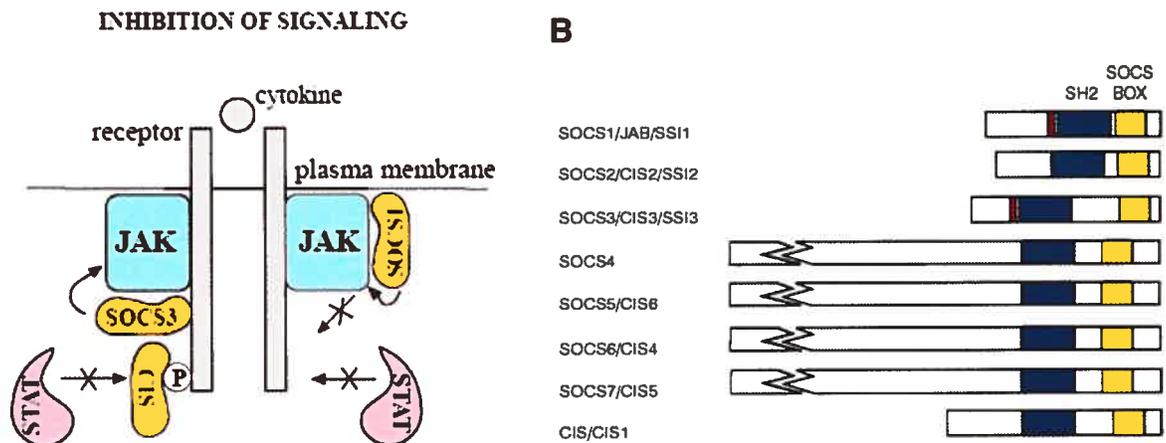


Figure 1.6. Les SOCS : régulateurs négatifs de la voie Jak/STAT (tiré de Krebs et Hilton, 2000; Krebs et Hilton, 2001). A. Les mécanismes par lesquels les protéines SOCS régulent négativement la signalisation des cytokines. L'activation de la voie Jak/STAT par la stimulation de cytokines conduit à l'induction de SOCS. SOCS1 s'associe avec les Jaks et inhibe leur activité catalytique, CIS inhibe la liaison des STATs aux récepteurs de cytokines activés, et SOCS3 semble inhiber l'activité des Jaks par un mécanisme impliquant son association aux récepteurs. B. Les noms alternatifs et les structures des protéines de la famille SOCS. Le domaine KIR (*Kinase Inhibitory Region*) est indiqué en rouge.

Bien que les systèmes *in vitro* de surexpression de SOCS1, SOCS3 et CIS démontrent un effet inhibiteur sur un très large spectre de cytokines, la fonction des SOCS *in vivo* semble être davantage restreinte (Tableau 1.4.).

Tableau 1.4. Rôles des protéines SOCS, révélés par la délétion du gène chez la souris (Adapté de Levy et Darnell, 2002).

Protéines SOCS	Phénotypes des souris « <i>knockouts</i> » (-/-)
CIS	Aucun phénotype perçu, mais une augmentation de la signalisation des cellules T chez les souris qui surexpriment CIS
SOCS1	Létales au niveau périnatal, causé par une dégénération du foie induite par la signalisation de l'IFN- γ soutenue
SOCS2	Gigantisme causé par la signalisation soutenue de l'hormone de croissance et l'IGF-1
SOCS3	Létales au niveau embryonnaire, causé par de multiples défauts placentaires et hématopoïétiques

Une déficience en SOCS 1 et 3 a une conséquence catastrophique chez les souris. Les souris *SOCS1*^{-/-} meurent entre la 2^e et la 3^e semaine après leur naissance d'un problème immunitaire, précisément au niveau de la réponse inflammatoire (Naka et al., 1998; Starr et al., 1998). En fait, la cause exacte est le déséquilibre de la régulation de l'activité de STAT1 et de STAT6 en réponse à l'IFN- γ et à l'IL-4 respectivement, qui sont activées de façon chronique (Alexander et al., 1999; Marine et al., 1999a; Naka et al., 2001). Il a aussi été démontré que les souris *SOCS1*^{-/-}*IFN- γ* ^{-/-} sont résistantes à la dégénérescence du foie associée à une activité de STAT1 élevée et soutenue, observée chez les souris *SOCS1*^{-/-} (Metcalf et al., 2002). Les souris *SOCS3*^{-/-}, quant à elles, développent une érythrocytose marquée qui occasionne une mort au niveau embryonnaire à 12-16 jours (Marine et al., 1999b). Celle-ci est attribuée à une activation chronique de la voie de signalisation Epo-STAT5 (Marine et al., 1999b). Les souris *CIS*^{-/-} ne présentent aucun phénotype évident (Krebs et Hilton DJ, 2001).

1.1.3.2.2 Régulation des STATs par les SOCS

Contrairement aux Jaks, il semble qu'il n'y ait pour l'instant, aucune action inhibitrice directe des SOCS sur les STATs. L'inactivation des STATs par les SOCS serait indirecte et résiderait donc principalement dans l'inhibition de l'activité kinase des Jaks (O'Shea et al., 2002). De plus, CIS a la capacité d'être recrutée aux sites phosphorylés des récepteurs servant au recrutement et à la phosphorylation des STATs, leur bloquant ainsi l'accès, ce qui empêche leur activation. Ceci a été décrit dans le cas de l'inhibition de l'activité de STAT5 B en réponse au GH et à l'Epo (Krebs et Hilton, 2001).

1.1.3.2.3 Régulation négative spécifique aux STATs

Autrement que par leur déphosphorylation, l'activité des STATs peut être régulée par la génération d'isoformes tronquées dans leur région C-terminale. Ces isoformes peuvent être générées au niveau transcriptionnel ou par des modifications post-traductionnelles (Sasse et al., 1997; Meyer et al., 1998; Lee et al., 1999) Ces isoformes tronquées fonctionnent comme des formes inactives, interférant avec les formes actives, et il a été démontré qu'il y en a pour STAT1, STAT3 et STAT5 (Caldenhoven et al., 1996; Stark et al., 1998; Piazza et al., 2000). Par la suite, il a été trouvé qu'une forme de STAT92E, l'homologue unique des STATs chez la Drosophile, possède également une isoforme tronquée (Henriksen et al., 2002). Cette isoforme possède 130 acides aminés en moins que la forme « pleine longueur » et est la résultante d'un site alternatif du début de la transcription. Par conséquent, deux transcrits sont produits, dont une forme courte de 71 kDa et une forme longue de 86 kDa (Henriksen et al., 2002). Il a été démontré qu'une balance de l'activité transcriptionnelle des STATs est requise pour le développement de la Drosophile puisque ces deux isoformes auraient des rôles inverses.

Récemment, l'acétylation de STAT3 sur un simple résidu lysine en C-terminal a été montré comme régulant la formation de dimères, ce qui tend à démontrer que sa désacétylation inhibe son activité (Wang et al., 2005; O'Shea et al., 2005; Yuan et al., 2005). Dans le même ordre d'idées, la méthylation sur un résidu arginine de STAT1 a récemment été démontré comme étant essentielle à son activité. En effet, cette méthylation inhibe l'interaction de STAT1 avec PIAS-1, ce qui suggère que la déméthylation de STAT1 peut aussi affecter son activité (Liu et al., 2001; Komyod et al., 2005)

1.1.3.2.3.1 PIAS

Il existe au moins deux régulateurs négatifs au niveau nucléaire, soit les PTPases nucléaires mentionnées précédemment, ainsi que les PIAS (*Protein Inhibitor of Activated*

STAT). Chez les mammifères, quatre PIAS ont été identifiées; PIAS 1, 3, x et y (Chung et al., 1997a; Liu et al., 1998). S'ajoutant au fait que l'interaction de PIAS 1 et 3 avec STAT1 et STAT3 actif, respectivement, compromet leur liaison à l'ADN, il a été démontré qu'une surexpression de ces PIAS permet d'inhiber l'activité transcriptionnelle spécifique de ces STATs. Chez la Drosophile, il a été observé que dPIAS, l'homologue unique des PIAS, module l'activité des STATs *in vivo*. De plus, il a été démontré qu'une leucémie développée chez la Drosophile, conséquence d'une Jak hyperactive, peut être contrebalancée par la surexpression de dPIAS. Il est intéressant de noter que les PIAS possèdent une activité *E3-ligase-like* pour les protéines SUMO (*small ubiquitin-related modifier*). Les PIAS modulent la conjugaison des SUMO à diverses protéines, tel que p53 et c-Jun, inhibant ainsi leur activité (Levy et Darnell, 2002). Une étude récente a démontré que la sumoylation de la lysine 703 de STAT1, par les PIAS, régule négativement son activité transcriptionnelle, alors qu'un mutant non-sumoylable (K703R) présente une activité transcriptionnelle accrue en réponse à l'IFN- γ (Ungureanu et al., 2005).

1.2 LES RÉCEPTEURS PAR-1 ET LPA₁ EN TANT QUE MODÈLE DE RÉCEPTEURS COUPLÉS AUX PROTÉINES G HÉTÉROTRIMÉRIQUES.

La famille des Récepteurs Couplés aux Protéines G hétérotrimériques (*G-Protein Coupled Receptors*; GPCR) est une des plus vastes classes de protéines de la surface cellulaire encodées par le génome humain (Claing, 2004). Ces protéines, avec une topologie à sept domaines transmembranaires, sont responsables de la conversion de multiples stimuli extracellulaires en réponses physiologiques, telles que la migration, la contraction et la prolifération cellulaire. Ces stimuli, allant des neurotransmetteurs aux hormones peptidiques, induisent un changement conformationnel de ces récepteurs, ce qui conduit à l'activation de protéines G hétérotrimériques, puis à l'activation de divers effecteurs (Claing, 2004).

En raison de l'innombrable quantité de récepteurs compris dans cette famille, uniquement deux récepteurs très bien caractérisés, et servant de modèles d'études pour les GPCRs, seront décrits dans cette section. Ces deux récepteurs, le récepteur PAR-1 (*Proteinase-Activated Receptor - 1*) et le récepteur LPA₁ (*Lysophosphatidic Acid - 1*), ont été choisis en raison de leur capacité à induire la migration cellulaire ainsi qu'une forte réponse mitogénique dans divers types cellulaires, dont les cellules musculaires lisses vasculaires (VSMC) et les fibroblastes. La plupart des fonctions connues de la thrombine sont relayées par le récepteur PAR-1. Il est important de noter que le récepteur PAR-2 n'est pas activé en réponse à la thrombine, que le récepteur PAR-3 ne semble pas promouvoir de signalisation intracellulaire, et que le récepteur PAR-4 est un récepteur de très faible affinité envers la thrombine (Pelletier, 2003a). Également, le récepteur PAR-1 a été décrit plusieurs fois comme ayant la capacité d'activer la voie de signalisation Jak/STAT (Madamanchi et al., 2001; Pelletier et al., 2003b). Le récepteur LPA₁, quant à lui, est activé par l'acide lysophosphatidique (LPA) et il est principalement étudié en raison de sa capacité à activer les petites protéines G de la famille Rho (Ridley et Hall, 1992; Kranenburg et Moolenaar, 2001; Van Leeuwen et al., 2003). Se basant sur une étude de notre laboratoire démontrant l'importance des petites protéines G dans l'activation de la voie Jak/STAT en réponse aux GPCRs, le récepteur LPA₁ semblait être un bon candidat pour la présente étude. De plus, il est le seul membre de cette famille de récepteurs à être exprimé chez le rat et à induire la prolifération cellulaire (Ishii et al., 2004).

1.2.1 Le récepteur PAR-1 de la thrombine

La thrombine, une protéine sérine protéase, contrôle l'aggrégation plaquettaire, l'activation de cellules endothéliales et plusieurs autres réponses importantes au niveau de la biologie vasculaire (Macfarlane et al., 2001). Les *Proteinase-activated receptors* (PARs) sont des GPCRs qui utilisent un mécanisme fascinant afin de convertir un événement de clivage protéolytique extracellulaire en un signal transmembranaire. Ces récepteurs transportent leur propre ligand qui reste « crypté » jusqu'à ce que le clivage du récepteur le découvre et lui permette d'activer le récepteur (Macfarlane et al., 2001). La famille des

récepteurs PARs comprend 4 membres connus chez la souris et l'humain. Les récepteurs humains PAR1, PAR3 et PAR4 peuvent être activés par la thrombine tandis que le récepteur PAR2, quant à lui, est activé par la trypsine, la tryptase et par les facteurs de coagulation VIIa et Xa (Nystedt et al., 1994). Il est certainement possible que ces récepteurs relayent les réponses d'autres protéases ou même de ligands peptidiques *in vivo*. En vérité, les cofacteurs qui localisent les protéases à la surface cellulaire, et modulent leur activité, peuvent aider à orchestrer l'activation des récepteurs PARs (Macfarlane et al. 2001).

1.2.1.1 Structure du récepteur PAR-1

C'est en 1991 que le récepteur PAR-1 de la thrombine a été cloné; une protéine de 425 acides aminés dont l'analyse hydropathique a décrit comme un membre de la superfamille des récepteurs à sept domaines transmembranaires (Vu et al., 1991). Cette protéine contient un peptide signal hydrophobe en N-terminal avec des sites potentiels de clivage précisément à la position Thr24 et Ala26. De plus, plusieurs sites de glycosylation, ainsi qu'un site de clivage à la thrombine (LDPR/S), se retrouvent en N-terminal de cette protéine, rappelant que l'activation de ce récepteur s'effectue par clivage protéolytique. Le récepteur PAR-1 a été cloné chez plusieurs espèces dont le rat, l'humain, la souris, le bovin et le hamster (Macfarlane et al., 2001).

1.2.1.2 Mécanisme de régulation du récepteur PAR-1

1.2.1.2.1 Activation

Le récepteur PAR-1 est activé par l'action protéolytique de la thrombine. En effet, tel qu'observé dans la Figure 1.7., en clivant un segment se trouvant en N-terminal du récepteur PAR-1, la thrombine permet à la queue du récepteur de lier sa 2^e boucle extracellulaire et de s'activer (Vu et al., 1991).

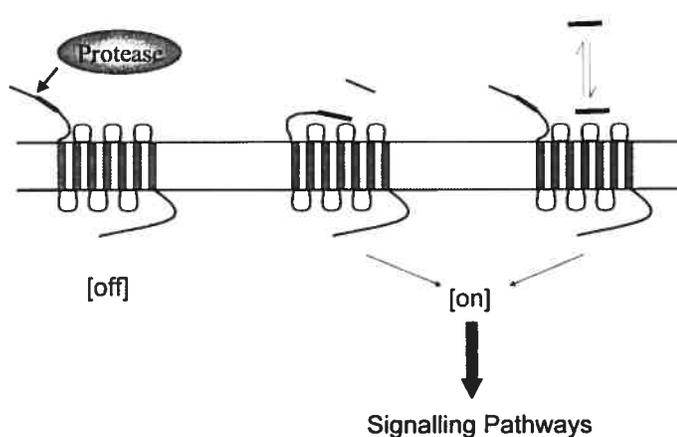


Figure 1.7. Activation par clivage protéolytique des récepteurs PARs (tiré de Macfarlane et al., 2001). Le clivage protéolytique de la région N-terminale génère un ligand, désigné par la section en gras, qui interagit avec la 2^e boucle extracellulaire du récepteur. Une séquence peptidique dérivée de cette région N-terminale activatrice est apte à activer le récepteur en l'absence de clivage protéolytique de l'extrémité N-terminale.

Il est intéressant de noter qu'un peptide mimant le nouveau segment en N-terminal du récepteur, après clivage, permet d'activer le récepteur PAR-1 de type sauvage en absence de thrombine. De plus, ce peptide a également la capacité d'activer une forme mutante du récepteur PAR-1 qui ne possède plus son site de clivage protéolytique. Ce peptide, nommé TRAP-14 pour *Thrombin Receptor Activating peptide*, est formé d'une séquence de 14 acides aminés (SFLLRNPNDKYEPF) (Vu et al., 1991). De plus, le récepteur PAR-1 muté en N-terminal est inactif et il ne peut être activé en réponse à la thrombine, démontrant la nécessité et le rôle crucial de cette région pour l'activation de ce récepteur (Chen et al., 1994). De plus, il a été proposé que la liaison du peptide signal en N-terminal avec le site de liaison de la 2^e boucle extracellulaire initie un changement de conformation du récepteur, permettant ainsi la liaison du récepteur avec ses effecteurs cytoplasmiques (Ishii et al., 1995).

1.2.1.2.2 Inactivation

Le mécanisme d'activation de type « clivage protéolytique » du récepteur PAR-1 occasionne une activation soutenue de ce récepteur qui, pour être inactivé, doit absolument être internalisé et dégradé (Macfarlane et al., 2001). En effet, il a été démontré que les GRKs (*G protein Receptor Kinase*) phosphorylent deux sites consensus du récepteur PAR-

1; les Ser 391 et 395 (Ishii et al., 1994). Chez les souris transgéniques surexprimant GRK3, l'activation de la voie des MAP kinases par la thrombine est inhibée, suggérant un rôle de GRK3 dans la phosphorylation de PAR-1 (Iaccarino et al., 1998). De plus, l'existence d'une spécificité dépendante du type cellulaire est suggérée puisque dans les cellules endothéliales, GRK5 semble davantage relayer la phosphorylation de PAR-1 plutôt que GRK3 (Tiruppathi et al., 2000). Ces sérines / thréonines kinases sont transloquées à la membrane plasmique où elles interagissent avec les sous-unités $\beta\gamma$ des protéines G hétérotrimériques et phosphorylent des résidus spécifiques localisées sur les boucles intracellulaires (Claing, 2004).

Cette phosphorylation, relayée par les GRKs, n'est pas suffisante pour induire la désensibilisation du récepteur PAR-1, mais sert plutôt d'étape d'initiation de ce processus. En effet, il a été démontré que la phosphorylation du récepteur permet le recrutement des protéines arrestines, qui elles, induiront la désensibilisation du récepteur. Les arrestines interagissent avec ARNO (*ARF nucleotide-binding site opener*), une GEF de la petite protéine G ARF6 (*ADP-ribosylation factor 6*) qui semble être impliquée dans le processus d'internalisation des GPCRs (Houndolo et al., 2005). Il est intéressant de noter que le clivage protéolytique du récepteur PAR-1 n'influence pas sa désensibilisation étant donné que TRAP induit le même procédé de désensibilisation du récepteur (Macfarlane et al., 2001). L'internalisation du récepteur PAR-1 s'effectue d'abord dans les endosomes primaires qui sont redirigés principalement vers les lysosomes où les récepteurs sont dégradés (Hoxie et al., 1993). La seule possibilité de resensibilisation de la réponse des cellules à la thrombine est la synthèse *de novo* du récepteur, une fois que les réserves intracellulaires du récepteur ont été utilisées. En effet, les récepteurs qui évitent la dégradation et qui sont recyclés à la surface ne sont plus activables par la thrombine (Hoxie et al., 1993; Brass et al., 1994).

1.2.1.3 Signalisation cellulaire

La signalisation intracellulaire induite par la thrombine est très complexe et se complexifie davantage de jours en jours avec les nouvelles découvertes effectuées. Par conséquent, il serait difficile de faire une revue complète et détaillée de ce processus et c'est pourquoi uniquement une brève revue sera présentée dans cette section. L'activation du récepteur PAR-1 induit l'activation de plusieurs classes de protéines G hétérotrimériques, soit $G\alpha_i$, $G\alpha_{12/13}$ et $G\alpha_q$. Chacune de ces classes de protéines G hétérotrimériques active à leur tour certaines voies de signalisation (Figure 1.8.).

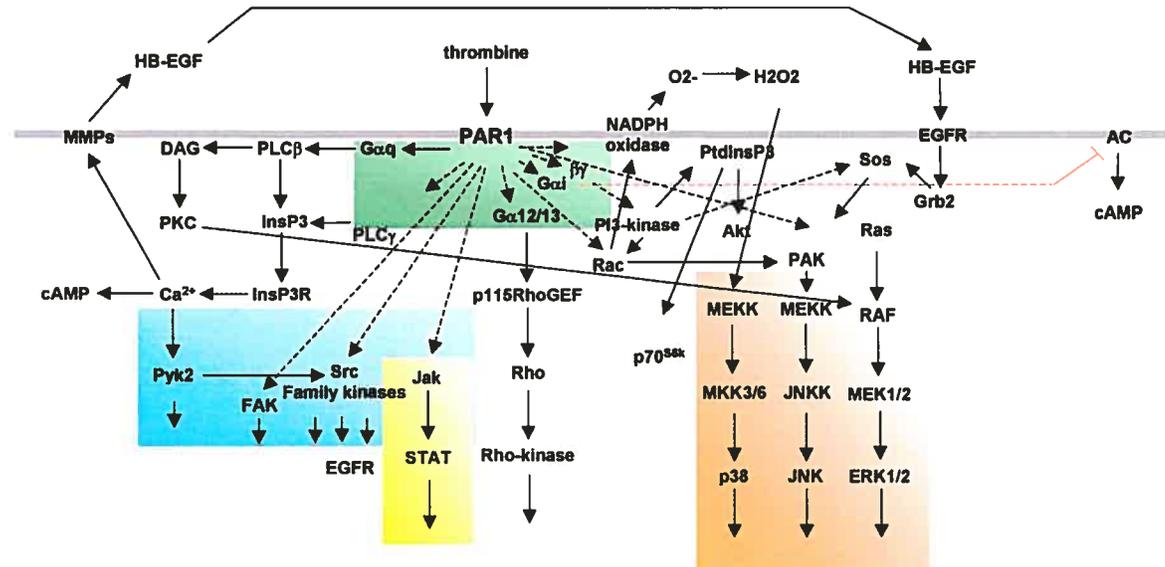


Figure 1.8. Voies de signalisation engendrées par le récepteur PAR-1 de la thrombine (tiré de Pelletier, 2003a). En réponse à la thrombine, le récepteur PAR-1 transmet son signal par l'entremise d'une panoplie de voies de signalisation. L'activation du récepteur PAR-1 conduit à l'activation de protéines G hétérotrimériques (rectangle vert). La croyance veut que ces protéines G soient responsables de l'activation des diverses voies de signalisation dont les cascades des MAP kinases (rectangle orangé), l'activation de protéines tyrosine kinases (rectangle bleu), de la voie Jak/STAT (rectangle jaune) ainsi que plusieurs autres cascades de signalisation.

Tout d'abord, les protéines de la classe $G\alpha_i$ sont impliquées dans l'inhibition de la production d'AMPc (Hung et al., 1992). L'activation des protéines G, par le récepteur PAR-1, est également impliquée dans la génération d'inositol triphosphate (InsP3), de

l'acide arachidonique suite à l'activation de la PLD (phospholipase D) et de la PLA₂ (Phospholipase A₂), de la libération de Ca²⁺ intracellulaire, de la génération de DAG et de l'activation de protéines kinases C (PKCs) classiques (Macfarlane et al., 2001).

Une autre voie de signalisation induite par l'activation du récepteur PAR-1, et qui est relayée via l'activation de G α_{12} , est celle des petites protéines G monomériques de la famille Rho (Seasholtz et al., 1999). L'activation de Rho par G $\alpha_{12/13}$ est relayée par un GEF spécifique à Rho (p115 Rho-GEF). Ce GEF est activé en s'associant par son domaine RGS (regulator of G protein Signaling) à la protéine G α_{12} (Fukuhara et al., 1999). De plus, il a été démontré que diverses petites protéines G monomériques, de différentes familles, relayent l'activation de plusieurs voies de signalisation. En effet, l'activation de la voie Jak/STAT, médiée par le récepteur PAR-1, est relayée par l'activation des petites protéines G Rho et Rac (Pelletier et al., 2003b), et la voie des MAP kinases (Widmann et al., 1999) est induite par une cascade signalétique G $\alpha_{i/o}$ / Ras. En effet, l'activation prolongée de ERK1/2 par la thrombine est sensible à la toxine pertussique et la génistéine (Meloche et al., 1992; Macfarlane et al., 2001). Par contre, l'activation précoce de ces MAP kinases par la thrombine n'est pas influencée par cette toxine, ce qui semble indiquer qu'elle n'est pas relayée via cette protéine G hétérotrimérique (Macfarlane et al., 2001). De plus, il semble que l'activation de ces MAP kinases est effectuée via la transactivation du récepteur de l'EGF (Macfarlane et al., 2001). Rho est également impliqué dans l'activation de JNK, de la phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3 kinase) et de la Rho-kinase (ROCK) (Macfarlane et al., 2001). Il a aussi été démontré que les petites protéines G monomériques Rho, Rac et Cdc42 sont impliquées dans l'activation de la voie NF-kappaB (Sulciner et al., 1996; Perona et al., 1997; Montaner et al., 1998). Il est connu que la voie de signalisation NF-kappaB est activée par la thrombine, qu'elle est responsable de la production autocrine de diverses cytokines, dont l'IL-6, et qu'elle est impliquée dans la prolifération et la survie cellulaire (Nakajima et al., 1994; Shin et al., 1999; Darnell JE Jr, 2002).

L'activation de plusieurs isoformes de la PI-3 kinase par la thrombine est relayée en partie via l'activation de l'isoforme γ -p110. Par contre, il semble que l'activation de cette

kinase est relayée via différents mécanismes dépendant du type cellulaire et que plusieurs mécanismes distincts peuvent être empruntés à l'intérieur d'un même type cellulaire (Macfarlane et al., 2001). Une fois activées, les différentes isoformes de la PI-3 kinase sont impliquées dans la production de phosphatidylinositol(3,4,5)trisphosphate (PIP3). De plus, il est intéressant de noter que l'activation de cette kinase relaye l'activation de plusieurs autres kinases dont la p70S6K (Belham et al., 1997) ainsi que la protéine kinase B, communément appelée Akt (Walker et al., 1998). Il est important de noter que ces deux voies de signalisation sont importantes au niveau de la prolifération et de la survie cellulaire (Macfarlane et al., 2001). Il est aussi connu que le récepteur PAR-1 active diverses kinases dont p125FAK et Pyk2 (Macfarlane et al., 2001).

1.2.1.4 Fonctions de la thrombine et du récepteur PAR-1

La thrombine est un stimulus majeur de l'aggrégation plaquettaire initiant une série d'événements coordonnés, entre autre grâce à l'expression très vaste du récepteur PAR-1 (Eidt et al., 1988). En effet, les lésions vasculaires nécessitent une implication de plusieurs types cellulaires afin de favoriser la guérison des blessures. La thrombine permet la réorganisation du cytosquelette associée avec le processus d'aggrégation plaquettaire. De plus, elle permet la relâche de plusieurs facteurs de croissance et d'hormones différentes qui, par leurs actions, induisent également une multitude de réponses physiologiques et participent activement aux fonctions physiologiques de la thrombine (Macfarlane et al., 2001) (voir Tableau 1.5). Par exemple, lors du processus de guérison vasculaire, la thrombine facilite l'adhérence rapide des neutrophiles, monocytes et lymphocytes à la couche de cellules endothéliales, en plus de stimuler la contraction et l'augmentation de la perméabilité des cellules endothéliales. Ce procédé est effectué, en partie, par la régulation de l'organisation de jonction cellule-cellule induite par la thrombine (Macfarlane et al., 2001).

Tableau 1.5. Rôles du récepteur PAR-1 de la thrombine dans différents tissus (tiré de Pelletier, 2003a).

Tissu	Type cellulaire	Effets
Système respiratoire	Epithélium trachéal, Fibroblastes, SMCs	↑ Relâche de PDGF; relaxation/contraction; ↑ relâche de prostaglandines; ↑ production de collagène; ↑ prolifération.
Sang	Plaquettes	Activation; dégranulation; ↑ Aggrégation; ↑ [Ca ²⁺]; ↑ thromboxane A ₂ .
Os	Ostéoblastes	↑ [Ca ²⁺]; ↑ prolifération.
Tissus conjonctifs	Fibroblastes sinuvials	↑ prolifération; ↑ IL-6; ↑ GM-CSF.
Système cardiovasculaire	VSMCs, endothélium	Relaxation/Contraction; mitogène; ↑ [Ca ²⁺]; ↑ facteur de von Willerbrand; ↑ NO (oxyde nitrique); ↑ de l'expression de P-sélectine et ICAM.
Épiderme	Kératinocytes	↑ [Ca ²⁺]; ↑ prolifération; inhibe la différenciation.
Système immunitaire	Monocytes, Cellules T	↑ [Ca ²⁺]; ↑ IL-6; ↑ IL-1; ↑ TNF-α; dégranulation et activation.
Intestin	SMCs	Relaxation/contraction.
Reins	Cellules épithéliales glomérulaires, cellules mésangiales glomérulaires	Relâche de TGF-β.
Système nerveux	Cellules gliales, astrocytes, neurones	↑ [Ca ²⁺]; ↑ prolifération; renversement de la <i>stellation</i> ; Induit l'apoptose chez les neurones.
Muscle squelettique	Myocytes	↑ [Ca ²⁺].
Estomac	SMCs	Relaxation/Contraction.

Il est aussi connu que la thrombine est un mitogène très puissant pour les cellules d'origine mésenchymateuses. Dans les fibroblastes, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses vasculaires, la thrombine stimule l'augmentation de la synthèse d'ADN et induit la prolifération cellulaire avec une efficacité comparable au sérum (Chen et Buchanan, 1975; McNamara et al., 1993). La thrombine a aussi été démontré comme étant un agent mitogénique pour certaines cellules d'origine hématopoïétiques, tel que les lymphocytes, ainsi que pour d'autres types cellulaires, tel que les ostéoblastes (Chen et Buchanan, 1975; Abraham et Mackie, 1999). La thrombine relaye ses effets mitogéniques en partie de façon synergique en induisant la production et le relâchement de divers facteurs de croissance, tel que le PDGF et l'ET-1 (Macfarlane et al., 2001). Il est également connu que la thrombine participe aux diverses étapes de la guérison vasculaire en stimulant, par exemple, la synthèse de collagène dans les VSMCs et les fibroblastes de poumon, ainsi que l'induction des MMP (*Matrix MetalloProteinases*) (Macfarlane et al., 2001); des enzymes impliquées dans la première étape de l'initiation de l'angiogénèse. De plus, le récepteur PAR-1 a été impliqué dans des phénomènes de transformation et d'invasion cellulaire, suggérant un rôle important au niveau de l'oncogénèse. Également, une surexpression de ce récepteur a été observé dans plusieurs spécimens de biopsie de cancer du sein ainsi que

dans diverses lignées métastatiques (Even-Ram et al., 1998; Even-Ram et al., 2001; Martin et al., 2001).

Au niveau cardiovasculaire, la thrombine et les TRAPs induisent, *in vitro*, une vasorelaxation dépendante de l'endothélium vasculaire chez plusieurs espèces (Muramatsu et al., 1992; Ku et Dai, 1997). Cette réponse est relayée via le relâchement d'oxyde nitrique (NO) et de prostaglandines I₂ par l'endothélium, suggérant que la thrombine exerce un contrôle sur la pression sanguine locale suite à une lésion vasculaire (Ku et Dai, 1997).

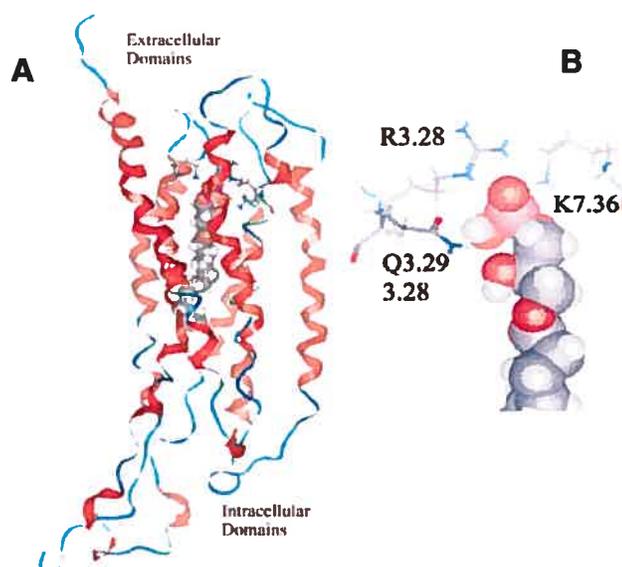
1.2.2 Le récepteur LPA₁ de l'acide lysophosphatidique (LPA)

Le LPA est un médiateur des lysophospholipides, tout comme le Sphingosine-1-phosphate (S1P), et active une sous-famille de GPCRs appelée Edg/LP. Il est le plus petit et le plus simple phospholipide connu, en plus d'être un facteur du sérum dérivé des plaquettes, et provoque une panoplie d'effets biologiques. Ses récepteurs sont exprimés de façon ubiquitaire et ils sont couplés à plusieurs classes de protéines G hétérotrimériques, soit G α_i , G α_q et G $\alpha_{12/13}$, afin de médier une variété impressionnante de réponses. Ces réponses incluent la prolifération des fibroblastes, l'aggrégation plaquettaire, la motilité cellulaire, l'invasion des cellules tumorales et la rétraction des neurones. Le LPA sert de modèle d'agoniste de GPCRs activant les protéines G monomériques Ras, Rac (via G α_i) et RhoA (via G $\alpha_{12/13}$), conduisant respectivement à l'activation de la voie des MAP kinases ainsi qu'à la réorganisation du cytosquelette d'actine.

1.2.2.1 Structure du récepteur LPA₁

La famille des récepteurs du LPA comprend quatre membres distincts (LPA₁₋₄) dont le premier a été cloné en 1996 dû à son expression prédominante dans la zone ventriculaire du cortex cérébral (Anlinker et Chun, 2004). Par la suite, les autres récepteurs ont été découverts par homologie de séquences. Bien que les quatre membres sont exprimés chez les mammifères, uniquement trois d'entre eux possèdent une forte homologie, soit le LPA₁

/ EDG-2 (*Endothelial Differentiation Gene*) / VZG-1 (*Ventricular Zone Gene 1*), le LPA₂ / EDG-4_{non-mutant} et le LPA₃ / EDG-7. Récemment, le dernier récepteur de cette famille, le LPA₄, a été cloné chez l'Homme. Ce récepteur a environ 20% d'homologie avec les trois autres membres de cette famille et il est davantage similaire aux récepteurs de nucléotides de la famille P2Y des GPCRs (Anliker et Chun, 2004).



Le récepteur LPA₁ de mammifère est une protéine de 41 kDa formée de 364 acides aminés avec une structure contenant sept passages transmembranaires (Ishii et al., 2004). Il est le récepteur de cette famille le plus largement exprimé. Il est fortement exprimé au niveau des testicules, du cerveau, du cœur, des poumons, du petit intestin, de l'estomac, du thymus, du muscle squelettique, de la rate, du placenta, du colon, des reins, en plus d'être exprimé modestement dans le pancréas, les ovaires et la prostate. Un haut niveau de ce récepteur se retrouve également dans la zone ventriculaire du cortex cérébral durant la neurogénèse et dans les oligodendrocytes et les cellules de Schwann chez l'adulte (Mills et Moolenaar, 2003; Ishii et al., 2004). De plus, des études d'hybridation *in situ* ont démontré un patron d'expression variant à l'intérieur d'un même tissu (Ishii et al., 2004).

1.2.2.2 Mécanisme de régulation du récepteur LPA₁

1.2.2.2.1 Activation

Le récepteur LPA₁ est un GPCR classique s'activant de la même manière que les autres récepteurs de cette superfamille. Un ligand se lie au récepteur, induit un changement de conformation qui stimule l'échange de GDP en GTP sur les sous-unités G α des protéines G hétérotrimériques et, conséquemment, la dissociation des sous-unités α des dimères $\beta\gamma$. Ces sous-unités activent par la suite une série d'effecteurs tel que l'adénylyl cyclase, ainsi que diverses phospholipases et protéines kinases (Claing et al., 2004). Récemment, une étude de modélisation a permis d'identifier un résidu du récepteur LPA₁ responsable de la sélectivité au LPA. Une analyse par ordinateur des interactions de la liaison ligand-récepteur a prédit qu'il s'agit de l'acide aminé Gln125, ce qui a été confirmé par une étude de mutagenèse dirigée. Un modèle informatique du complexe LPA₁-LPA, dérivé d'études d'arrimage, a été créé (Figure 1.9.) et démontre que les acides aminés Lys294, Arg124 et Gln125 sont essentiels pour l'interaction ligand-récepteur, en plus d'être conservés au travers de la famille des récepteurs EDG. La Lys294 et l'Arg124 forment des paires d'ions avec le groupement phosphate du LPA tandis que le Gln125 échange des liens hydrogènes avec le LPA (Wang et al., 2001).

1.2.2.2.2 Inactivation

Il est suggéré que la régulation de l'activité du récepteur LPA₁ s'effectue via un cycle de phosphorylation-déphosphorylation de résidus sérine et thréonine situés sur sa 3^e boucle cytoplasmique ou sur sa queue C-terminale, comme pour la majorité des GPCRs (Pitcher et al., 1998; Ferguson, 2001, Murph et al., 2003). Par contre, bien peu est connu sur l'inactivation du récepteur LPA₁, incluant son internalisation et son « *trafficking* » subséquent (Murph et al., 2003). Par la suite, les arrestines favorisent l'internalisation des récepteurs via des vésicules tapissées de clathrine et ils sont ultimement déphosphorylés et recyclés à la membrane, ou dégradés. La principale différence entre le mode d'inactivation du récepteur LPA₁ et du PAR-1 est que le récepteur de la thrombine ne peut être recyclé à

la membrane dû à son mode d'activation par clivage protéolytique, comparativement au LPA₁, où un ligand « exogène » se lie sur le récepteur afin d'induire son changement conformationnel. Récemment, il a été démontré que l'internalisation du récepteur LPA₁ s'effectue via deux régulateurs de l'endocytose de la voie des vésicules tapissées de clathrine; la dynamine 2 ainsi que Rab5a. En effet, une forme dominante négative de la dynamine 2 (K44A) ou de la GTPase Rab5a (S34N) inhibe fortement l'internalisation de ce récepteur. De plus, ces deux formes inactives inhibent l'activation transcriptionnelle du facteur de réponse au sérum (SRF) par LPA₁ (Murph et al., 2003).

1.2.2.3 Signalisation cellulaire

La grande variété des réponses cellulaires et biologiques du LPA est expliquée par le fait que ses récepteurs peuvent coupler, comme mentionné au début de cette section, trois classes de protéines G hétérotrimériques ($G_{\alpha i}$, $G_{\alpha q}$ et $G_{\alpha_{12/13}}$), qui elles, activent une multitude d'effecteurs (van Corven et al., 1989; van Corven et al., 1993; Hordijk et al., 1994). Par l'activation de $G_{\alpha q}$, le LPA stimule la cascade signalétique de la PLC (Phospholipase C), comprenant l'hydrolyse du PIP₂ (phosphatidylinositol-bisphosphate) et la génération de multiples seconds messagers activant la PKC (Protéine Kinase C) (van Corven et al., 1989).

En activant $G_{\alpha i}$, le LPA conduit à l'inhibition de l'adénylyl cyclase (AC) et donc, à l'inhibition de l'accumulation d'AMPc. De plus, il stimule la cascade signalétique Ras-MAP kinases et l'activation de la voie PI3-kinase. L'activation de cette dernière mène à l'activation de Tiam1, un GEF de la GTPase Rac, de Rac puis finalement d'Akt / PKB (van Corven et al., 1989; van Corven et al., 1993; Cook et al., 1993; Van Leeuwen et al., 2003). Il est intéressant de noter que les souris déficientes en Tiam1 sont résistantes aux carcinomes de la peau, ce qui suggère que l'activation de Tiam1 par le LPA est impliquée dans l'initiation de tumeurs (Malliri et al., 2002). Bien que le mécanisme d'activation de Ras par le LPA reste encore flou, certaines évidences suggèrent qu'il implique le GEF, SOS (*Son Of Sevenless*) (Hordijk et al., 1994). En résumé, l'activation de $G_{\alpha i}$ par le LPA induit

la progression du cycle cellulaire via Ras-MAP kinase et la survie cellulaire via les voies PI-3 kinase/Akt et Ras/ERK (*extracellular-signal-regulated kinase*) (van Corven et al., 1989; Fang et al., 2000).

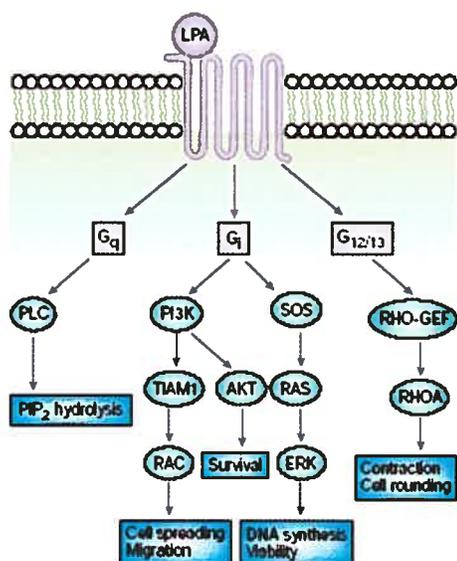


Figure 1.10. Principales voies de signalisation activées par le LPA (tiré de Mills et Moolenaar, 2003). Le LPA signale au travers de ses propres GPCRs via au moins trois classes distinctes de protéines G hétérotrimériques, soit G_q , G_i et $G_{12/13}$, menant à l'activation de multiples effecteurs. Parmi les voies de signalisation principales du LPA, il y a les protéines G_q (et/ou G_i) qui activent la PLC (phospholipase C), menant à l'hydrolyse du PIP2 avec une mobilisation du calcium (Ca^{2+}) et l'activation de la PKC. Les protéines G_i activent la voie de Ras-ERK, stimulant la prolifération cellulaire, en plus de stimuler la survie cellulaire en activant la voie PI-3 kinase-AKT qui supprime l'apoptose. Les protéines $G_{12/13}$ activent les petites GTPases Rho et Rac via RhoGEF et TIAM1, ce qui mène à la réorganisation du cytosquelette, à des changements morphologiques et à la migration cellulaire.

La classe de protéines G hétérotrimériques $G_{12/13}$, lorsqu'activée par le LPA, mène à l'activation de la petite protéine G monomérique RhoA, impliquée dans la réorganisation du cytosquelette des cellules. Le LPA active RhoA via la stimulation de Rho-GEF, un facteur d'échange GDP/GTP de RhoA (Kranenburg et al., 1999; Etienne-Manneville et Hall, 2002). Il est intéressant de noter que les petites protéines G monomériques de la famille Rho, RhoA et Rac, sont activées par deux cascades signalétiques distinctes, soit $G_{\alpha_{12/13}}$ -Rho GEF et G_{α_i} -PI3-kinase-Tiam1, respectivement. Leur activation est impliquée dans la migration et l'invasion cellulaire en plus d'avoir un impact sur la progression du cycle cellulaire (Etienne-Manneville et Hall, 2002).

1.2.2.4 Fonctions du LPA et du récepteur LPA₁

Dans certaines conditions pathophysiologiques, comme dans les maladies vasculaires, cancers, troubles neuronaux ou d'inflammation, des composantes en aval de la cascade signalétique des récepteurs du LPA peuvent être altérées, en particulier Ras ou Rho. De plus, l'augmentation ou la diminution de l'expression des sous-types des récepteurs du LPA, altérant leur ratio, ainsi que l'augmentation de leur disponibilité aux ligands lysophospholipidiques aux sites de blessures ou d'inflammation, semble contribuer aux maladies et pourraient constituer d'importantes cibles thérapeutiques.

Par des études génétiques, il a été démontré que le récepteur LPA₁ est impliqué dans le développement normal de la souris. Un taux de mortalité périnatale de 50% a été observé chez les souris déficientes en LPA₁ dans un « *background* » génétique mixte (Contos et al., 2000). Les souris LPA₁^{-/-} survivantes ont une masse corporelle inférieure aux souris de type sauvage, en plus d'afficher une déformation cranio-faciale ainsi qu'une augmentation de l'apoptose dans les cellules de Schwann du nerf sciatique (Contos et al., 2000; Weiner et al., 2001). Une déficience au niveau de l'allaitement, découlant d'une défaillance olfactive, serait en cause au niveau de la mortalité périnatale et de la réduction de la masse corporelle de ces souris. De plus, dans les fibroblastes et les neuroblastes embryonnaires, une diminution de la réponse au LPA au niveau de la migration et de la prolifération cellulaire démontre un rôle fonctionnel non-redondant *in vivo* du récepteur LPA₁ (Contos et al., 2000; Contos et al., 2002).

Les actions du LPA peuvent être rapides, telles que l'induction de changements morphologiques, la motilité, la chemo-attraction et l'invasion; effectuées indépendamment de la synthèse de nouvelles protéines. Par contre, ces actions peuvent également être à long terme et résulter de la transcription génique. De ces actions, il y a la stimulation de la progression du cycle cellulaire, l'augmentation de la viabilité cellulaire, la guérison de lésions et la production de facteurs pro-angiogéniques tel que l'IL-6, le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) et l'IL-8 (Mills et Moolenaar, 2003). Il est intéressant de noter

que, bien que la plupart du temps le LPA augmente la viabilité cellulaire, il peut également induire la nécrose et l'apoptose dans les cellules neuronales PC12 (Holtsberg et al., 1998). Il a également été proposé que le LPA contribue à l'athérosclérose. En effet, le LPA induit plusieurs réponses vasculaires telles que l'augmentation de la perméabilité endothéliale, l'altération de la contractilité, la prolifération et la différenciation des cellules musculaires lisses vasculaires, affectant ainsi la pression sanguine (van Leeuwen et al., 2003).

Tableau 1.6. Principaux effets biologiques du LPA et du récepteur LPA₁ (Adapté de Contos et al., 2000; Mills et Woolenaar, 2003; Ishii et al., 2004).

Effets	Type cellulaire	Voies de signalisation majeures / effecteurs
Prolifération cellulaire	Plusieurs types cellulaires normaux ou transformés	G _i -Ras-ERK1/2
Survie cellulaire		G _i -PI3K-Akt(PKB)
Migration cellulaire (dirigée ou non)	Divers types cellulaires normaux ou transformés	G _i -PI3K-TIAM1-Rac (avec RhoA et Cdc42)
Invasion tumorale in vitro	Hépatomes, carcinomes, lymphomes T	
Guérison de lésions in vitro	Peau, épithélium intestinal	
Changements morphologiques	Arrondissement cellulaire, rétraction axonale et dendritique	G _{12/13} -RhoGEF-RhoA
	Étalement cellulaire, protrusion des lamellipodes	G _i -PI3K-TIAM1-Rac
Inhibition/renversement de la différenciation	Cellules neuroblastes (inhibition de la croissance axonale et dendritique)	G _{12/13} -RhoGEF-RhoA
	Astrocytes (renversement de la stellation)	MAPK ERK et p38
	Cellules musculaires lisses (perte de la contractilité)	
Contraction	Cellules musculaires lisses, myofibroblastes	G _{12/13} -RhoGEF-RhoA
Augmentation de la perméabilité endothéliale	Cellules endothéliales micro- et macrovasculaires	G _{12/13} -RhoGEF-RhoA
Inhibition de la communication par jonctions-gap	Fibroblastes, hépatomes, cellules épithéliales	G _q -PLC
Récepteur	Signalisation et réponses cellulaires	
LPA ₁	ADN ↑ (incorporation de BrdU), SRE ↑ (activation), MAPK ↑ (activation), AC ↓ (inhibition), PLC/Ca ↑ (augmentation de [Ca ²⁺] _i), Rho ↑ (formation de fibres de stress; arrondissement cellulaire), PI3K/Akt ↑ (production d'IP; inhibition de l'apoptose), relâchement d'acide arachidonique	

De plus, le LPA contribue à la tumorigénèse en augmentant la motilité et l'invasion cellulaire (Imamura et al., 1993; Fishman et al., 2001). Il est intéressant de noter que le fluide d'ascite des cellules cancéreuses d'ovaires est un mitogène très puissant *in vitro* et *in vivo*. Cet effet mitogénique est en corrélation avec les hauts niveaux de production de LPA par ces cellules, comparativement aux cellules épithéliales d'ovaires sains (Mills et al., 1998). Plusieurs études ont impliqué le LPA dans l'initiation ou la progression de

différentes formes de cancers, incluant le cancer de la tête et du cou, de la thyroïde, de la prostate, du sein, de l'intestin et de mélanomes (Mills et Moolenaar, 2003). Au niveau thérapeutique, il est intéressant de mentionner que le LPA peut servir de marqueur diagnostique, ou d'indicateur de la réponse thérapeutique, puisqu'il migre des cavités péritonéales jusqu'à la circulation. De ce fait, ce phénomène biologique diagnostique a été observé et utilisé à des fins thérapeutiques chez des patients atteints de myélomes, d'un cancer de l'utérus et du col de l'utérus, ainsi que chez des patients sous dialyse rénale (Okita, 1994; Xu et al., 1998; Sasagawa et al., 1998; Sasagawa et al., 1999). En bref, le LPA est clairement impliqué au niveau de plusieurs conditions pathophysiologiques d'où l'importance de comprendre davantage ses mécanismes de signalisation dans ces divers désordres physiologiques.

2. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

L'objectif premier de la présente étude était de caractériser le rôle de la voie de signalisation Jak/STAT dans la réponse mitogénique des GPCRs. Les études menées à ce jour tendent à démontrer un rôle pour cette voie dans la réponse mitogénique des GPCRs, mais restent plutôt vagues et incomplètes sur le rôle spécifique des différents membres de la voie Jak/STAT dans cette réponse. Les travaux effectués dans notre laboratoire ont permis d'établir un modèle convaincant quant à l'activation de la voie de signalisation Jak/STAT par les GPCRs, impliquant les petites protéines G de la famille Rho. Pour faire suite, nous avons comme objectif d'éclaircir le rôle de chacun des membres de la voie de signalisation Jak/STAT, activés en réponse aux GPCRs, en utilisant diverses approches complémentaires comme la surexpression de régulateurs négatifs naturels, ainsi que des vecteurs rétroviraux encodant des shRNAs. De cette façon, nous espérons caractériser de façon claire et précise le rôle des membres de la famille des Jaks et des STATs, ainsi que déterminer s'il existe une redondance fonctionnelle entre les membres respectifs de ces deux familles de protéines dans la réponse mitogénique des GPCRs.

3. MATÉRIEL / MÉTHODES

3.1 Réactifs, anticorps et plasmides

La thrombine, le LPA et la doxycycline hyclate (Dox) ont été achetés de la compagnie Sigma-Aldrich. L'Angiotensine II (AngII) a été achetée de la compagnie Hukabel Scientific (St-Laurent, Montréal, Québec, Canada). Les anticorps polyclonaux de lapin pour Jak1 (sc-7228), Jak2 (sc-294), Tyk2 (sc-169) et Akt (C-20), ainsi que l'anticorps polyclonal de chèvre anti-HA (sc-805), sont de Santa Cruz Biotechnology (Santa-Cruz, CA, USA). Les anticorps polyclonaux pour phospho-Jak1 (Tyr1022/Tyr1023), phospho-Jak2 (Tyr1007/Tyr1008), phospho-STAT1 (Ser727) et l'interféron-gamma (IFN- γ) sont de BioSource International. Les anticorps polyclonaux anti-phospho-Tyk2 (Tyr1054/Tyr1055), anti-phospho-STAT3 (Tyr705), anti-phospho-STAT3 (Ser727), anti-STAT3, anti-phospho-STAT1 (Tyr701), anti-STAT1, anti-phospho-Akt (Ser473), anti-phospho-Akt (Thr308) et l'anticorps monoclonal (MAb) phospho-p44/42 *mitogen-activated protein kinase* (Thr202/Tyr204) E10 sont de Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). Les anticorps anti-Myc MAb et anti-HA MAb ont été préparés par le laboratoire à partir des cellules hybridomes 9E10 et 12CA5 respectivement. Le milieu conditionné de LIF (*Leukaemia Inhibitory Factor*) utilisé pour différentes stimulations a été produit par le laboratoire. Les régions codantes des constructions dominantes-négatives originales des Jaks (Jak1 K833E, Jak2 Δ VIII, Tyk2 K930R) ont été amplifiées par PCR avec de nouveaux sites de restriction, de part et d'autre de la séquence codante, vérifiées par séquençage, puis sous-clonées dans un vecteur pcDNA₃-Myc₆ dont le site de multi-clonage avait préalablement été modifié. La construction de la forme dominante-négative de STAT3 (STAT3 EE \rightarrow AA) a été effectuée par sous-clonage dans un vecteur pcDNA₃-Myc₆, dont le site de multi-clonage avait préalablement été modifié. Les constructions rétrovirales inductibles ont été effectuées par sous-clonage de la séquence codante (avec l'étiquette Myc₆ dans le cas des Jaks et de l'étiquette HA dans le cas de STAT3) des constructions

pcDNA₃, effectuées préalablement, dans le vecteur rétroviral inductible pRetro-OFF (Clontech, Palo Alto, CA) qui nous a gracieusement été fourni par le Dr. Trang Hoang (IRIC, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada). Les constructions dominantes-négatives originales nous ont été gracieusement fournies par différents groupes de recherche (Jak1 K833E et STAT3 EE→AA; Dr. James N. Ihle du département de Biochimie du *St-Jude Research Hospital*, Memphis, TN, USA, Jak2ΔVIII; Dr. Don M. Wojchowski du *Center for Gene Regulation, Pennsylvania State University, University Park*, Pennsylvanie, USA, Tyk2 K930R; Dr. Sandra Pellegrini de l'Institut Pasteur, INSERM, Paris, France). Les constructions originales pcDNA₃-SOCS 1 et 3 nous ont gracieusement été fournies par le Dr. Douglas J. Hilton (*Cancer and Haematology Division, The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research (WEHI)* et le *Cooperative Centre for Cellular Growth Factors, Parkville, Victoria, Australie*).

3.2 Culture cellulaire et transfections

La lignée cellulaire fibroblaste de rat, Rat-1, a été cultivée et synchronisée par privation de sérum comme décrit précédemment (Meloche, 1995). Les cellules Rat-1 ont été cultivées dans du milieu MEM (« Modified Eagle medium ») contenant 10% de sérum de veau (CS; *calf serum*). Les cellules HEK 293 ont été cultivées dans du milieu MEM contenant 10% de sérum de bovin fœtal (FBS; *fœtal bovine serum*). Les cellules musculaires lisses vasculaires de rat (VSMC) ont été cultivées dans du milieu DMEM (« Dulbecco's MEM ») contenant 10% de sérum de veau. Les fibroblastes d'embryons de souris (MEF) ont été cultivés dans du milieu DMEM contenant du sérum de bovin fœtal. Finalement, les fibroblastes de souris NIH 3T3 ont été cultivés dans du milieu DMEM contenant 10% de sérum de veau. Le milieu conditionné Wnt3A et Wnt5A a été produit de la manière suivante; à environ 50% de confluence, des cellules contrôle (LEF, HC-11) et surexprimant Wnt3a (LEF-Wnt3A) et Wnt5A (HC-11 Wnt5A) ont été mises dans un milieu sans sérum. 48 heures plus tard, le milieu de chaque lignée a été récupéré et filtré. Les cellules Wnt3A nous ont gracieusement été fournies par le Dr. Guy Sauvageau (IRIC,

Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada) et les cellules Wnt5A par le Dr. Nancy E. Hynes (Friedrich Miescher Institute, Suisse). La lignée clonale stable de VSMC surexprimant I κ B α -2N Δ 4 nous a gracieusement été fournie par le Dr. Marc Servant de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Montréal (Montréal, Québec, Canada). Les cellules MEFs *SOCSI*^{+/+} et *SOCSI*^{-/-} nous ont gracieusement été fournies par le Dr. Subburaj Ilangumaran, maintenant établi à la Faculté de Médecine, division Immunologie, de l'Université de Sherbrooke (Sherbrooke, Québec, Canada). Les antibiotiques, pénicilline (50U/ml) et streptomycine (50 μ g/ml), ont été ajoutés à tous les milieux de culture. Toutes ces lignées cellulaires ont été conservées dans une atmosphère humidifiée et comportant 5% de CO₂.

3.3 Production de MEFs à partir de croisements de souris *Tyk2*^{+/-} et mise au point (développement) du protocole de génotypage

Préparation des MEFs

La génération des souris « *knockouts* » a été décrite précédemment (Karaghiosoff et al., 2000). Deux portées d'embryons, au 14^e jour embryonnaire, ont été digérées séparément dans de la trypsine de façon répétitive jusqu'à ce qu'il ne reste que le cartilage et l'ADN. Après filtration, les cellules de chaque embryon ont été étalées séparément, chacun sur un pétri de 10 cm de diamètre, dans du milieu DMEM 10% FBS. Le lendemain, le milieu de chaque pétri a été remplacé par du milieu frais. Une fois rendu à confluence, les cellules ont été trypsinées, puis diluées dans 10 pétris de 10 cm de diamètre. Une fois confluentes, les cellules ont été trypsinées, concentrées, puis congelées (1 vial de cellules / 1 pétri de 10 cm de diamètre).

Génotypage

La progéniture du croisement de deux souris *Tyk2*^{+/-} a été génotypé par PCR (*polymerase chain reaction*) utilisant de l'ADN isolé des queues (et/ou membres) et une approche de génotypage à quatre amorces a été utilisée afin de distinguer les embryons de

type sauvage (*wild-type*; WT) des embryons hétérozygotes (HT) et des mutants « *knockouts* » (KO). Les deux amorces spécifiques à Tyk2 sont : Tyk2-1 (sens); AAG CAC CTT TCC TCA CTG GCT CCC et Tyk2-2 (anti); ATT ACT AAT CAA TCT GAG CAC TCA TTC ACC et les deux amorces spécifiques à Neo sont : Neo1; ATG CTC TTC GTC CAG ATC ATC et Neo2; CTT GGG TGG AGA GGC TAT TC. Les deux amorces Tyk2 génèrent une bande à 405-pb représentant l'allèle de type sauvage et les deux amorces Neo génèrent une bande à 445-pb représentant l'allèle mutant.

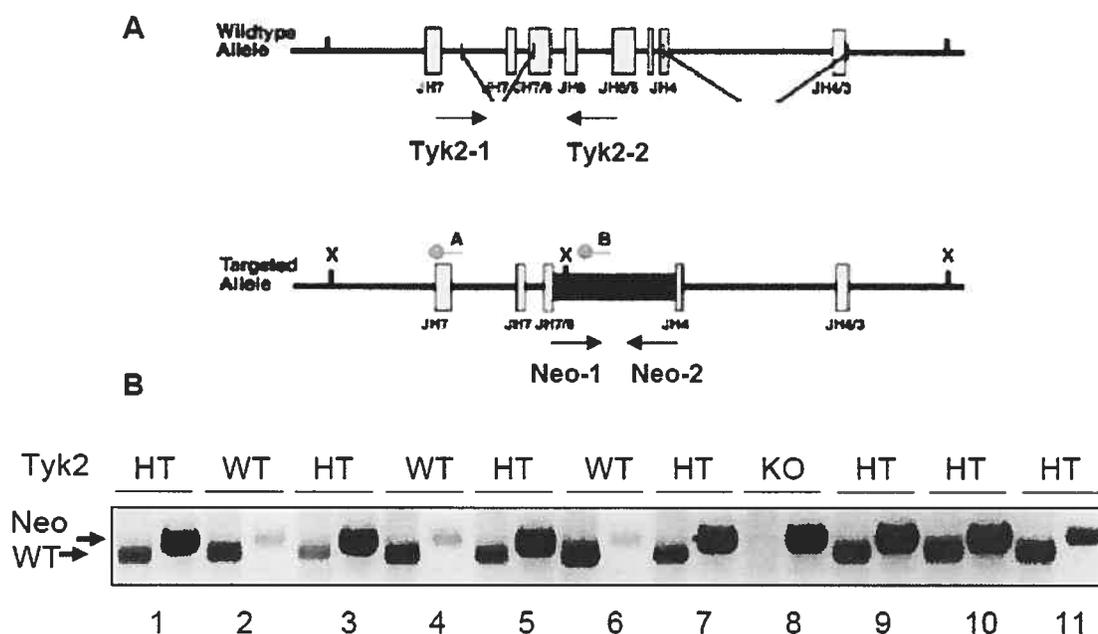


Figure 3.1. Analyse génotypique des embryons de souris Tyk2. A. Le locus génomique normal de Tyk2 est montré en premier lieu, et en-dessous se trouve le locus mutant (qui a été ciblé) (Karaghiosoff et al., 2000). Les flèches inscrites Tyk2-1, Tyk2-2, Neo-1 et Neo-2 représentent les amorces utilisées pour le génotypage par PCR. B. Les produits de PCR provenant de l'ADN des queues (et/ou membres), amplifiés utilisant les quatre amorces montré en A. L'amplification de l'allèle de type sauvage (*wild-type*; WT) avec les amorces Tyk2-1 et Tyk2-2 résulte en une bande de 405 pb, tandis que celle obtenue par l'amplification de l'allèle mutée, avec les amorces Neo-1 et Neo-2, est de 445 pb. Le gel montre les résultats provenant embryons normaux (2, 4, 6), Tyk2^{+/-} (1, 3, 5, 7, 8, 9, 10) et Tyk2^{-/-} (8).

3.4 Analyse d'immunobuvardage

Des cellules Rat1, VSCMs ou MEFs arrêtées, ont été stimulées avec de la thrombine, du LPA, du LIF, de l'IFN γ ou du sérum de veau, pour les différents temps indiqués, à 37°C dans une atmosphère contenant 5 % de CO $_2$. Les lysats cellulaires ont été préparés et une quantité équivalente de protéines a été déposée sur gel SDS-PAGE (10%) et transférée sur membrane de nitrocellulose Bio-Rad, dans un tampon de transfert contenant 25 mM de Tris et 192 mM de glycine. Par la suite, les membranes ont été bloquées pendant 1 heure à 25°C dans du TBS / 0.1% (v/v) Tween 20 / 5% (w/v) lait écrémé en poudre, puis incubées toute la nuit (over night; O.N.) à 4°C avec l'anticorps désiré sur un agitateur. Par la suite, les membranes ont été lavées 3-4 fois avec du TBS/0.1% (v/v) Tween 20 (TBS/T) avant une incubation de 1 heure à 25°C, avec les divers anticorps secondaires *horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit* ou *anti-mouse* ou *anti-goat* IgG (GRP-HRP/ GMP-HRP/ GGP-HRP) dilués 1:5000 dans du tampon de blocage. Les bandes immunoréactives ont été détectées par chemiluminescence (*enhanced chemiluminescence; ECL*). La lyse cellulaire et l'analyse des immunobuvardages ont été effectuées comme décrit précédemment (Pelletier et al., 2003b). Les immunobuvardages, à l'aide d'anticorps phospho-spécifiques, ont été effectués selon les spécifications du fabricant.

Le « *stripping* » des membranes a été effectué en lavant les membranes 2 fois au TBS/T, suivi d'une incubation de 30 minutes à 50°C dans une solution de « *stripping* »; 2% SDS, 100mM β - mercaptoéthanol et 63 mM de tris pH 6.8. Par la suite, les membranes ont été lavées 3 fois durant 5 minutes avec du TBS/T, bloquées 1 heure à 25°C dans une solution de TBS/T 5% lait écrémé, lavées 3 fois au TBS/T puis incubées O.N. avec le nouvel anticorps primaire.

3.5 Vecteurs rétroviraux et génération de lignées stables

Les constructions de SOCS1 et 3 ont été clonées dans un vecteur rétroviral pLPC. 24 heures après la transfection des constructions rétrovirales dans les cellules d'emballage HEK 293 avec la technique de FuGene6, le milieu viral a été déposé sur des cellules Rat1 et VSMC pour une incubation de 24 heures. Suite à cette incubation, une seconde incubation de 24 heures avec du milieu viral frais a été effectuée. 48 heures après la deuxième infection, les cellules ont été sélectionnées à 3 µg/ml de puromycine pendant 3 jours.

Les lignées cellulaires Rat1-pLPC et Rat1-pLPC-Myc₆-SOCS1 ont été générées par infection d'une lignée de type sauvage de Rat1 avec des virus amphotrophiques encodant soit le vecteur rétroviral pLPC seul ou exprimant Myc₆-SOCS1. Suite à la sélection des cellules, des clones ont été isolés par « dilution limite ». Les résultats présentés ont été obtenus avec une population de clones représentatifs (Rat1-pLPC-Myc₆-SOCS1). La même approche a été utilisée pour l'isolement de clones stables de VSMCs exprimant fortement Myc₆-SOCS1.

Le plasmide pMSCVpuro utilisé afin de générer les constructions encodant des shRNAs nous a gracieusement été fourni par le Dr. Eric Devroe du département de *Cancer Cell Biology* à l'Institut du Cancer Dana-Farber (Boston, MA, USA). Les constructions rétrovirales exprimant des shRNAs pour Jak2 et STAT3 ont été construites en suivant le protocole déjà établi par Sui G. et al. (2002). Elles ont, par la suite, été transfectées avec la technique Fugene6 dans des fibroblastes de souris (NIH 3T3) ou de rat (Rat-1). Par la suite, ces cellules ont été sélectionnées dans 2,5 µg/ml de puromycine pendant 3 jours, puis des lignées clonales stables ont été générées par « dilution limite ». Il est essentiel de mentionner que les séquences cibles choisies pour être incluses dans le vecteur de shRNAs sont empiriques et que l'efficacité de cette approche dépend directement du fait qu'une certaine région d'un ARNm peut être davantage susceptible qu'une autre à un RNAi.

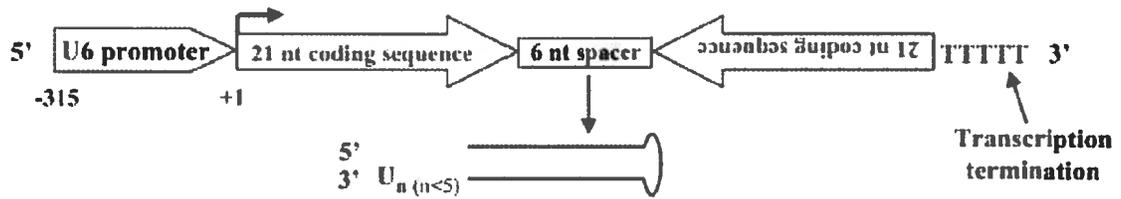


Figure 3.2. Structure du vecteur rétroviral pMSCV encodant des shRNAs. Le promoteur U6 de ce vecteur permet la transcription d'une séquence encodant des shRNAs. Cette séquence est composée d'une répétition inversée dont chacun des motifs individuels possède 21 pb de longueur correspondant à la région codante du gène d'intérêt. Les deux motifs sont séparés par un « spacer » de 6 pb. Il est attendu que le RNAi formé se repliera sur lui-même formant ainsi un shRNA (short-hairpin; double stranded(ds)RNA). Le signal de terminaison de la transcription (TTTTT) est ajouté en 3' à la fin de la répétition inversée (Sui et al., 2002).

Les lignées cellulaires Rat1-pcDNA₃, Rat1-pcDNA₃-Myc₆-Jak1 KE, Rat1-pcDNA₃-Myc₆-Jak2ΔVIII, Rat1-pcDNA₃-Myc₆-Tyk2 K930R et Rat1-pcDNA₃-Stat3 EEAA-HA ont été générées par transfection des différentes constructions dans une lignée de type sauvage Rat1 à l'aide de la technique Fugene6. Après 3 jours, les diverses lignées cellulaires ont été sélectionnées à 400µg/ml de néomycine (G418) pendant 10 jours.

3.6 Prolifération cellulaire et synthèse de protéines

Incorporation de [³H] thymidine / leucine

Des cellules Rat1 ou VSMCs (en triplicata; trois puits), dans des plaques de 24 puits, ont été stimulées pendant 24 heures à la thrombine, au LPA, à l'AngII ou au sérum de bovin, dans du milieu sans sérum contenant 0.5-2.0 µCi/ml [³H] thymidine / leucine. La synthèse d'ADN de fibroblastes Rat1 et de VSMCs a été mesurée par incorporation de thymidine tritiée pendant les 4 dernières heures d'une stimulation de 24 heures aux différents agonistes pour les Rat1. En ce qui a trait aux VSMC, l'incorporation de thymidine tritiée a été effectuée durant la totalité des 24 heures de la stimulation. La synthèse protéique a été mesurée par incorporation de leucine tritiée pendant 24 heures d'une stimulation de 24 heures aux différents agonistes. Après cette stimulation, la

radioactivité incorporée dans les précipités de TCA a été mesurée au compteur de scintillation.

Essais de MTT

Cet essai reflète le nombre de cellules viables et est basé sur la réduction métabolique du bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium (MTT) par les déshydrogénases mitochondriales. Des expériences préliminaires ont été effectuées afin d'étaler la bonne densité de cellules pour ne pas qu'elles atteignent confluence avant la fin de l'essai. Des cellules Rat1-pLPC et Rat1-pLPC-Myc₆-SOCS1 ont été étalées dans des plaques de 96 puits (en quadruplicatas; 4 puits), 2000 cellules par puit. Le jour suivant, les cellules ont été rincées avec du milieu sans sérum, puis du milieu sans sérum (100µl/puit), +/- thrombine (1U/ml) ou LPA (20µM) a été ajouté. Le milieu a été remplacé aux deux jours avec du milieu frais sans sérum +/- thrombine (1U/ml) ou LPA (20µM). À la fin de la cinétique de prolifération, 50 µL de MTT: PBS (5mg/mL) a été ajouté à chacun des puits, et les plaques ont été placées à 37°C, à la noirceur, durant 3 heures. 100 µl de diméthylsulfoxyde (DMSO) 2% (v/v) glycine 0.1 M pH 11 a été ajouté à chacun des puits pour solubiliser les cristaux de colorant. La quantité de MTT converti a été mesurée par absorbance à 560 nm et la correction a été effectuée à 620 nm utilisant un spectrophotomètre à plaque multi-puits (TECAN, Genios Plus, USA). Les essais de MTT pour les MEFs *SOCS1*^{+/+} et *SOCS1*^{-/-} ont été effectués de la même façon que pour les Rat1, mais en étalant 1000 cellules par puit.

3.7 Interférence à l'ARN

Les siRNAs ont été achetés de Dharmacon (Lafayette, Colorado, USA) et transfectés dans les cellules Rat1 en utilisant le réactif de transfection Oligofectamine de la compagnie Invitrogen Canada Inc. (Burlington, Ontario, Canada). Les séquences cibles des siRNAs utilisées sont;

5'-AACAGAUUCCGCAGGUUCAUUDtT-3' (Jak2),

5'-AAGGAGUCCAAUGUCCUCUAUdTdT-3' (STAT3),

5'-CGAGAGUGAAGGUGUCUGUdTdT-3 (E2F4).

4. RÉSULTATS

4.1 Activation de la voie de signalisation Jak/STAT par les GPCRs dans les fibroblastes de rat

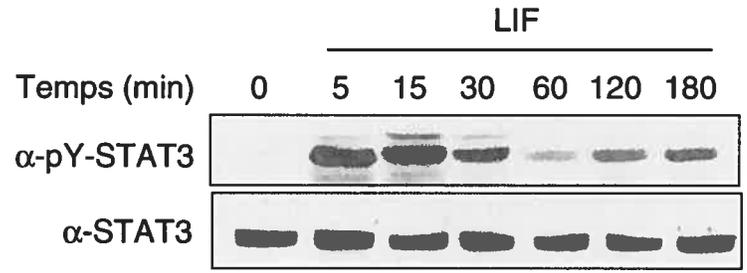
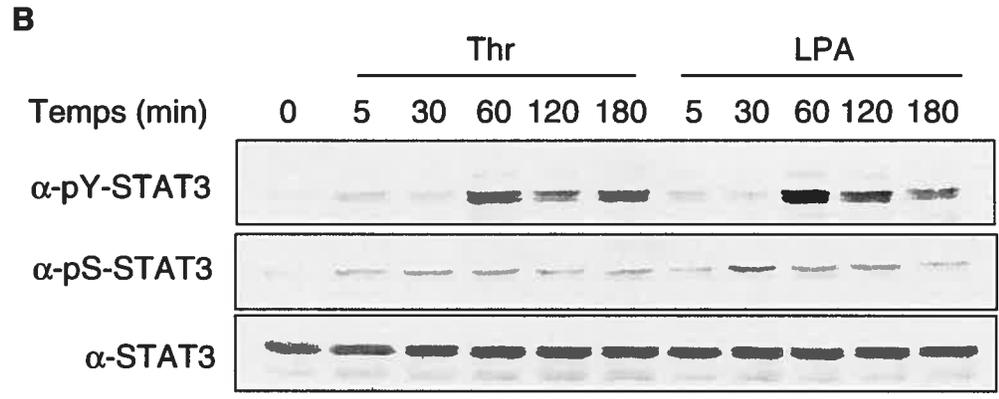
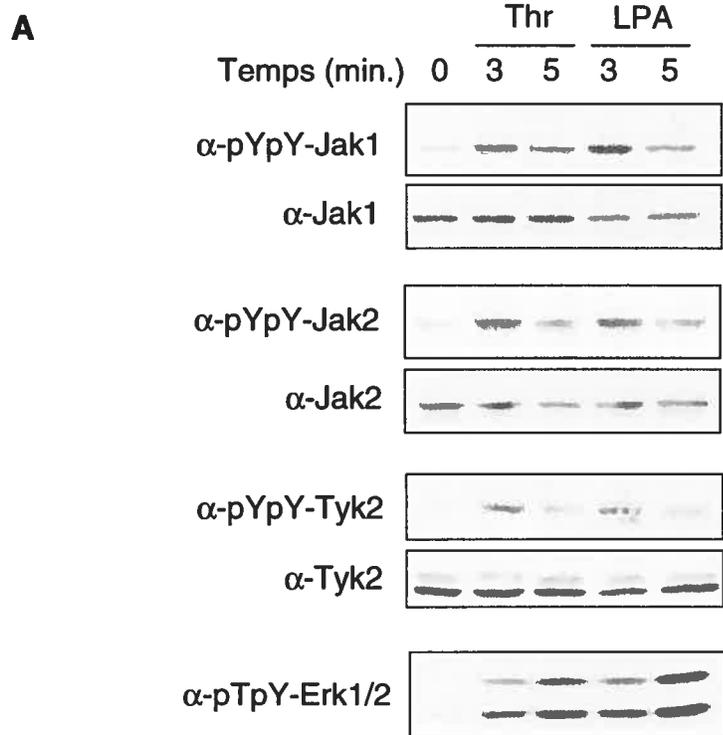
Afin de vérifier la présence ainsi que l'activation des membres de la voie de signalisation Jak/STAT dans les fibroblastes de rat (Rat1), nous avons stimulé ces cellules avec deux agonistes de GPCRs, soit la thrombine (Thr) et l'acide lysophosphatidique (LPA). Les récepteurs de ces agonistes sont considérés de façon générale comme étant représentatifs de la famille des GPCRs et servent donc de modèles d'études. L'activation des Jaks a été mesurée, ou quantifiée, par immunobuvardage à l'aide d'anticorps phospho-spécifiques pour les résidus tyrosine de la boucle d'activation de ces mêmes Jaks. Nous avons observé une activation rapide des Jaks (Jak1, Jak2 et Tyk2) en réponse aux GPCRs dans les cellules Rat1 (Figure 4.1 A). L'activation des MAP kinases Erk1/2, en réponse à la thrombine et au LPA, a servi de contrôle positif pour cette expérience (Figure 4.1 A).

Par la suite, nous avons examiné la régulation de STAT3, un membre de la famille des STATs, par les GPCRs. Nous avons concentré notre étude sur STAT3 principalement, en raison de ses caractéristiques mitogéniques et oncogéniques. En effet, comme mentionné précédemment, STAT3 a été observé sous forme constitutivement active dans plusieurs types de cancers, en plus d'avoir un potentiel de transformation des fibroblastes de souris (Bromberg et al., 1999; Bowman et al., 2000; Levy et Gilliland, 2000). L'activation de STAT3 a été mesurée par immunobuvardage à l'aide d'un anticorps phospho-spécifique pour la tyrosine en C-terminal permettant la dimérisation. Nous avons observé qu'une stimulation de ces cellules à la thrombine, ou au LPA, induit la phosphorylation de la tyrosine activatrice de STAT3 (Tyr705) (Figure 4.1 B). Nous avons observé que le profil de phosphorylation de la tyrosine activatrice de STAT3, en réponse à la thrombine et au LPA, est biphasique dans les Rat1, comme il a été antérieurement observé par notre laboratoire

dans les cellules musculaires lisses vasculaires (VSMCs) (Pelletier et al. 2003b). Tout d'abord, il y a phosphorylation rapide et faible à 5 minutes, puis un retour au niveau basal de phosphorylation à 30 minutes, et par la suite, un pic de phosphorylation fort à 60 minutes et soutenu jusqu'à au moins 3 heures (Figure 4.1 B). Il est possible d'observer une différence significative entre cette cinétique de phosphorylation de STAT3 et celle induite par une cytokine, tel que le LIF (Figure 4.1 B). En réponse aux cytokines, l'activation de STAT3 est forte et soutenue à partir de 5 minutes jusqu'à au moins 3 heures.

En plus de la phosphorylation sur leur résidu tyrosine, certaines isoformes de STATs sont également régulées par la phosphorylation d'un résidu sérine en C-terminal, compris dans le motif P-(M)-S-P (Decker et Kovarik, 2000). La conséquence fonctionnelle de cette phosphorylation reste encore controversée. Certains groupes ont démontré qu'en mutant cette sérine en alanine, il y avait une réduction de l'activité transcriptionnelle des STATs, tandis que d'autres groupes ont suggéré que cette mutation permettait une activation transcriptionnelle complète (Wen et al., 1995; Kovarik et al., 2001). Nous avons donc examiné la phosphorylation de ce résidu sérine en utilisant un anticorps phospho-spécifique. Comme démontré à la Figure 4.1 B, un traitement à la thrombine ainsi qu'au LPA induit une phosphorylation rapide et soutenue jusqu'à 3 heures de la sérine 727 de STAT3.

Finalement, nous avons montré que le LPA activait la voie de signalisation Jak/STAT dans les cellules musculaires lisses vasculaires (VSMCs), de façon similaire à celle observée dans les fibroblastes de rat (Rat1) (Figure 4.1 C). De plus, nous avons démontré que l'activation de STAT3 par le LPA, dans les VSMCs, est comparable à l'activation induite par la thrombine et l'angiotensine II dans ces mêmes cellules (Figure 4.1 C; Pelletier et al., 2003b). Il est important de mentionner que nous avons démontré pour la première fois, à notre connaissance, que la voie de signalisation Jak/STAT est activée par le LPA.



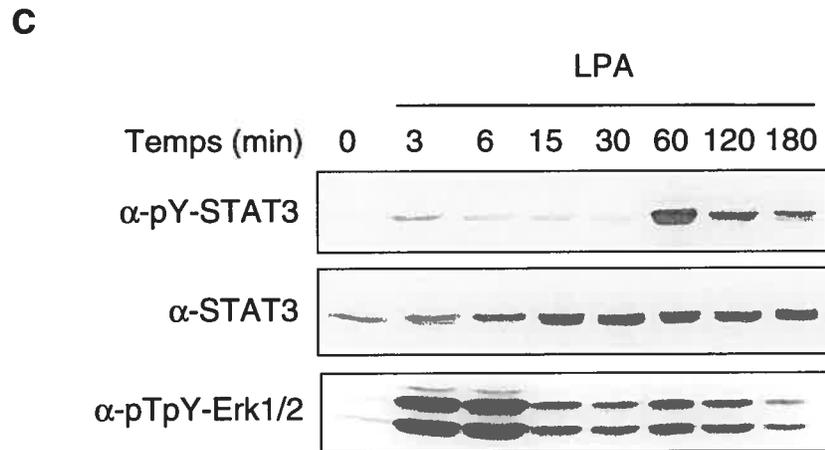
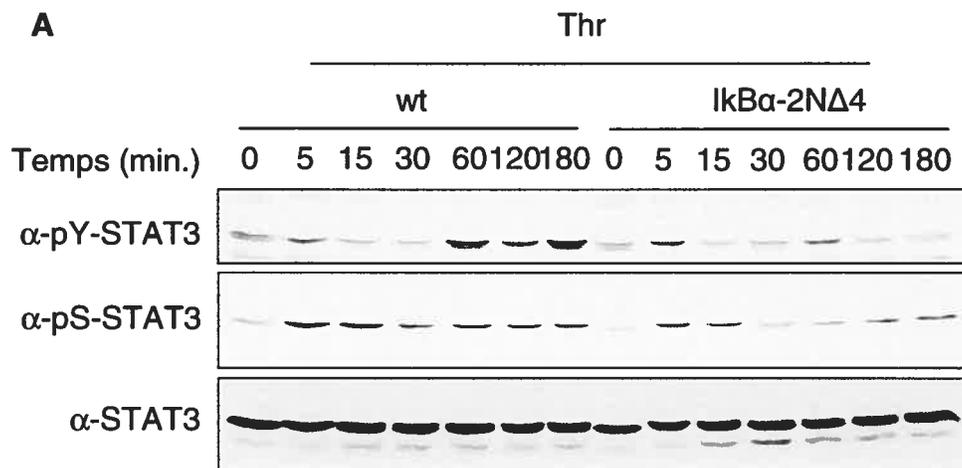


Figure 4.1. Les agonistes de GPCRs activent les Jaks et STAT3 dans les fibroblastes et les cellules musculaires lisses vasculaires de rat. (A) Des cellules Rat1 arrêtées ont été stimulées ou non (contrôle) avec de la thrombine (Thr; 1U/ml) ou de l'acide lysophosphatidique (LPA; 10 μ M) pour les temps indiqués. L'activation des Jaks a été évaluée par immunobuvardage du lysat total de protéines avec des anticorps phospho-spécifiques pour les résidus tyrosine de la boucle d'activation (pYpY). Les niveaux d'expression de Jak1, Jak2 et Tyk2 ont été analysés par immunobuvardage avec des anticorps spécifiques pour chacune des isoformes. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes. (B) Des cellules Rat1 arrêtées ou (C) des cellules musculaires lisses vasculaires arrêtées ont été stimulées avec de la thrombine, du LPA ou du LIF (0,625U/ml) pour les temps indiqués. L'activation de STAT3 a été évaluée par immunobuvardage du lysat total de protéines avec des anticorps phospho-spécifiques pour la tyrosine (Tyr705) en C-terminal de STAT3 ainsi que la sérine (Ser727). L'expression des niveaux de STAT3 a été analysé par immunobuvardage avec un anticorps spécifique pour les deux isoformes de STAT3 (α et β). L'activation des MAP kinases Erk1/Erk2 a été évaluée par immunobuvardage du lysat total de protéines avec un anticorps phospho-spécifique. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

4.2 La phase tardive d'activation de STAT3 en réponse aux GPCRs est dépendante de la voie NF-kB dans les cellules musculaires lisses vasculaires de rat

De récentes études ont proposé que l'activation tardive de STAT3 en réponse aux GPCRs est régulée par la production d'un facteur autocrine, tel que l'IL-6 ou un membre de cette famille de cytokines. Une voie de signalisation bien connue comme régulant l'expression de cytokines est la voie de signalisation NF-kappaB. Il a d'ailleurs été

démontré que cette voie de signalisation est activée par divers agonistes de GPCRs, comme l'angiotensine II et la thrombine (Siebenlist et al., 1994; Nakajima et al., 1994). Ces observations nous ont conduit à examiner le rôle de NF-kappaB dans l'activation de STAT3 par les GPCRs. La surexpression d'une forme non-dégradable d'un régulateur négatif naturel de NF-kappaB, Ikb α , nous a permis d'inhiber l'activation de NF-kappaB en réponse aux GPCRs. Une lignée clonale stable de VSMCs surexprimant Ikb α -2N Δ 4 a été utilisée. Cette lignée inhibe l'activité de NF-kappaB, ainsi que la production de chemokines et de cytokines subséquente à son activation, tel que MCP-1 et l'IL-6 (données non-présentées). Suite à la stimulation de ces cellules avec la thrombine ou le LPA, nous avons remarqué que la 2^e phase d'activation de STAT3 est inhibée; qu'il n'y a plus de phosphorylation en tyrosine, bien que la 1^{ère} phase d'activation est toujours présente (Figure 4.2 A et B). La phosphorylation en sérine de STAT3 en réponse aux GPCRs ne semble pas être inhibée de façon significative par l'inactivation de NF-kappaB, ce qui semble démontrer un rôle spécifique pour la phosphorylation en tyrosine 705 de STAT3 (Figure 4.2 A et B).



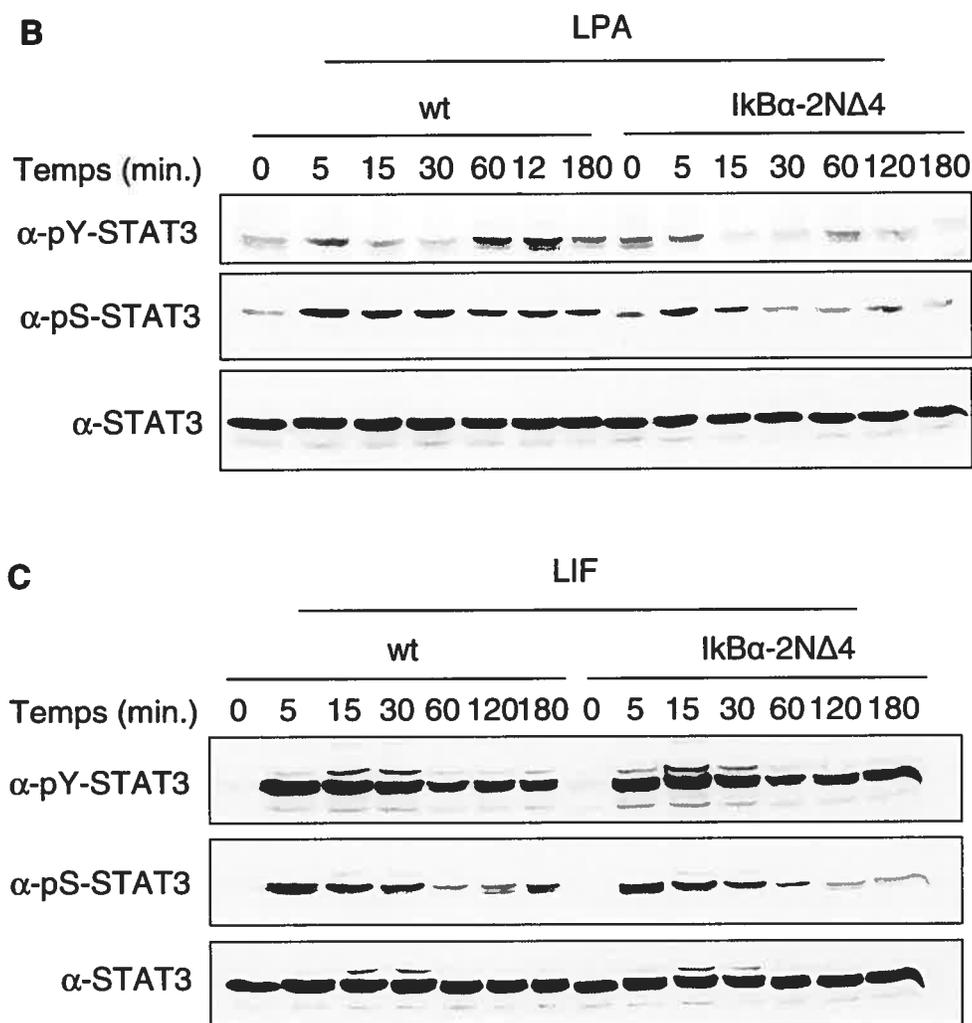


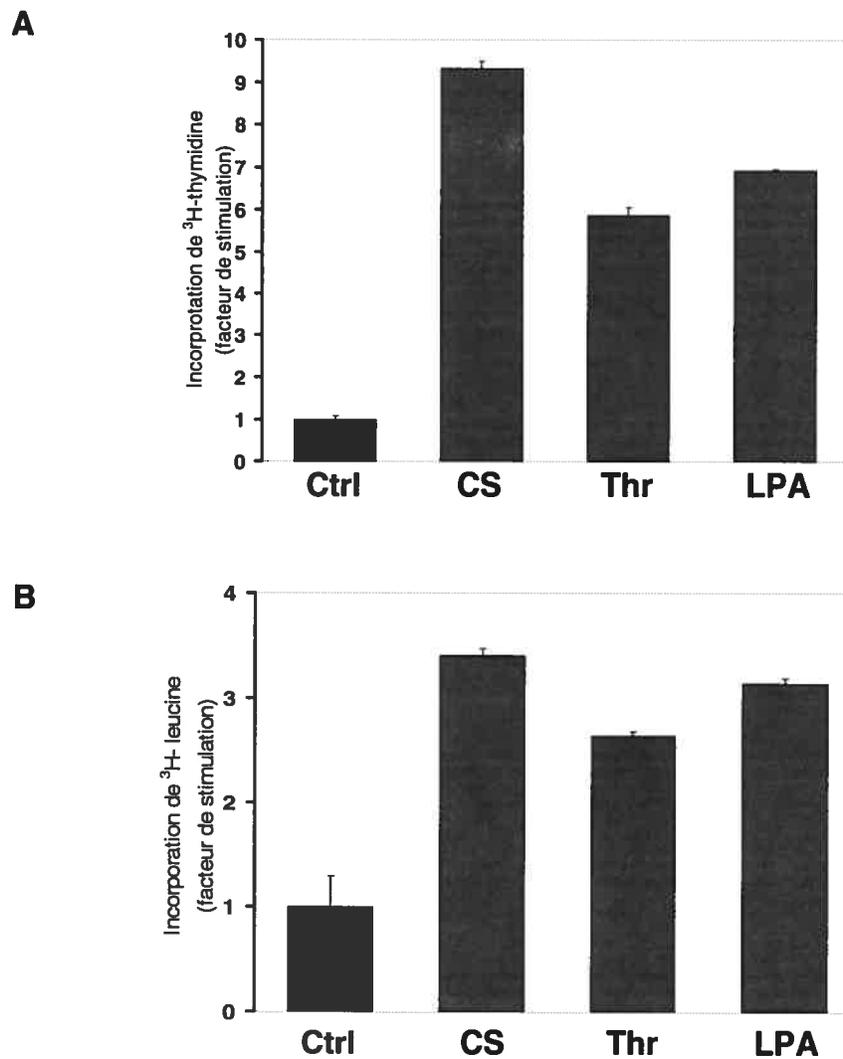
Figure 4.2. NF-kappaB est essentiel à la phase tardive d'activation de STAT3 en réponse aux GPCRs dans les cellules musculaires lisses vasculaires de rat. Des cellules musculaires lisses vasculaires de type sauvage (WT) ou une lignée clonale de cellules musculaires lisses vasculaires surexprimant une forme non-dégradable de IkB α (IkB α -2N Δ 4) arrêtées, ont été stimulées ou non (contrôle) avec (A) de la thrombine (Thr; 1U/ml), (B) du LPA (10 μ M) ou (C) du LIF (0,625U/ml) pour les temps indiqués. L'activation de STAT3 a été évaluée par immunobuvardage du lysat total de protéines avec des anticorps phospho-spécifiques pour la tyrosine (Tyr705) en C-terminal de STAT3 ainsi que la sérine (Ser727). L'expression des niveaux de STAT3 a été analysé par immunobuvardage avec un anticorps spécifique pour les deux isoformes de STAT3 (α et β). Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

Nous avons également remarqué que ce phénomène est spécifique à la stimulation aux GPCRs puisque l'activation de STAT3 par le LIF, une cytokine de la famille de l'IL-6, n'est pas influencée dans les cellules surexprimant $I\kappa B\alpha$ -2N Δ 4, comparativement aux cellules de type sauvage (Figure 4.2 C). Nous avons également observé que la phosphorylation en sérine de STAT3 n'est pas affectée par l'inhibition de l'activité de NF-kappaB en réponse au LIF (Figure 4.2 C). Dans l'ensemble, ces résultats démontrent que NF-kappaB est essentiel à l'activation tardive de STAT3 par les GPCRs, et par conséquent, qu'il est probablement impliqué dans les effets transcriptionnels et biologiques de STAT3 à long terme. Il est intéressant de mentionner, qu'à notre connaissance, il s'agit de la première fois que l'existence d'une régulation positive croisée entre la phosphorylation en tyrosine de STAT3 et NF-kappaB est démontrée en réponse aux GPCRs.

4.3 Les agonistes de GPCRs induisent une activité mitogénique (synthèse d'ADN) et hypertrophique (synthèse protéique) dans les cellules musculaires lisses vasculaires et les fibroblastes de rat

Plusieurs groupes de recherche ont publié, par le passé, diverses études démontrant que la thrombine et le LPA induisent la prolifération cellulaire des VSMCs et des fibroblastes de rat (Chen et Buchanan, 1975; McNamara et al., 1993). De plus, ces deux agonistes ont été démontrés comme induisant la synthèse protéique et l'hypertrophie cellulaire dans diverses lignées cellulaires (Glembotski et al., 1993; Macfarlane et al., 2001; Hilal-Danda et al., 2004). Nous avons tout d'abord vérifié si ces deux agonistes de GPCRs induisaient une activité mitogénique et hypertrophique, en l'occurrence la synthèse d'ADN et protéique, dans les lignées de VSMCs et de fibroblastes de rat (Rat1) que nous utilisons pour ce projet. Nous avons stimulé des VSMCs et des cellules Rat1 à la thrombine et au LPA durant 24 heures, et mesuré l'incorporation de thymidine tritiée (indicateur de la synthèse d'ADN) et de leucine tritiée (indicateur de la synthèse protéique). En réponse à ces stimulations, nous avons observé une augmentation de la synthèse d'ADN d'environ 4.75 fois en réponse à la thrombine et d'environ 6 fois pour le LPA, dans les cellules Rat1.

Ces résultats démontrent un potentiel mitogénique important des GPCRs dans les fibroblastes de rat (Figure 4.3 A). De plus, nous avons observé une augmentation de la synthèse protéique d'environ 1.5 fois pour la thrombine et 2.25 fois pour le LPA, dans les cellules Rat1 (Figure 4.3 B). Ces résultats démontrent que les GPCRs ont un potentiel hypertrophique dans les fibroblastes de rat.



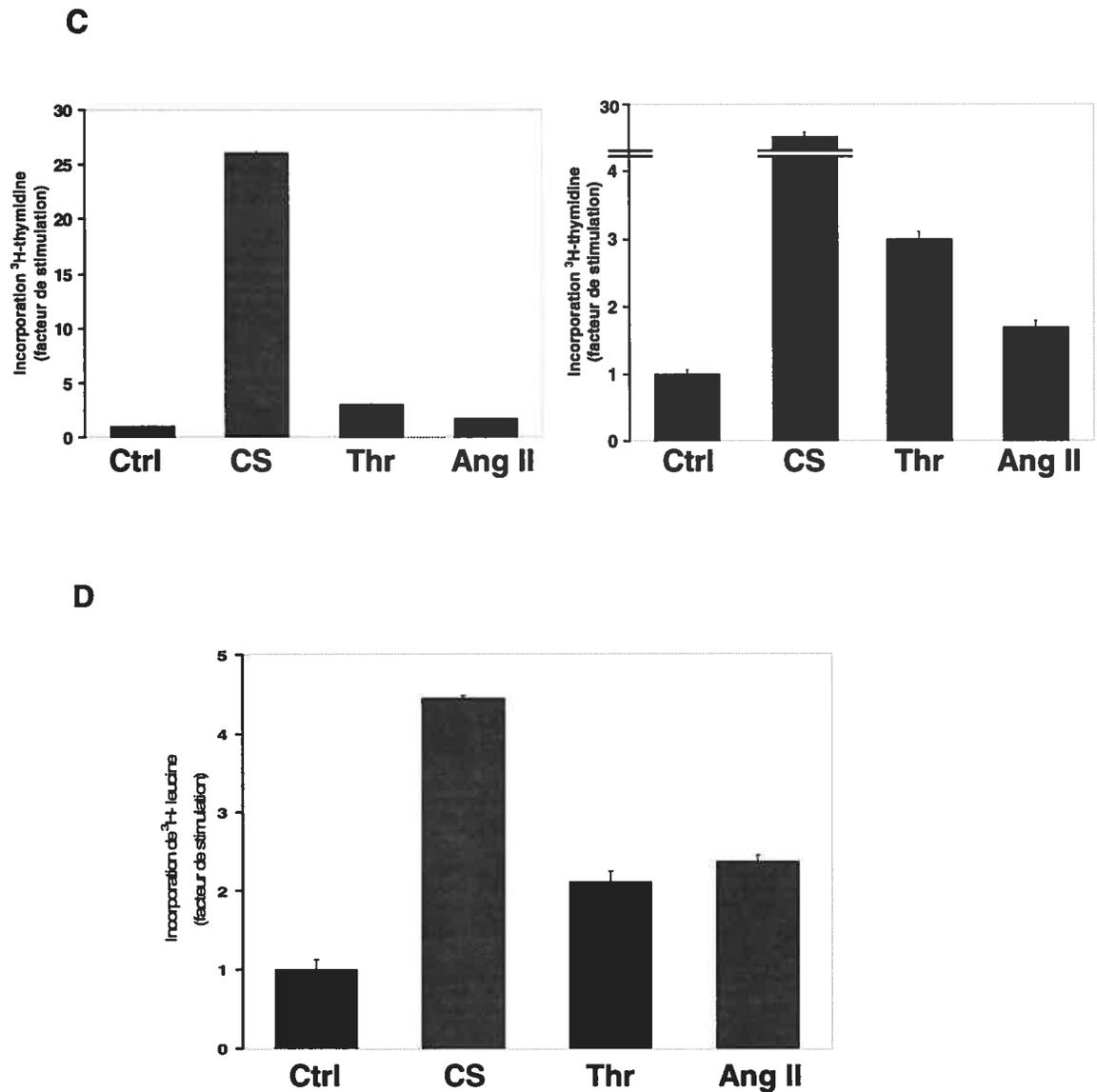


Figure 4.3. Les agonistes de GPCRs induisent la prolifération cellulaire et la synthèse protéique dans les fibroblastes et les cellules musculaires lisses vasculaires de rat. Des fibroblastes (Rat1) (A et B) et des VSMCs (C et D) de rat arrêtées, ont été stimulées au sérum (10%) (CS; *calf serum*), à la thrombine (1U/ml), au LPA (20 μM), ou à l'Ang II (100 nM) durant 24 heures. L'incorporation de thymidine et de leucine tritiées est exprimée en facteur de stimulation par rapport au contrôle (Ctrl). Chaque valeur représente la moyenne des valeurs obtenues d'un triplicata. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

En ce qui a trait aux VSMCs, nous avons observé qu'en réponse à la thrombine, il y a une augmentation d'environ 2 fois de la synthèse d'ADN et de 1 fois pour la synthèse protéique (Figure 4.3 C et D). Pour l'angiotensine II (Ang II), l'augmentation observée

pour la synthèse d'ADN est d'environ 0.75 fois et de 1.25 fois pour la synthèse protéique (Figure 4.3 C et D). Il est essentiel de noter que pour les cellules Rat1, les réponses de la thrombine et du LPA sont relativement du même ordre que celles obtenues en réponse au sérum, tant au niveau de la synthèse d'ADN que de la synthèse protéique (Figure 4.3 A et B). Par contre, au niveau des VSMCs, l'augmentation de la synthèse d'ADN stimulée par la thrombine et l'AngII est extrêmement faible par rapport à celle obtenue en réponse au sérum (Figure 4.3 C). Ce résultat s'explique par le fait qu'il a déjà été démontré que l'AngII ne permet pas le passage de la phase G1 à la phase S des VSMCs (Servant et al., 2000). Le graphique de droite de la Figure 4.3 C, avec une échelle plus restreinte, permet d'observer qu'il y a présence d'une augmentation de la synthèse d'ADN en réponse à l'Ang II et à la thrombine dans les VSMCs, mais qu'elle est très faible. Cette augmentation est difficilement observable lorsqu'elle est comparée avec celle produite par le sérum, tel qu'observé sur le graphique de gauche de la Figure 4.3 C. Nous pouvons conclure que, dans les VSMCs, le potentiel mitogénique des GPCRs est restreint comparativement à celui du sérum.

4.4 La surexpression de SOCS1 bloque l'activation de la voie Jak/STAT en réponse aux GPCRs et aux cytokines dans les fibroblastes de rat

La famille des SOCS est connue depuis plusieurs années comme une des plus importantes voies de rétro-inhibition de la voie de signalisation Jak/STAT. De plus, la méthylation des gènes SOCS1 et SOCS3 a été observée dans plusieurs cancers possédant une activation constitutive de STAT3 (Brender et al., 2001; Suzuki et al., 2001; Nagai et al., 2002; Galm et al., 2003; He et al., 2003; Chim et al., 2004). Il a par ailleurs été démontré qu'une surexpression de SOCS1 et de SOCS3 permet l'inhibition de la phosphorylation de STAT3 en réponse à l'IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor-1*) (Zong et al., 2000). Finalement, il a été démontré que SOCS3 peut lier le récepteur CXCR4 et inhiber sa signalisation en réponse à CXCL12 (Soriano et al., 2002). Toutes ces observations nous ont conduit à développer une approche inhibitrice de la voie Jak/STAT

en utilisant la surexpression d'un membre de la famille des SOCS. À cette fin, nous avons développé des vecteurs rétroviraux encodant deux protéines de la famille des SOCS, soit SOCS1 et SOCS3, les deux membres les plus caractérisés.

En premier lieu, nous avons examiné si la surexpression de ces deux SOCS engendrait l'inhibition de la voie Jak/STAT en réponse aux GPCRs. Pour ce faire, nous avons infecté des cellules Rat1 avec des virus encodant SOCS1 ou SOCS3, puis nous avons sélectionné ces mêmes cellules à la puromycine afin de générer une population stable de cellules surexprimant SOCS1 ou SOCS3. Nous avons observé que la surexpression de SOCS1, dans les cellules Rat1, permet l'inhibition de la phosphorylation en tyrosine de STAT3 en réponse à la thrombine, mais également en réponse à l'IFN- γ (Figure 4.4 A). Nous avons également observé que la surexpression de SOCS1 atténue complètement le niveau basal de phosphorylation en tyrosine de STAT3 (Figure 4.4 A). De plus, nous avons observé que la surexpression de SOCS1 permet l'inhibition de la phosphorylation en tyrosine de STAT1 en réponse aux cytokines, tel que l'IFN- γ , qui nous servait de contrôle positif. À notre surprise, nous avons observé qu'une surexpression de SOCS3 ne permettait pas d'inhiber la phosphorylation, ni de STAT3 ni de STAT1, en réponse aux GPCRs et aux cytokines. Par contre, notre objectif était de développer une approche avec une seule des SOCS; la plus efficace au niveau de l'inhibition de STAT3.

De plus, nous avons observé que, d'une infection à l'autre, la surexpression de SOCS1 peut varier et, par conséquent, que l'inhibition de la phosphorylation en tyrosine de STAT3 peut en être influencée (données non-présentées). En effet, nous avons observé que dans la lignée cellulaire surexprimant SOCS1, présentée à la Figure 4.4 B, la phosphorylation de STAT3 semble être passablement diminuée, sans pour autant être abolie. Ceci est probablement dû au fait que SOCS1 est moins exprimé que dans la Figure 4.4 A. En résumé, ces résultats démontrent qu'une surexpression de SOCS1 peut inhiber la phosphorylation en tyrosine de STAT3 en réponse aux GPCRs dans des cellules Rat1.

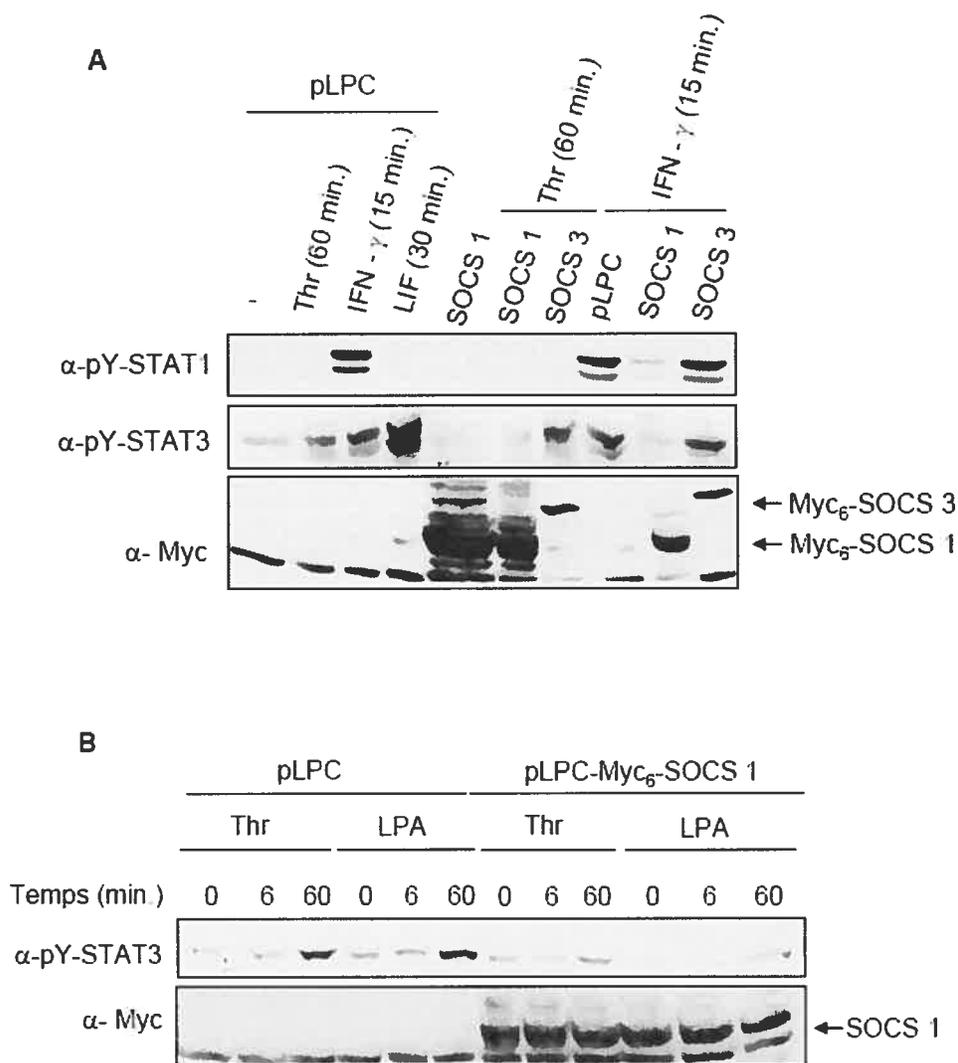
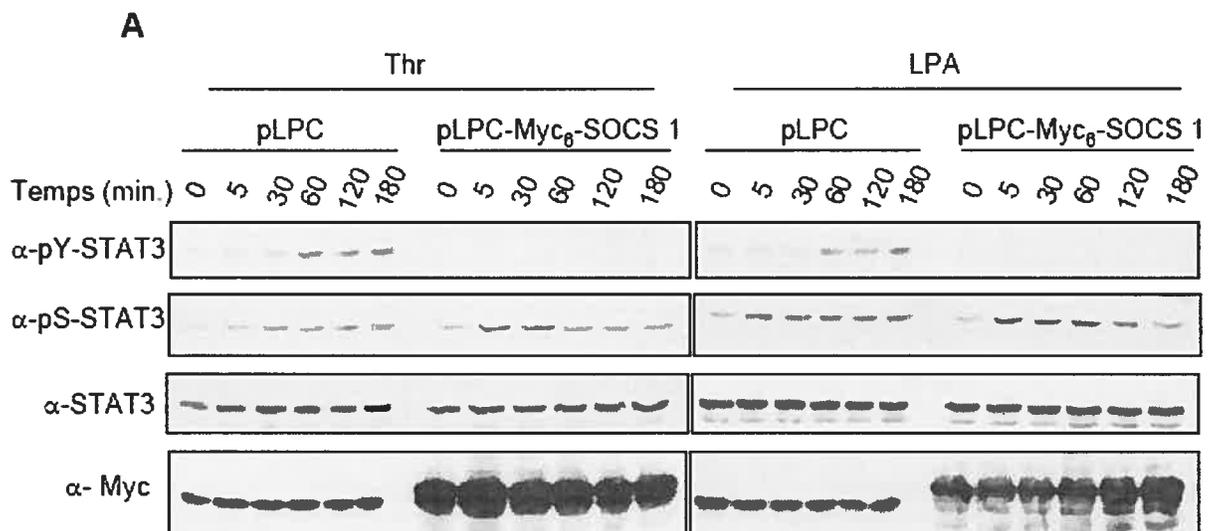


Figure 4.4. La surexpression de SOCS1 bloque l'activation de la voie Jak/STAT en réponse aux GPCRs et aux cytokines dans les fibroblastes de rat. Des lignées clonales stables de Rat1 surexprimant SOCS1 arrêtées, ont été stimulées ou non (contrôle) avec de la thrombine (Thr; 1U/ml) ou de l'acide lysophosphatidique (LPA; 10 μ M) pour les temps indiqués. **(A)** L'activation de STAT3 a été évaluée par immunobuvardage du lysat total de protéines avec des anticorps phospho-spécifiques pour la tyrosine (Tyr705) en C-terminal de STAT3 ainsi que la sérine (Ser727). L'expression des niveaux de STAT3 a été analysé par immunobuvardage avec un anticorps spécifique pour les deux isoformes de STAT3 (α et β), tandis que celle de SOCS1 l'a été avec l'anticorps 9E10 contre l'épitope Myc. **(B)** L'activation des Jaks a été évaluée par immunobuvardage du lysat total de protéines avec des anticorps phospho-spécifiques pour les résidus tyrosine de la boucle d'activation (pYpY). Les niveaux d'expression de Jak1, Jak2 et Tyk2 ont été analysés par immunobuvardage avec des anticorps spécifiques pour chacune des isoformes. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

De récentes études ont suggérée que SOCS1 agirait comme un suppresseur de tumeur, et donc, exercerait un effet anti-prolifératif sur les cellules (Rottapel et al., 2002). Suivant les résultats décrits dans la Figure 4.4 A, ainsi que les données suggérant le rôle anti-prolifératif de SOCS1, nous avons produit des clones stables surexprimant SOCS1 dans les cellules Rat1. Cette approche avait pour but de générer une lignée dont la surexpression de SOCS1 serait maximale et équivalente pour chacune des cellules, afin d'éviter de perdre au travers des passages, les cellules qui le surexprimerait davantage. Nous avons observé que dans les lignées clonales stables surexprimant SOCS1, il y a une inhibition complète de la phosphorylation de la tyrosine 705 de STAT3 en réponse aux agonistes de GPCRs, sans pour autant affecter d'aucune façon la phosphorylation de la sérine 727 (Figure 4.5 A). De plus, nous avons observé que, dans ces cellules, bien que la surexpression de SOCS1 inhibe l'activité des Jaks en réponse aux GPCRs, elle n'empêche pas de façon significative la phosphorylation de leurs résidus tyrosine catalytiques (Figure 4.5 B). Ce résultat signifie que l'inhibition de l'activité catalytique des Jaks par SOCS1 est effectuée indépendamment de leur phosphorylation à court terme. Par contre, il a été observé que l'activation à plus long terme des Jaks (60 min.) est sensiblement affectée par la présence de SOCS1.



Par ailleurs, il est intéressant de mentionner qu'il a déjà été démontré que SOCS1 a de l'affinité pour les formes phosphorylées des Jaks et qu'il lierait uniquement ces formes (Yasukawa et al., 1999). Dans le but de généraliser notre observation, nous avons élargi notre étude aux VSMCs; des lignées clonales stables surexprimant SOCS1 ont été générées dans les VSMCs (Figure 4.5 C). Par contre, la surexpression de SOCS1 dans cette lignée semble être moins importante que dans les Rat1. Il reste toutefois à vérifier si elle est suffisante pour inhiber l'activation de la voie Jak/STAT en réponse aux GPCRs.

De récentes données suggèrent que SOCS1 a d'autres rôles que l'inhibition spécifique de la voie de signalisation Jak/STAT. En effet, SOCS1 peut interagir avec diverses protéines, telles que FAK et Vav, et ainsi réguler leur activité (De Sepulveda et al., 2000; Liu et al., 2003). Par conséquent, nous avons examiné l'impact de la surexpression de SOCS1 sur les autres voies de signalisation majeures impliquées dans la réponse mitogénique des GPCRs. Nous avons tout d'abord examiné la phosphorylation de la kinase AKT. Nous avons observé que, dans les lignées clonales stables de Rat1 surexprimant SOCS1, il n'y a pas d'inhibition de la phosphorylation ni du résidu sérine 473 ni du résidu thréonine 483 de AKT en réponse aux GPCRs (thrombine et LPA). En effet, ces résidus semblent être phosphorylés de façon comparable aux cellules Rat1 contrôle (vecteur vide; pLPC) (Figure 4.6). De plus, nous avons observé qu'une surexpression de SOCS1 dans les fibroblastes de rat n'affecte que très faiblement la phosphorylation des MAPKs Erk1/2, comparativement à celle de STAT3, et ce uniquement à partir de 120 minutes (Figure 4.6).

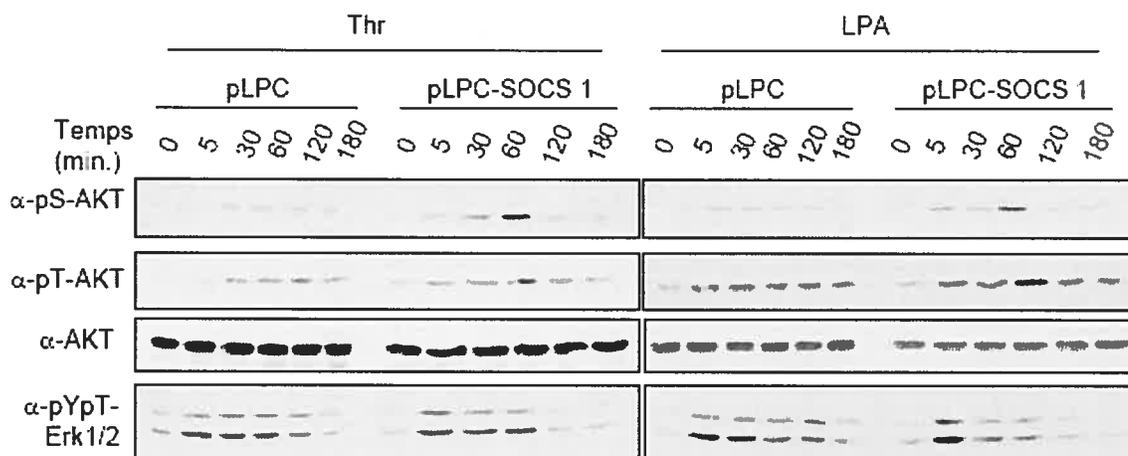


Figure 4.6. Une surexpression de SOCS1 n'inhibe pas l'activation des voies de signalisation AKT et Erk1/2 en réponse aux GPCRs dans les fibroblastes de rat. Des lignées clonales stables de Rat1 surexprimant SOCS1 arrêtées, ont été stimulées ou non (contrôle) avec de la thrombine (Thr; 1U/ml) ou de l'acide lysophosphatidique (LPA; 10 μ M) pour les temps indiqués. L'activation d'AKT a été évaluée par immunobuvardage du lysat total de protéines avec des anticorps phospho-spécifiques pour les résidus sérine 473 (pS) et thréonine 308 (pT) catalytiques. Les niveaux d'expression d'AKT ont été analysés par immunobuvardage avec un anticorps spécifique pour AKT. L'activation des MAP kinases Erk1/2 a été évaluée par immunobuvardage du lysat total de protéines avec un anticorps phospho-spécifique. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

4.5 SOCS1 régule la réponse mitogénique des agonistes de GPCRs dans les fibroblastes de rat

Suite aux résultats décrits dans la Figure 4.5, nous avons examiné l'impact de l'inactivation de la voie Jak/STAT, due à la surexpression de SOCS1, sur la prolifération cellulaire des cellules Rat1 en réponse aux GPCRs. Comme démontré dans la Figure 4.7, la prolifération des cellules Rat1-pLPC-Myc₆-SOCS1 est fortement inhibée en réponse aux agonistes thrombine et LPA, comparativement à celle des cellules Rat1 de type sauvage ou à celle des cellules infectées avec un virus contrôle (Rat1-pLPC). Cette expérience, représentative de trois expériences indépendantes, a été effectuée avec trois différentes lignées clonales stables surexprimant fortement SOCS1.

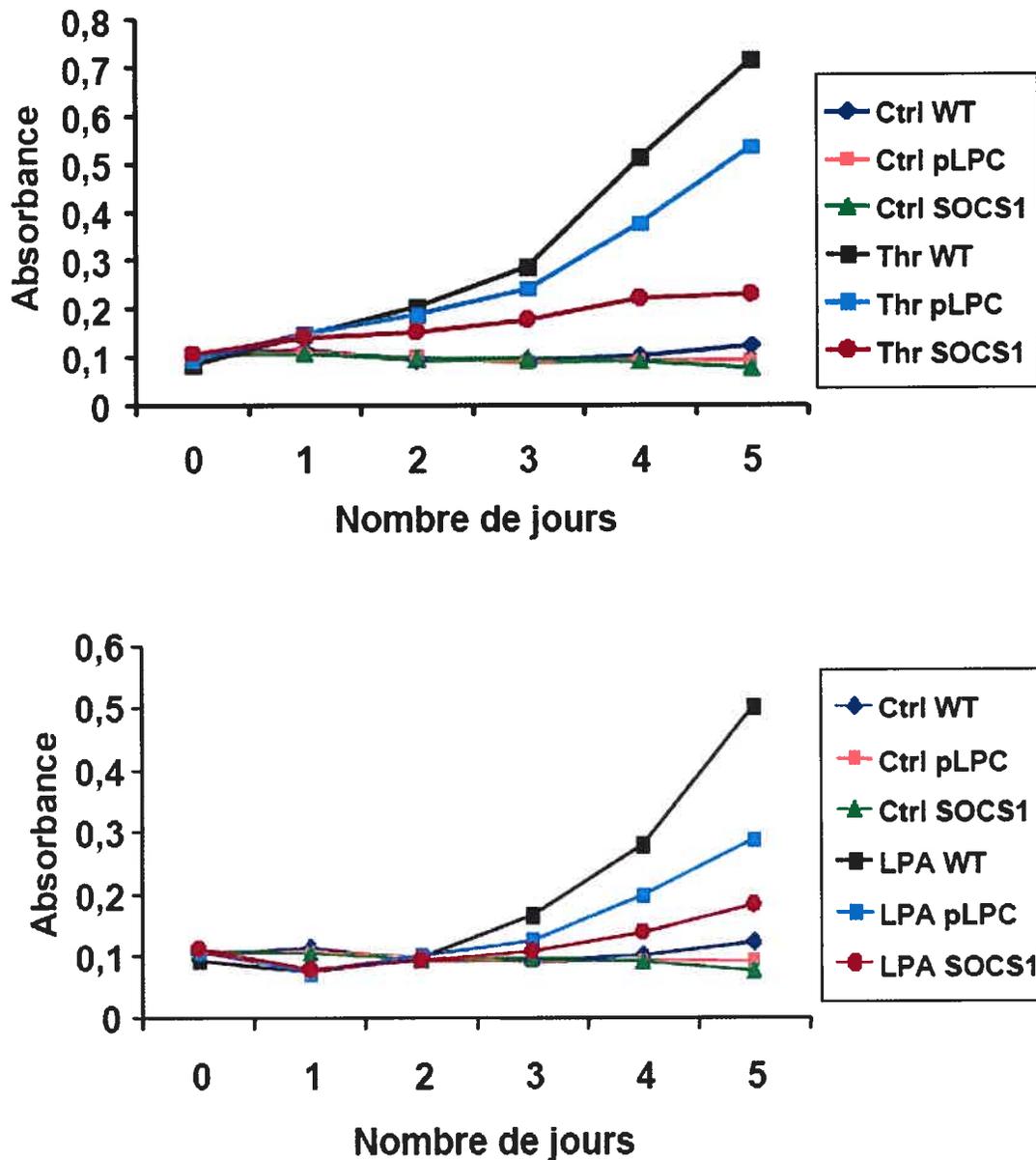
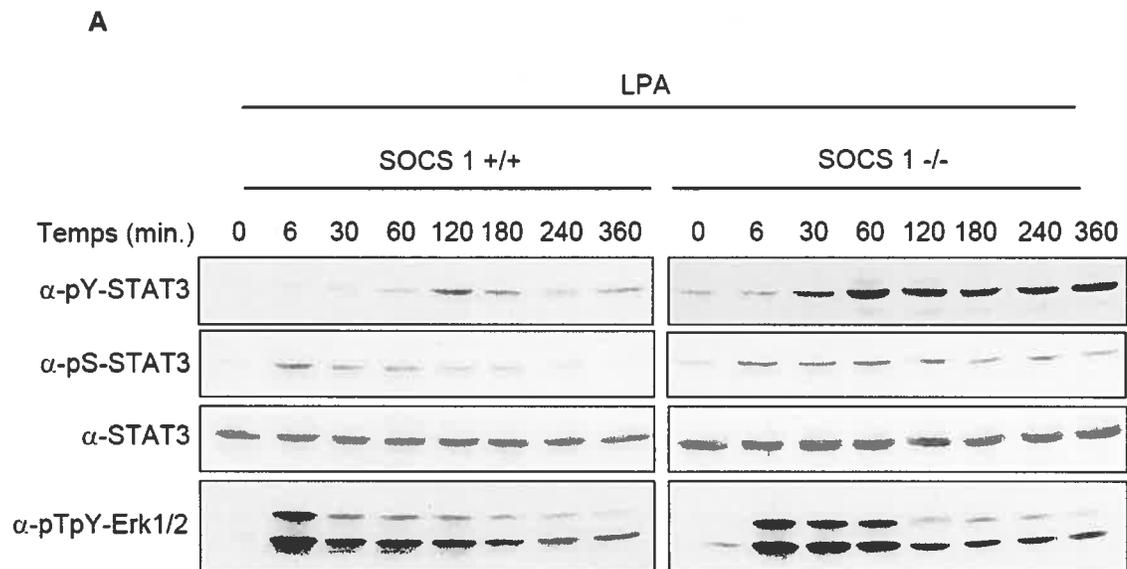


Figure 4.7. Une surexpression de SOCS1 inhibe la réponse mitogénique des agonistes de GPCRs dans les fibroblastes de rat. Courbe de prolifération de cellules Rat1 de type sauvage (WT), infectées avec un vecteur contrôle (V) ou infectées avec un vecteur encodant SOCS1, stimulées ou non (A) à la thrombine (1U/ml) ou (B) au LPA (20 μ M). Chacune des données représente la moyenne d'un quadruplicata. Les données obtenues pour la courbe de prolifération des lignées clonales stables de Rat1-SOCS1 représentent la moyenne obtenue pour trois clones indépendants représentatifs. Les résultats présentés sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

4.6 SOCS1 régule l'activation à long terme de la voie de signalisation Jak/STAT en réponse aux GPCRs dans les fibroblastes de souris

Afin d'évaluer l'importance physiologique de l'implication de SOCS1 dans la régulation de l'activité de la voie Jak/STAT, principalement au niveau de STAT3, nous avons examiné la régulation de la phosphorylation de STAT3 dans des cellules MEFs *SOCS1*^{-/-}. La Figure 4.8 A démontre qu'en réponse au LPA, la phosphorylation en tyrosine de STAT3 est très forte et soutenue à partir de 60 minutes jusqu'à 6 heures, comparativement aux cellules MEFs *SOCS1*^{+/+} de type sauvage. En effet, la phosphorylation de la tyrosine 705 de STAT3 semble atteindre un maximum à 2 heures et redescendre presque au niveau basal par la suite, pour ne remonter que vers 6 heures sans pour autant atteindre son pic (Figure 4.8 A). Cette observation démontre que SOCS1 est également un régulateur négatif naturel de la voie Jak/STAT en réponse aux GPCRs, et qu'il serait directement impliqué et responsable de l'inhibition de l'activation à long terme de STAT3 en réponse aux GPCRs. Par contre, nous n'avons pas été en mesure d'observer une activation de STAT3 en réponse à la thrombine dans ces cellules (données non-présentées).



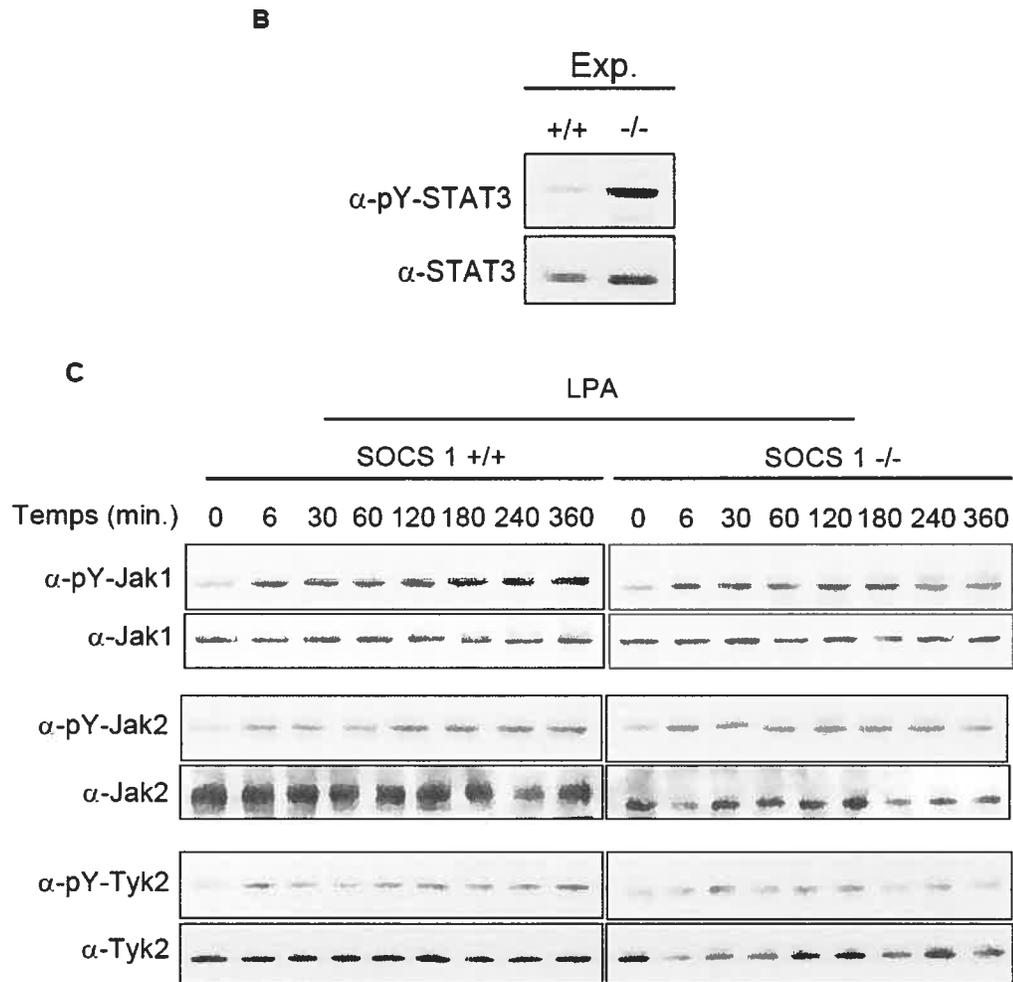


Figure 4.8. Des cellules MEFs *SOCS1*^{-/-} ont une activation de STAT3 prolongée en réponse aux agonistes de GPCRs. (A) Des cellules MEFs *SOCS1*^{+/+} et *-/-* arrêtées, ont été stimulées ou non (contrôle) avec de l'acide lysophosphatidique (LPA; 10μM) pour les temps indiqués. L'activation de STAT3 a été évaluée par immunobuvardage du lysat total de protéines avec des anticorps phospho-spécifiques pour la tyrosine (Tyr705) en C-terminal de STAT3 ainsi que la sérine (Ser727). L'expression des niveaux de STAT3 a été analysée par immunobuvardage avec un anticorps spécifique pour les deux isoformes de STAT3 (α et β). L'activation des MAP kinases Erk1/2 a été évaluée par immunobuvardage du lysat total de protéines avec un anticorps phospho-spécifique. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes. **(B)** Le lysat total de protéines de cellules MEFs *SOCS1*^{+/+} et *-/-* en croissance exponentielle, dans un milieu contenant 10% de sérum (CS), a été analysé par immunobuvardage avec un anticorps phospho-spécifique STAT3 Tyr705 et un anticorps total STAT3. **(C)** L'activation des Jaks a été évaluée par immunobuvardage du lysat total de protéines avec des anticorps phospho-spécifiques pour les résidus tyrosine de la boucle d'activation (pYpY). Les niveaux d'expression de Jak1, Jak2 et Tyk2 ont été analysés par immunobuvardage avec des anticorps spécifiques pour chacune des isoformes. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

Nous avons également observé que Jak1, Jak2 et Tyk2 sont activées en réponse au LPA dans les cellules MEFs *SOCS1*^{+/+} ainsi que dans les cellules MEFs *SOCS1*^{-/-} (Fig. 4.8 B). Il ne semble pas y avoir de différence de phosphorylation des Jaks, même à long terme, en réponse au LPA. Il est important de comprendre que, comme mentionné précédemment, la phosphorylation des Jaks n'est pas nécessairement représentative de leur activité. Dans ce cas-ci, l'activité des Jaks semble être soutenue puisque l'activation de STAT3 à long terme l'est également (Figure 4.8 A). Il est essentiel de noter la forte phosphorylation de STAT3 dans les cellules MEFs *SOCS1*^{-/-} en croissance exponentielle, comparativement aux cellules MEFs *SOCS1*^{+/+} (Figure 4.8 B).

De plus, nous avons observé que l'activation soutenue de STAT3 est complète, c'est-à-dire incluant la phosphorylation de sa sérine 727. En effet, la phosphorylation de la sérine 727 de STAT3 en réponse au LPA, dans des MEFs *SOCS1*^{+/+}, est forte et soutenue à partir de 6 minutes jusqu'à 120 minutes, où elle diminue graduellement. Par contre, dans les MEFs *SOCS1*^{-/-}, la phosphorylation en sérine de STAT3 est forte et soutenue de 6 minutes jusqu'à au moins 6 heures, tout comme pour sa phosphorylation en tyrosine (Figure 4.8 A). Finalement, nous n'avons pas observé de différence au niveau de l'activation des MAP kinases Erk1/2 en réponse au LPA entre ces deux lignées cellulaires (Figure 4.8 A).

Suite aux résultats décrits à la Figure 4.8, nous avons examiné l'impact du prolongement de l'activation de STAT3 sur la prolifération cellulaire en réponse au LPA, dans les cellules MEFs *SOCS1*^{-/-}. À cette fin, nous avons effectué, à l'aide d'un essai de MTT, une courbe de prolifération sur 5 jours des cellules MEFs *SOCS1*^{+/+} et *SOCS1*^{-/-} en réponse au LPA. Nous avons tout d'abord observé que, suivant la littérature, les cellules MEFs *SOCS1*^{-/-} sont effectivement transformées (Rottapel et al., 2002). En effet, la courbe contrôle est très prononcée, ce qui signifie que ces cellules prolifèrent sans sérum ou agent mitogénique. En raison de cet effet, nous ne pouvons utiliser ces cellules pour effectuer d'autres essais. En effet, il s'avère impossible d'analyser les résultats obtenus suite à la

stimulation de ces cellules avec un agoniste de GPCRs. Les cellules transformées ont un cycle cellulaire complètement dérèglé, et donc, l'effet de la stimulation par un agoniste de GPCRs n'influence pas le cycle de façon conventionnelle dans cette condition.

Par contre, nous avons observé qu'indépendamment de ce problème de transformation, à l'opposé de ce que nous attendions, une stimulation des MEFs *SOCS1*^{-/-} au LPA ralentie leur prolifération plutôt que de l'augmenter, malgré l'activation forte et soutenue de STAT3 (Figure 4.9).

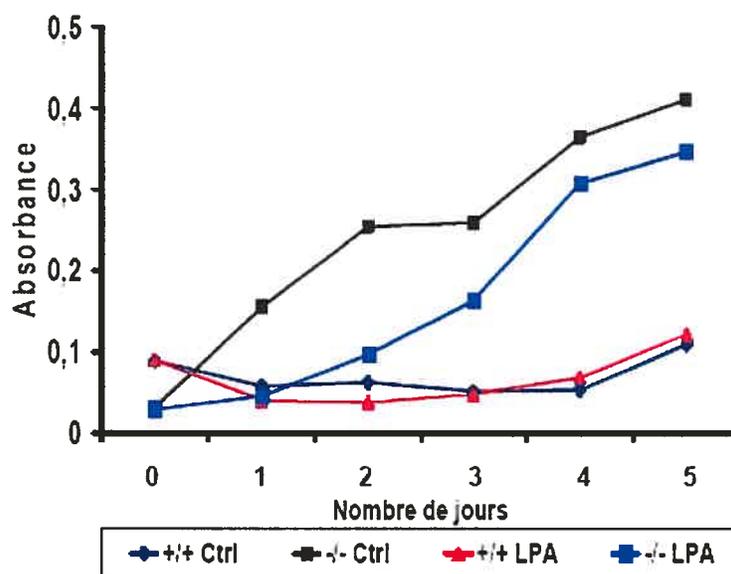


Figure 4.9. L'absence de SOCS1 dans les fibroblastes de souris favorise la prolifération cellulaire. Courbe de prolifération de cellules MEFs *SOCS1* +/+ ou -/- stimulées ou non (contrôle) au LPA (20µM). Les cellules ont été étalées dans une plaque 96 puits, puis stimulées pendant 5 jours. À chaque 24 heures (1 jour), les cellules d'une plaque ont été colorées au MTT, selon la technique décrite dans la section Matériels/Méthodes. Par la suite, l'absorbance a été mesurée. Chacune des données représente la moyenne d'un quadruplicata. Les résultats présentés sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

Il a été démontré qu'un problème majeur de ces cellules réside dans leur réponse aux IFNs. En effet, une stimulation aux IFNs induit une activation très forte et soutenue de STAT1, en plus d'augmenter son expression (Rottapel et al, 2002). Parce que STAT1 a été décrit comme un inhibiteur de la croissance et de la prolifération cellulaire (O'Shea et al.,

2002), nous avons émis l'hypothèse que son activation pourrait être la cause du retard de prolifération que nous avons observé dans les MEFs *SOCS1*^{-/-} en réponse aux LPA. Nous avons effectivement montré que, dans les MEFs *SOCS1*^{-/-}, le LPA induit une activation forte et soutenue de STAT1, contrairement aux cellules MEFs *SOCS1*^{+/+} (Figure 4.10 A).

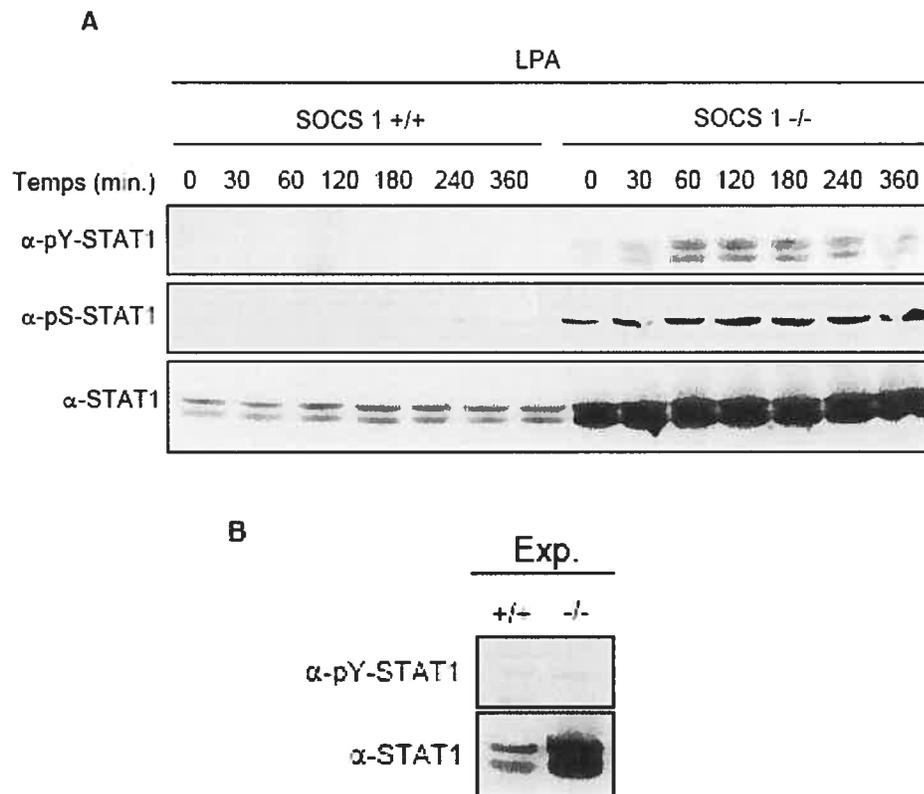


Figure 4.10. L'absence de SOCS1 dans les fibroblastes de souris favorise l'expression de STAT1 et son activation par le LPA (GPCR). (A) Des cellules MEFs *SOCS1* +/+ et -/- arrêtées, ont été stimulées ou non (contrôle) avec de l'acide lysophosphatidique (LPA; 10µM) pour les temps indiqués. L'activation de STAT1 a été évaluée par immunobuvardage du lysat total de protéines avec des anticorps phospho-spécifiques pour la tyrosine (Tyr701) en C-terminal de STAT1 ainsi que la sérine (Ser727). L'expression des niveaux de STAT1 a été analysé par immunobuvardage avec un anticorps spécifique pour les deux isoformes de STAT1 (α et β). Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes. (B) Le lysat total de protéines de cellules MEFs *SOCS1* +/+ et -/- en croissance exponentielle, dans un milieu contenant 10% de sérum (CS), a été analysé par immunobuvardage avec un anticorps phospho-spécifique STAT1 Tyr701 et un anticorps total STAT1.

Cette activation de STAT1 dans les MEFs *SOCS1*^{-/-}, tend à expliquer le retard de prolifération de ces cellules en réponse au LPA. Qui plus est, il est intéressant de mentionner que les MEFs *SOCS1*^{+/+} et *SOCS1*^{-/-} n'activent pas STAT1 en croissance exponentielle dans du milieu contenant 10% de sérum (Figure 4.10 B).

N'ayant pas obtenu de réponse à la thrombine dans les MEFs (données non-présentées), et soucieux de valider notre modèle d'activation de STAT3 par les GPCRs, nous avons décidé d'évaluer l'effet des Wnts, une autre famille d'agonistes de GPCRs. Dans un premier temps, nous avons regardé si les Wnts pouvaient activer la voie Jak/STAT dans les cellules Rat1. À cette fin, nous avons préparé du milieu conditionné de Wnt5A et de Wnt3A à partir de deux types cellulaires sécrétant respectivement ces deux protéines de manière constitutive. Nous avons également préparé du milieu conditionné à partir des cellules de type sauvage; ne sécrétant pas de façon constitutive ces protéines. Par la suite, nous avons stimulé à différents temps des cellules Rat1 avec du milieu conditionné Wnt5A (HC-11-Wnt5A) et Wnt3A (L-Wnt3A), ainsi qu'avec le milieu conditionné de leur cellule contrôle respective (HC-11 et L).

Nous avons observé qu'une stimulation des cellules Rat1, avec le milieu conditionné Wnt5A, ne semble pas avoir d'effet sur l'activation de STAT3 en comparaison avec le milieu contrôle (Figure 4.11 A). En effet, nous avons observé le même niveau de phosphorylation de la tyrosine 705 de STAT3 en réponse aux deux milieux conditionnés, ce qui indique également que notre milieu conditionné contient un agoniste activant STAT3. Par contre, nous avons observé un changement significatif de la cinétique d'activation de STAT3 entre les cellules Rat1 stimulées avec le milieu conditionné Wnt3A et celles stimulées avec le milieu conditionné contrôle (Figure 4.11 B). En observant attentivement la Figure 4.11 B, nous remarquons que la stimulation des Rat1 avec le milieu conditionné contrôle L induit une cinétique de phosphorylation de STAT3 semblable à celle induite par le LIF (Figure 4.1B), qui est représentative des cytokines; très forte à 5 minutes puis qui s'estompe graduellement avec le temps.

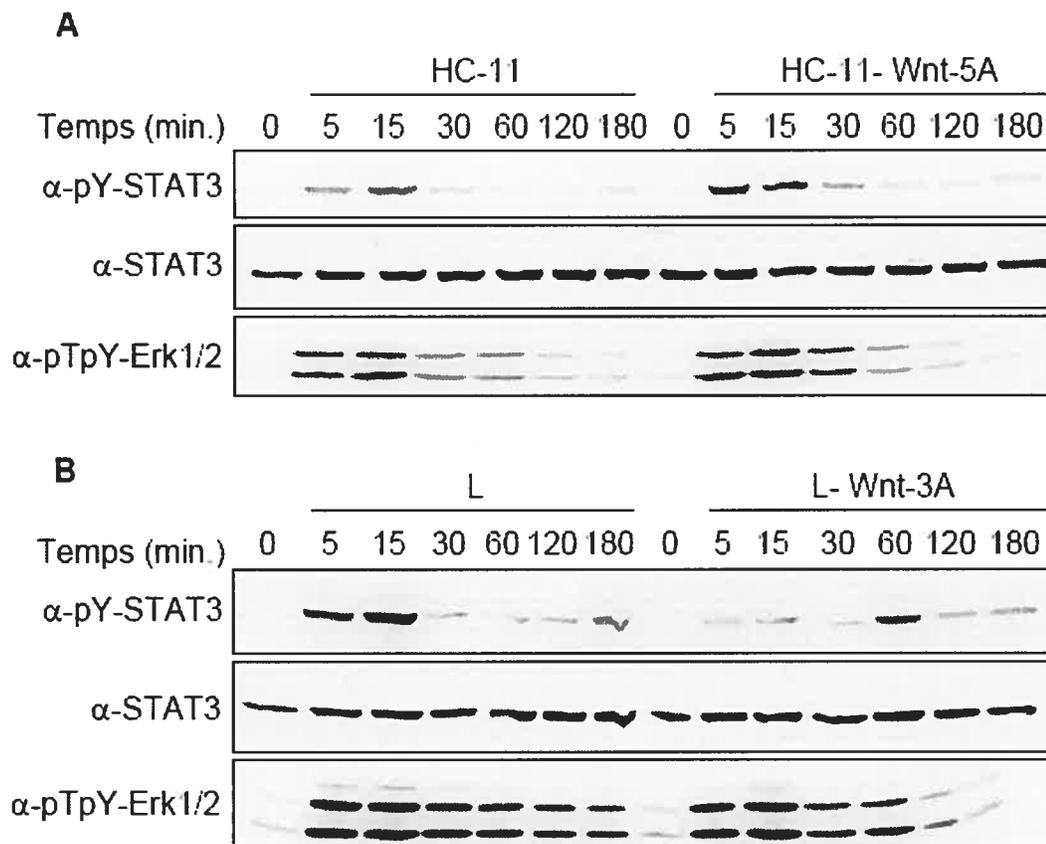


Figure 4.11. Un milieu conditionné Wnt-3A semble affecter l'activation de STAT3 dans les fibroblastes de rat. Des cellules Rat1 arrêtées, ont été stimulées ou non (contrôle) avec du milieu conditionné Wnt5A (A) ou Wnt3A (B) ainsi qu'avec le milieu conditionné produit à partir de leur cellule contrôle respective pour les temps indiqués. La production du milieu conditionné a été détaillée dans la section Matériel et Méthodes. L'activation de STAT3 a été évaluée par immunobuvardage du lysat total de protéines avec un anticorps phospho-spécifique pour la tyrosine (Tyr705) en C-terminal de STAT3. Le niveau d'expression de STAT3 a été analysée par immunobuvardage avec un anticorps spécifique pour les deux isoformes de STAT3 (α et β). L'activation des MAP kinases Erk1/2 a été évaluée par immunobuvardage du lysat total de protéines avec un anticorps phospho-spécifique. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

Par contre, la cinétique induite par le milieu conditionné Wnt3A est une cinétique de phosphorylation biphasique de STAT3, qui est faible et transitoire entre 5 et 15 minutes avec un retour au niveau basal à 30 minutes, puis une seconde phase d'activation tardive à 60 minutes. Cette cinétique d'activation de STAT3 est caractéristique de son activation par les GPCRs. Encore une fois, l'activation des MAP kinases Erk1/2 servait de contrôle positif. La cinétique d'activation de cette voie de signalisation a été la même en réponse à

tous les milieux conditionnés (contrôle ou contenant des Wnt). Ces résultats sont les premiers, à notre connaissance, à suggérer que Wnt3A active, ou à tout le moins influence, l'activation de STAT3 dans les cellules Rat1. Par contre, puisque le milieu contrôle active fortement STAT3, nous avons conclu que nous ne pouvions utiliser ces milieux conditionnés pour notre étude. Il serait essentiel d'obtenir du Wnt3A purifié pour étudier davantage ce phénomène. Pour cette raison, nous n'avons pu effectuer cette expérience avec les MEFs.

4.7 L'expression de shRNAs, par des vecteurs rétroviraux, permet de diminuer l'expression de Jak2 et de STAT3 dans les fibroblastes de souris

Afin de pouvoir étudier le rôle spécifique des protéines de la voie Jak/STAT en réponse aux GPCRs, nous avons produit des vecteurs rétroviraux encodant des shRNAs spécifiques pour les séquences de rats et de souris des différentes protéines de la voie Jak/STAT, soit Jak1, Jak2, Tyk2, STAT3, ainsi que gp130.

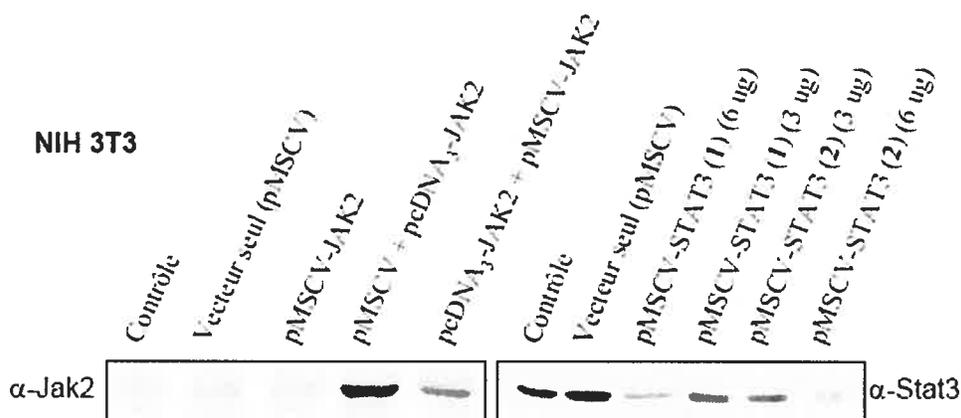
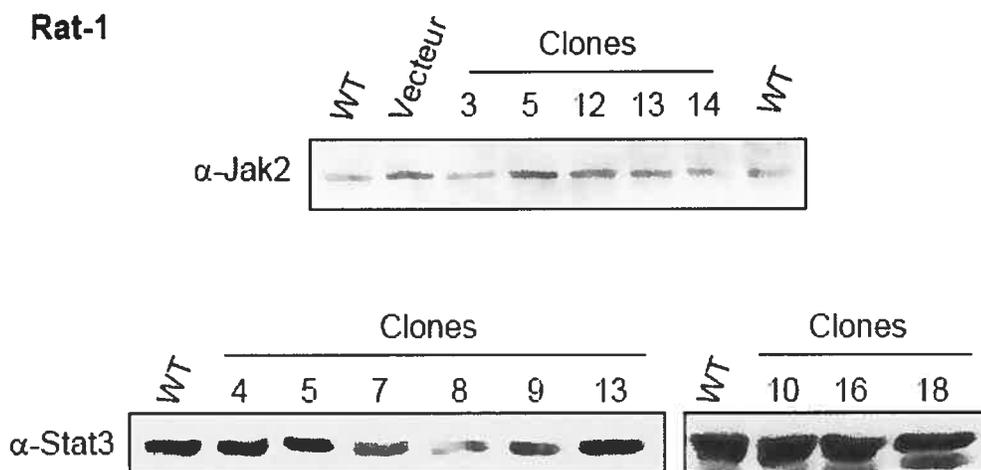


Figure 4.12. L'expression de shRNAs, par des vecteurs rétroviraux, permet de diminuer l'expression de JAK2 et de STAT3 dans les fibroblastes de souris. Des fibroblastes de souris NIH 3T3 *flatt* ont été transfectés avec pMSCV, pMSCV-Jak2 encodant un shRNA contre JAK2 et/ou pcDNA3-JAK2. Des cellules NIH 3T3 wt ont été transfectées avec pMSCV ou pMSCV-STAT3 encodant un shRNA contre STAT3. Les niveaux d'expression de JAK2 et STAT3 ont été analysés par immunobuvardage du lysat total de protéines avec un anticorps spécifique contre Jak2 ou STAT3. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

Après transfection de ces constructions dans des fibroblastes de souris NIH 3T3, nous avons observé une diminution de l'expression des protéines Jak2 et STAT3, démontrant l'efficacité de la séquence choisie pour diminuer l'expression de ces protéines (Figure 4.12). Par contre, nous n'avons pas été en mesure d'observer une diminution de l'expression de Jak1, Tyk2 et gp130 par l'utilisation de leur vecteur de shRNAs respectif (données non-présentées).

Par la suite, nous avons tenté de produire des clones stables de cellules Rat1 exprimant des shRNAs contre Jak2 et STAT3. Nous n'avons pas été en mesure d'obtenir de clones dont l'expression de Jak2 ou STAT3 était diminuée de façon significative dans ces cellules (Figure 4.13 A). Par contre, nous avons pu obtenir des clones diminuant fortement l'expression de Jak2 et de STAT3 dans des fibroblastes de souris NIH 3T3, soit le clone 11 pour Jak2 et les clones 17, 21 et 25 pour STAT3 (Figure 4.13 B).

A



B

NIH 3T3 WT



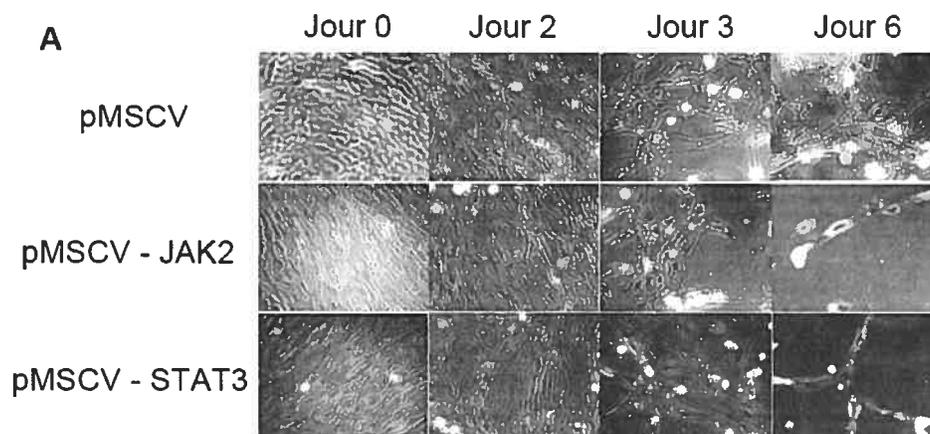
Figure 4.13. L'expression de JAK2 et STAT3 de clones stables de fibroblastes de rat ou de souris exprimant des shRNAs contre ces protéines. Des cellules Rat1 (A) ou NIH 3T3 (B) ont été infectées, selon le protocole établi dans la section Matériel et Méthodes, avec des virus encodant des constructions exprimant des shRNAs contre Jak2 (pMSCV-JAK2) ou STAT3 (pMSCV-STAT3). Après sélection à la puromycine, des clones ont été isolés par « dilution limite ». Les niveaux d'expression de Jak2 et STAT3 ont été analysés par immunobuvardage du lysat total de protéines avec un anticorps spécifique pour Jak2 ou STAT3.

4.8 Jak2 et STAT3 semblent être impliqués dans la survie cellulaire de fibroblastes de rat

Par la suite, nous avons davantage examiné la réaction des cellules Rat1 à cette approche de shRNAs dans le but de trouver une solution à son inefficacité. Nous avons observé que la survie des cellules Rat1 exprimant des shRNAs contre Jak2 et STAT3 semblait être affectée par une sélection à la puromycine (Figure 4.14 A). En effet, nous avons observé qu'après 3 jours de sélection à la puromycine, les cellules contrôle ayant été infectées uniquement avec le vecteur rétroviral vide recommençaient à proliférer, ou à tout le moins cessaient de mourir (apoptose). Par contre, les cellules exprimant des shRNAs contre Jak2 ou STAT3 continuaient de mourir après 3 jours dans la puromycine; le temps de sélection normal. Également, nous avons observé que si la sélection à la puromycine

continuait durant plusieurs autres jours, quelques cellules recommençaient à proliférer mais s'avéraient n'être que des clones négatifs (n'exprimant pas de shRNAs ou très peu, puisqu'il n'y avait aucune diminution des protéines cibles dans le lysat total de protéines) (données non-présentées). Malgré un ajustement de la concentration de puromycine ou du nombre de jours de sélection, il nous a été impossible d'obtenir une diminution suffisante de l'expression des protéines cibles, ce qui nous aurait permis de poursuivre l'étude en utilisant cette approche (données non-présentées).

Dans le but de contourner ce problème de sélection, nous avons utilisé des siRNAs synthétiques afin de diminuer l'expression de Jak2 et de STAT3 dans les Rat1. Comme le démontre la Figure 4.14 B, la transfection de siRNAs contre Jak2 ou STAT3 permet de diminuer considérablement leur expression dans les Rat1; le pic de diminution étant à 24 heures. Après 24 heures, l'expression des protéines diminuées augmente tranquillement pour retourner à la normale en 24-36 heures (données non-présentées pour STAT3). Il est intéressant de remarquer, qu'encore une fois, la transfection du siRNA de STAT3 dans les Rat1 semble affecter leur survie, ou du moins leur prolifération, comme démontré par microscopie à contraste de phase à la Figure 4.14 B. Il est essentiel de mentionner que le siRNA contre STAT3 n'est pas d'une efficacité optimale; cette expérience n'étant pas facilement reproductible.



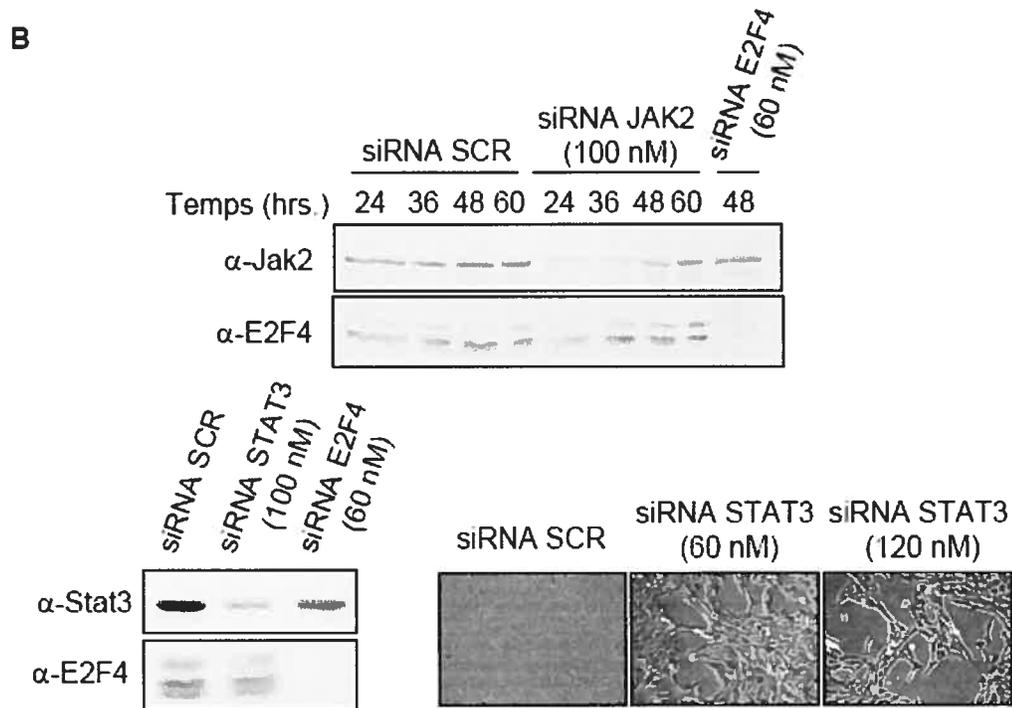


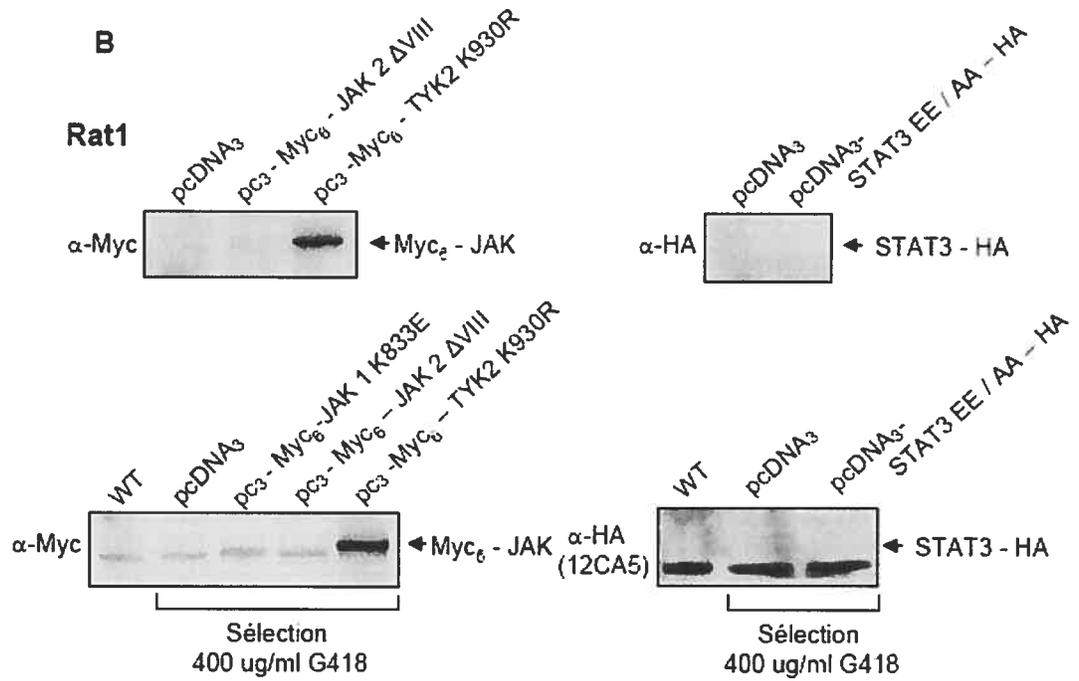
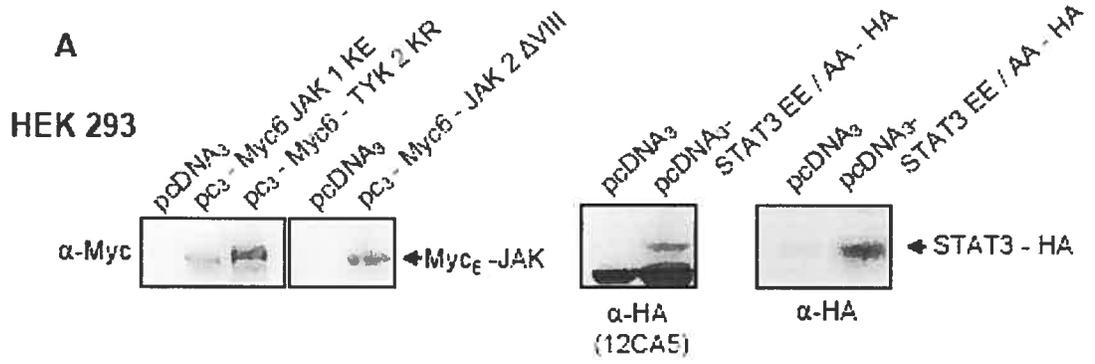
Figure 4.14. La survie cellulaire de fibroblastes de rat semble être affectée par l'expression de siRNAs et de shRNAs contre Jak2 et STAT3. (A) Des cellules Rat1 ont été infectées avec des vecteurs rétroviraux contrôle (pMSCV) ou encodant des shRNAs contre Jak2 ou STAT3. Par la suite, les cellules ont été sélectionnées à la puromycine pour le nombre de jours indiqués. Suite à la sélection, une photo des différentes lignées a été prise au microscope à contraste de phase. (B) Des cellules Rat1 ont été transfectées avec des siRNAs contrôle (SCR; *scramble*), contre Jak2 ou contre STAT3. Après les temps indiqués pour Jak2, ou 24 heures pour STAT3, l'expression de Jak2 ou STAT3 de ces cellules a été analysée. La confluence des cellules transfectées avec un siRNA contre STAT3 a été observée au microscope à contraste de phase, 24 heures après la transfection. Le siRNA contre E2F4 a servi de contrôlé positif.

Finalement, des constructions encodant une forme inactive de Jak1, Jak2, Tyk2 ou STAT3 ont été générées. La production de ces constructions avait comme objectif d'étudier le rôle biologique de ces kinases et de ce facteur de transcription. Plus spécifiquement, ces formes n'ont plus d'activité catalytique et agissent comme formes dominantes-négatives. Elles permettent donc d'étudier l'impact de la perte de leur activité catalytique sur leur rôle biologique, en rapport avec leur rôle d'adaptateur suggéré dans la littérature. Tout d'abord,

toutes les formes inactives de chacune des protéines ont été sous-clonées dans un vecteur modifié contenant l'étiquette Myc₆ en N-terminal du site de multi-clonage (mis à part STAT3 EE/AA -HA qui a été sous-cloné dans un vecteur vide). Il a été observé que toutes ces constructions se sont exprimées dans la lignée cellulaire HEK 293 (Figure 4.15 A). Par contre, dans les Rat1, seulement les formes dominantes-négatives de Jak1 et Tyk2 ont pu être exprimées (Figure 4.15 B). Il a aussi été observé que les cellules exprimant les formes dominantes-négatives ne pouvaient passer la sélection à la néomycine, à l'exception de Tyk2 K930R. (Figure 4.15 B).

Pour tenter de contourner ce problème (possiblement de survie), nous avons généré des constructions rétrovirales répressibles de ces formes inactives. Nous espérons que la capacité de moduler l'expression de ces protéines nous permettrait de trouver une balance entre leur effet inhibiteur et leur effet « létal » au niveau des cellules Rat1. Les HEK 293 transfectées avec les constructions répressibles de Jak2 et Tyk2 ont permis de diminuer l'expression de ces protéines lorsque stimulées à la doxycycline (données non-présentées pour Tyk2) (Figure 4.15 C).

Par contre, il nous a été impossible de voir l'expression de STAT3-EE/AA dans les HEK 293, mettant en doute la qualité de cette construction. De plus, lorsque transfectées transitoirement dans les Rat1, il a été impossible de voir la construction encodant la forme inactive de Jak2, bien que celle de Tyk2 était exprimée fortement (Figure 4.15 C). Également, il a été possible de réguler l'expression de cette dernière par l'ajout de doxycycline. Nous prévoyons donc optimiser cette approche par la génération de constructions inductibles plutôt que répressibles. Ainsi, il sera possiblement plus facile de moduler l'expression de ces formes dominantes-négatives.



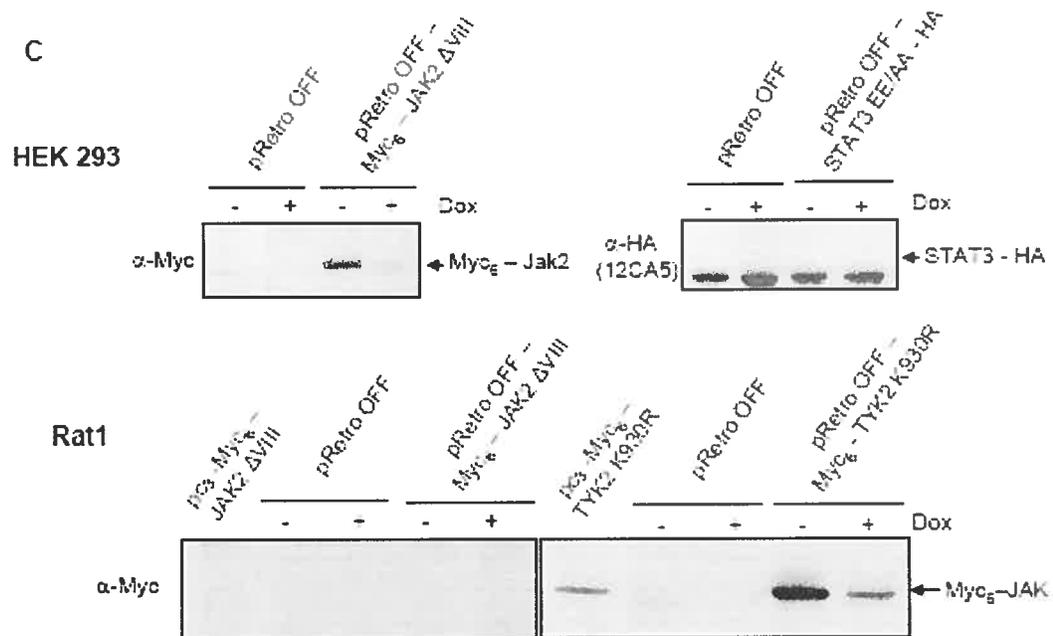


Figure 4.15. Production de constructions rétrovirales répressibles des formes dominantes-négatives des Jaks et de STAT3. (A) Des constructions de formes inactives des Jaks étiquetées Myc₆, la construction de forme inactive de STAT3 étiquetée HA et le vecteur contrôle, ont été transfectées transitoirement dans des cellules HEK 293. (B) Les constructions de formes inactives étiquetée Myc₆ des Jaks, la forme inactive étiquetée HA de STAT3 ainsi que le vecteur contrôle, ont été transfectées dans les cellules Rat1, puis ces cellules ont été sélectionnées ou non à la néomycine durant 10 jours; jusqu'à la mort de toutes les cellules du contrôle non-transfecté. (C) Des cellules HEK293 et Rat1 ont été transfectées transitoirement avec des constructions rétrovirales répressibles des formes inactives des Jaks et de STAT3, ainsi que leur vecteur contrôle. 12 heures après la transfection, 1ug/ml de doxycycline (Dox) a été ajouté au milieu, puis le milieu avec de la doxycycline a été remplacé aux 24 heures. 72 heures après la transfection, les cellules ont été lysées et le lysat total de protéines récupéré. Les niveaux d'expression de Jak1, Jak2, Tyk2 et STAT3 ont été analysés par immunobuvardage du lysat total de protéines avec des anticorps spécifiques à l'étiquette HA (12CA5 ou HA) ou un anticorps spécifique à l'étiquette Myc. pc3 ; pcDNA3

5. DISCUSSION

L'activation de la voie de signalisation Jak/STAT, d'abord uniquement associée aux récepteurs de cytokines, est maintenant acceptée comme étant régulée par une multitude d'autres récepteurs, dont les GPCRs (Leonard et O'Shea, 1998; Pelletier et al., 2003b). Bien que les mécanismes moléculaires connus jusqu'à tout récemment indiquaient un processus commun entre les récepteurs, de nouvelles études ont suggéré l'existence d'une régulation différente de la voie Jak/STAT par les GPCRs (Pelletier et al., 2003b). Ravivant l'intérêt pour la régulation de cette voie par ces récepteurs, il est apparu évident que les rôles physiologiques de cette voie de signalisation dans la réponse aux GPCRs étaient très peu définis. Les études précédentes utilisèrent divers outils moléculaires ou pharmacologiques adaptés à l'époque, mais l'étant moins au tournant du siècle (Marrero et al., 1997; Madamanchi et al., 2001). De plus, les études effectuées jusqu'à présent n'ont principalement ciblé que certains membres de la voie Jak/STAT, laissant planer une interrogation certaine quant aux rôles des autres. Il nous semblait clair qu'une étude avec de nouvelles approches innovatrices s'imposait d'elle-même et qu'elle devait cibler l'ensemble des membres de cette voie qui sont activés en réponse aux GPCRs. Il ressort de la présente étude que la voie Jak/STAT, en plus d'être activée par de nouvelles familles d'agonistes de GPCRs, est directement impliquée dans la régulation de la prolifération cellulaire en réponse aux GPCRs. Les travaux présentés dans ce mémoire ont également permis de démontrer, de façon convaincante, l'implication du facteur de transcription NF-kappaB et de SOCS1 dans la régulation de la voie Jak/STAT en réponse aux GPCRs. Finalement, ces travaux nous aurons permis d'entamer la mise au point de nouvelles approches spécifiques pour l'étude fonctionnelle des membres de la voie de signalisation Jak/STAT.

5.1 Activation de la voie de signalisation Jak/STAT en réponse aux GPCRs

Il a été documenté, au cours des dernières années, que la voie de signalisation Jak/STAT est activée en réponse à différents GPCRs (Mellado et al., 1998; Rodriguez-Frade et al., 1999; Ju et al., 2000; Lukashova et al., 2001; Wong et al., 2001; Pelletier et al., 2003b). D'une part, nos travaux ont permis de démontrer que d'autres membres des GPCRs, dont une nouvelle famille, ont aussi cette capacité. Effectivement, le LPA, un phospholipide constituant majoritaire du sérum, s'avère être un activateur puissant de la voie Jak/STAT dans au moins trois lignées cellulaires différentes, soit les VSMCs, les fibroblastes de rat (Rat1) et les fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs) (Figure 4.1; Figure 4.8). Son action induit une activation biphasique de STAT3, de façon similaire à la thrombine. La phase précoce d'activation est moins importante dans les fibroblastes de rat (Rat1) que dans les VSMCs, malgré une activation précoce et soutenue des Jaks (Figure 4.1). De plus, Wnt3A, un membre de la famille des Wnts, active aussi la voie Jak/STAT de façon homologue aux autres agonistes de GPCRs présentés précédemment. L'impact de cette découverte sera discuté plus loin. Nous pouvons donc conclure que le modèle d'activation de la voie Jak/STAT en réponse aux GPCRs, élaboré dans notre laboratoire, s'étend également à d'autres GPCRs et à d'autres lignées cellulaires que ceux et celles décrites précédemment (Ju et al., 2000; Pelletier et al., 2003b). Brièvement, en réponse aux GPCRs, l'activation de Jak1, Jak2 et Tyk2 est rapide et soutenue, résultant en une activation rapide et transitoire de STAT3, puis après un retour au niveau basal, est suivie d'une activation tardive forte et soutenue jusqu'à au moins 3 heures (Figure 4.1).

Bien que très peu comprise et caractérisée, plusieurs groupes de recherche ont proposé que la transition biphasique de la phosphorylation en tyrosine de STAT3 serait due à la phosphorylation de sa sérine 727. Effectivement, il a été observé que la déphosphorylation de la tyrosine 705 de STAT3 corrèle avec le pic de phosphorylation de sa sérine 727 (Chung et al., 1997b; Pelletier et al., 2003b; Figure 4.1). Il a été suggéré que cette phosphorylation en sérine influencerait la phosphorylation en tyrosine de STAT3, ainsi que son activité transcriptionnelle, selon le compartiment cellulaire où elle serait

effectuée (Chung et al., 1997b; Pelletier et al., 2003a; Pelletier et al., 2003b). Par contre, il reste encore beaucoup à faire afin de comprendre ce phénomène. Avec la génération de souris « *knockin* » du gène de STAT3 par un gène encodant une forme de STAT3 dont la sérine 727 est mutée en alanine (STAT3 S727A), il serait très intéressant et aisément réalisable d'observer si l'activation de STAT3 en réponse aux GPCRs est réellement régulée par la phosphorylation de sa sérine 727 (Shen Y et al., 2004).

5.1.1 Activation tardive de la voie Jak/STAT3 par les GPCRs :

NF-kappaB, un nouveau joueur

Afin de mieux comprendre le rôle de la voie de signalisation Jak/STAT en réponse aux GPCRs, il est essentiel de pousser plus loin les bases moléculaires de l'activation de cette voie et de comprendre davantage comment s'effectue son activation tardive. Il serait d'autant plus important de mettre en perspective le mécanisme de cette activation et les joueurs impliqués, en fonction du rôle de cette voie dans la réponse mitogénique des GPCRs. Les données recueillies à ce jour ont permis d'établir un modèle approximatif d'activation tardive de la voie Jak/STAT, sans toutefois le mettre en perspective avec le rôle biologique de cette voie.

Dans la présente étude, l'emphase a davantage été mise sur l'activation à long terme de la voie Jak/STAT. Suivant une étude effectuée dans notre laboratoire, nous avons avancé une hypothèse voulant que la deuxième phase d'activation de STAT3 nécessiterait la synthèse d'un ou de plusieurs facteurs autocrine, tel que l'IL-6 et/ou un membre de sa famille de cytokines (Sano et al., 2000; Pelletier et al., 2003a; Pelletier et al., 2003b). Nous avons proposé que ce facteur autocrine serait l'IL-6, puisqu'un anticorps neutralisant contre cette cytokine inhibe l'activation tardive de STAT3 en réponse à la thrombine dans les cellules humaines HeLa (Pelletier et al., 2003b). Par contre, nous n'avons pu démontrer ce phénomène dans les VSMCs en raison de la spécificité de cet anticorps neutralisant pour la forme humaine de l'IL-6.

D'autre part, il est clairement établi que le facteur de transcription NF-kappaB est responsable de la production de plusieurs cytokines et chemokines en réponse à différents GPCRs, dont la thrombine et le LPA (Ye, 2001; Fang et al., 2004; Scholz et al., 2004). Ces cytokines, produites via l'activité de NF-kappaB, sont reconnues pour leur capacité à induire la prolifération cellulaire ainsi que la migration cellulaire, ciblant directement les bases mêmes de notre projet. De ce fait, nous avons voulu évaluer l'implication du facteur de transcription NF-kappaB au niveau de l'activation tardive de STAT3 en réponse aux GPCRs. Le principe de base de l'activation de ce facteur de transcription est sa translocation nucléaire. Pour permettre sa translocation nucléaire, NF-kappaB doit se séparer de la protéine adaptatrice qui le retient au cytoplasme, Ikb α . Pour ce faire, Ikb α doit être phosphorylé sur deux résidus sérine spécifiques, ce qui conduit à sa dégradation. Il a précédemment été démontré que la surexpression d'une forme non-dégradable d'Ikb α permettait d'inhiber l'activité de NF-kappaB, le séquestrant ainsi au noyau (Kwon H et al., 1998; Données non-présentées). Effectivement, ce mutant possède deux caractéristiques distinctes empêchant sa dégradation. Premièrement, la mutation en alanine de ses deux résidus sérine phosphorylables, et deuxièmement, une délétion de sa région C-terminale essentielle à sa dégradation. Utilisant des VSMCs surexprimant ce mutant, nommé Ikb α -2N Δ 4, nous avons démontré que l'inactivation de NF-kappaB inhibe l'activation tardive de STAT3 spécifiquement en réponse aux GPCRs (Figure 4.2). Il est impossible de tirer une conclusion définitive quant à l'explication de ce phénomène, mais suivant les découvertes effectuées récemment, il s'avère que la synthèse du facteur autocrine pourrait transiger via NF-kappaB.

Effectivement, il avait précédemment été proposé par le groupe du Dr Nancy Reich (Faruqi et al., 2001), que l'expression d'une forme active de Rac dans les cellules HeLa pouvait induire l'activation de STAT3 via la production d'IL-6 par NF-kappaB. De plus, notre laboratoire a démontré que Rac est essentiel à l'activation de STAT3 par les GPCRs, à court et long terme (Pelletier et al., 2003b). Mettant les travaux du Dr Reich en perspective de notre modèle d'activation de la voie Jak/STAT par les GPCRs, nous avons

démontré que NF-kappaB était essentiel au niveau de la phosphorylation du résidu tyrosine 705 de STAT3. Il est innovateur d'avoir démontré qu'une seconde régulation croisée est nécessaire afin d'activer la voie Jak/STAT en réponse aux GPCRs; la première étant la voie des MAP kinases au niveau de la phosphorylation du résidu sérine 727 de STAT3. Il n'avait jamais été proposé qu'une régulation positive croisée entre ces deux facteurs de transcription serait nécessaire à la phosphorylation de la Tyr705 de STAT3 à long terme.

Pour faire suite, il serait intéressant d'identifier le ou les facteurs impliqués dans l'activation tardive de STAT3. La lignée VSMC-IkBa-2NΔ4 est un outil inestimable dans le développement de ce projet. En effet, par l'utilisation de cette lignée, combinée avec les nouvelles approches développées dans ce projet (les formes dominantes-négatives répressibles ainsi que les vecteurs de shRNAs, discutés plus loin), il sera éventuellement possible de déterminer qu'elle est l'implication de chacun de ces facteurs de transcription (STAT3 et NF-kappaB) dans la production de ce ou ces facteurs autocrines, ainsi que de leur récepteur.

Il a précédemment été démontré que l'AngII et la thrombine induisent l'augmentation de l'ARNm de diverses cytokines, ainsi que de leur récepteur spécifique (IL-6Rα) (Faruqi et al., 2001; Pelletier et al., 2003a). Ceci pourrait être un autre mécanisme de régulation croisée positive entre ces deux voies. Effectivement, parce que les VSMCs et les HeLa ne répondent pas à une stimulation à l'IL-6, il est clair que si ce facteur est impliqué dans l'activation tardive de STAT3, son récepteur (IL-6Rα) devra également être exprimé (Faruqi et al., 2001; Pelletier et al., 2003a; Pelletier et al., 2003b). Il est également intéressant de mentionner que cette régulation serait exclusivement spécifique aux facteurs nécessaires à cette deuxième phase d'activation; l'expression de la sous-unité gp130 des cytokines n'étant pas influencée en réponse aux GPCRs (Pelletier et al., 2003a). Par contre, nous ne savons pas si cette augmentation de l'ARNm est la résultante de l'activation de la voie Jak/STAT3 ou de NF-kappaB. Il n'est pas exclu que la première phase d'activation précoce de STAT3 par les GPCRs serve principalement à la synthèse de ce facteur

autocrine ou de son récepteur, et de ce fait, ne serait impliquée que dans la genèse d'une boucle d'amplification rétro-active de STAT3 en réponse aux GPCRs.

Il serait simple et rapide d'effectuer des expériences de *real-time* RT-PCR comparatif entre les VSMCs de type sauvage et celles surexprimant I κ B α -2N Δ 4 afin d'identifier les facteurs autocrines potentiellement impliqués dans cette activation tardive, en réponse aux GPCRs. Par la suite, utilisant un RNAi contre STAT3 dans les VSMCs, le même exercice pourrait déterminer si la perte d'expression de certains facteurs autocrines ou de leurs récepteurs, dans les VSMCs I κ B α -2N Δ 4, est réellement due à l'inactivation de NF-kappaB ou à celle de STAT3. Finalement, une approche de RNAi contre les facteurs autocrines et/ou leurs récepteurs spécifiques permettrait de déterminer précisément quel est le facteur autocrine impliqué dans l'activation tardive de STAT3, et même de définir le mécanisme moléculaire de cette activation. Finalement, il est intéressant de mentionner que, plus récemment, certaines études ont suggéré que les voies Jak/STAT et NF-kappaB pouvait se trans-inhiber. Effectivement, il a été démontré que SOCS3 est induit par NF-kappaB/IKK, suggérant que l'activation de NF-kappaB par IKK peut induire des effets négatifs coordonnés sur la voie de signalisation Jak/STAT (Li et al., 2002). De plus, il a été démontré que PIAS3, auparavant considéré comme un inhibiteur spécifique de STAT3, interagit directement avec la sous-unité p65/RelA de NF-kappaB et inhibe son activité transcriptionnelle (Jang et al., 2004). Il a d'ailleurs été proposé que la voie des MAP kinases, en plus d'effectuer une régulation croisée positive avec la voie Jak/STAT en réponse aux GPCRs (phosphorylation de la sérine 727), aurait la possibilité d'effectuer une régulation croisée négative en induisant l'expression de SOCS3 en réponse au PMA (Terstegen et al., 2000). Par contre, ces observations n'ont pas encore été extrapolées au niveau de l'activation de la voie Jak/STAT par les GPCRs.

Au niveau biologique, il est intéressant de noter que l'inhibition de la voie de signalisation de NF-kappaB affecte la survie, la prolifération et la migration cellulaire en réponse aux GPCRs (Maruyama et al., 1997; Schwarz et al., 2001; Montaner et al., 2001; Zahradka et al., 2002; Helbig et al., 2003). Considérant les études effectuées sur le rôle de

la voie Jak/STAT et ce que nous avons démontré quant à l'implication de NF-kappaB sur son activation à long terme, se pourrait-il que les effets biologiques découlant de l'inhibition de NF-kappaB soient en partie une répercussion de l'inhibition de la voie de signalisation JAK/STAT?

Nous pouvons conclure que le facteur de transcription NF-kappaB est essentiel à l'activation tardive de STAT3 en réponse aux GPCRs, et ce, possiblement en produisant un facteur autocrine et/ou son récepteur. L'identification de ce ou ces facteurs autocrines nous permettrait également d'obtenir quelques indices quant aux rôles biologiques de la voie de signalisation Jak/STAT3 en réponse aux GPCRs, sachant que le rôle biologique de la voie Jak/STAT est bien caractérisé en réponse aux cytokines.

5.1.2 Les Wnts : la famille s'aggrandit

Les Wnts sont une famille de glycoprotéines sécrétées, qualifiées de proto-oncogènes, et dont les membres sont impliqués dans la différenciation, l'organogénèse, la migration et la croissance cellulaire (Wodarz and Nusse, 1998; Miller, 2002). Suite à leur liaison à un récepteur encodé par les gènes *Frizzled* (Bhanot et al., 1996), les Wnts activent la protéine cytoplasmique *Disheveled* (Dsh), menant à l'inhibition de la GSK3 β (glycogen synthase kinase 3bêta) (Lee et al., 1999b). L'inhibition de la GSK3 β empêche la β -caténine d'être dégradée par un complexe protéique comprenant la GSK3 β , l'axine et l'APC (*Adenomatous Polyposis Coli*) (Akiyama, 2000). Suivant une stimulation aux Wnts, la β -caténine s'accumule au cytoplasme et transloque au noyau où elle coopère avec les facteurs de transcription Tcf/LEF afin d'activer plusieurs gènes, dont c-Myc et cycline D1, induisant ainsi la progression du cycle cellulaire (He et al., 1998; Tetsu et McCormick, 1999). La régulation aberrante de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine est une cause importante de différentes formes de cancers, dont celui du colon (Logan et Nusse, 2004). De plus, l'existence d'un « *cross-talk* » entre la voie Wnt/ β -caténine et la voie des MAPKs, dans la régulation de la prolifération cellulaire, est maintenant reconnue. Entre autre, il a été

rapporté que Wnt3A, un membre de la famille des Wnts, active la voie des MAPKs Erk1/2 dans les fibroblastes (Yun MS et al., 2005).

De plus, Wnt3A est impliqué dans le développement et l'organisation du cytosquelette (Shibamoto et al., 1998; Galceran et al., 1999) Il est très intéressant de mentionner que récemment, plusieurs études ont suggéré l'implication de Wnt3A dans la prolifération de plusieurs lignées cellulaires, sans pour autant en caractériser le mécanisme (Yun MS et al., 2005). Il a aussi été démontré que PIASy réprimait l'activité de LEF1, un facteur de transcription activé par Wnt3A (Sachdev et al., 2001; Filali et al., 2002).

Bien que les milieux conditionnés de Wnts que nous avons utilisé dans cette étude ne nous permettent pas de conduire plus loin notre étude de la régulation de la voie Jak/STAT en réponse aux Wnts, ces premiers résultats suggèrent que la voie Jak/STAT pourrait être régulée par Wnt3A (Figure 4.11). Afin de vérifier cette hypothèse de façon convaincante, il serait nécessaire de recommencer cette expérience avec des réactifs Wnt3A et Wnt5A purifiés. De plus, il serait nécessaire d'examiner si l'activation des autres membres des STATs qui sont impliqués dans la régulation de la prolifération cellulaire, tel que STAT1 et STAT5, est influencée par les Wnts. Si cette hypothèse s'avérait vraie, elle ouvrirait une nouvelle porte dans l'étude de la signalisation des Wnts et de ses implications physiologiques. De plus, il nous serait possible d'utiliser les Wnts comme agonistes de GPCRs dans l'étude du rôle de la voie Jak/STAT dans la réponse mitogénique de ces récepteurs.

Finalement, il est intéressant de mentionner que Wnt5A a la capacité de contre-balancer la signalisation des autres Wnts, et apparaît donc comme un suppresseur de tumeurs. Les souris *Wnt5A*^{-/-} développent des tumeurs lymphoïdes malignes (Liang et al., 2003). De ce fait, il a été suggéré que Wnt5A pourrait antagoniser l'activation de la voie Wnt3A. Il serait aussi intéressant d'observer si un pré-traitement des cellules Rat1 au Wnt5A inhibe l'activation subséquente de la voie Jak/STAT en réponse au Wnt3A, ou du moins, stimulerait l'activation de membres différents (STAT1 vs STAT3, par exemple).

5.2 Les SOCS dans la régulation des GPCRs

Une autre observation importante de cette étude est la reconnaissance de l'implication de SOCS1 dans la régulation de l'activation de la voie Jak/STAT par les GPCRs. Une surexpression de SOCS1 dans les fibroblastes de rat inhibe complètement l'activation de la voie Jak/STAT en réponse aux GPCRs, et de ce fait, inhibe partiellement la prolifération de ces cellules en réponse à ces récepteurs. De façon complémentaire, l'inactivation du gène de SOCS1, dans des fibroblastes embryonnaires de souris, cause une activation de STAT3 et STAT1 d'une plus forte amplitude en réponse aux GPCRs. Il est maintenant clair que la voie de signalisation Jak/STAT est impliquée dans la réponse mitogénique des GPCRs et que SOCS1 régule, au moins en partie, l'activation tardive de la voie Jak/STAT en réponse aux GPCRs.

5.2.1 Surexpression de SOCS1 et inhibition de la réponse mitogénique des GPCRs

Afin d'évaluer l'implication de la voie Jak/STAT dans la réponse mitogénique des GPCRs, une première approche générale a été utilisée dans cette étude. Il s'agit de la surexpression d'un régulateur négatif « naturel » de la voie Jak/STAT, soit SOCS1. La famille des SOCS est principalement étudiée dans la réponse aux cytokines de la voie Jak/STAT. De plus, les études de la régulation des SOCS en réponse aux GPCRs sont très peu nombreuses et la plupart demeurent incomplètes.

Nous avons tout d'abord observé que la surexpression de SOCS1, contrairement à celle de SOCS3, résulte en l'inhibition de l'activation de la voie Jak/STAT en réponse aux cytokines et aux GPCRs. Par contre, il a été démontré par d'autres groupes que la surexpression de SOCS3 est suffisante afin d'inhiber la voie Jak/STAT en réponse à certaines cytokines (Zong et al., 2000). Nous expliquons nos résultats par le fait que la surexpression de SOCS1 est beaucoup plus forte que celle de SOCS3 dans nos essais, ce

qui pourrait possiblement occasionner une différence d'efficacité inhibitrice. Il a effectivement été démontré que SOCS3 inhibe l'activité de Jak2, mais de façon beaucoup moins efficace que SOCS1, et qu'il la lie avec une plus faible affinité. De plus, le mode d'action classique de SOCS3 diffère de celui de SOCS1. SOCS3 se lie aux récepteurs des cytokines, tout près du site de liaison des Jaks, et inhibe leur activité grâce à son domaine KIR (Suzuki et al., 1998; Nicholson et al., 1999; Pezet et al., 1999). Le mode d'action de SOCS1 est de lier directement les Jaks afin d'inhiber leur activité. Il est donc possible qu'une surexpression très forte, voire plus forte que celle obtenue pour SOCS1, soit nécessaire afin d'obtenir une efficacité d'action inhibitrice de SOCS3 similaire à celle de SOCS1. De plus, puisque notre approche était ciblée pour inhiber l'activation de la voie Jak/STAT en réponse aux GPCRs, il se peut que SOCS3 ne lie pas les GPCRs avec une aussi bonne affinité que les récepteurs de cytokines, ou que tout simplement, son mode d'action diffère pour les GPCRs de celui emprunté par les cytokines. Par contre, certaines études récentes tendent à démontrer que SOCS3 peut également lier les GPCRs, plus précisément les récepteurs de chemokines, et exercer son action inhibitrice sur les Jaks (Soriano et al., 2002).

La génération de lignée clonale stable surexprimant SOCS1 nous a permis d'obtenir une lignée cellulaire dont l'activation de STAT3 est complètement inhibée en réponse aux GPCRs. En utilisant cette approche, nous avons démontré que la prolifération des fibroblastes de rat (Rat1) en réponse aux GPCRs est en partie relayée par l'activation de la voie Jak/STAT. Ces résultats sont donc en accord avec les études précédentes suggérant un rôle de la voie Jak/STAT dans la réponse mitogénique des GPCRs (Marrero et al., 1997; Madamanchi et al., 2001). Par contre, notre approche est novatrice au sens où elle utilise un régulateur négatif naturel de la voie Jak/STAT afin d'être davantage spécifique aux membres de la voie. Parce qu'il a été rapporté que SOCS1 interagissait avec diverses protéines, tel que Vav et FAK (De Sepulveda et al., 2000; Liu et al., 2003), nous avons vérifié si cette approche était réellement spécifique quant à l'inhibition des voies majeures impliquées dans la prolifération cellulaire en réponse aux GPCRs. Nos résultats n'écartent pas que SOCS1 puisse interagir avec d'autres protéines que les Jaks dans ces cellules, mais

ils indiquent que l'activation par les GPCRs des voies PI3K/Akt et MAPK Erk1/2 ne semble pas être inhibée de façon significative. Nous pouvons donc suggérer que l'effet d'inhibition de la prolifération en réponse aux GPCRs, dans ces cellules, serait principalement dû à l'inhibition de la voie Jak/STAT.

Pour faire suite, il serait intéressant et nécessaire d'étudier la progression du cycle cellulaire dans ces cellules, suite à la stimulation des GPCRs. À l'aide du FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorter*), il nous sera possible de déterminer, dans un premier temps, quelle phase du cycle cellulaire est perturbée dans ces cellules. Jusqu'à présent, les études de la voie Jak/STAT en rapport au cycle cellulaire sont peu nombreuses et davantage en lien avec la réponse aux cytokines, ou à une activité constitutive de ses membres. Pour l'instant, il a été décrit que la voie Jak/STAT est importante au niveau de la transition G1/S du cycle cellulaire (Fukada et al., 1998). Nous pourrions par la suite étudier plus spécifiquement la régulation des protéines impliquées dans la transition de ces phases.

Un élément important à mentionner est la différence d'induction de la prolifération en réponse à la thrombine, ou au LPA, dans les cellules Rat1. La synthèse d'ADN stimulée durant 24 heures par le LPA, dans les Rat1, était du même ordre d'amplitude que celle induite par la thrombine, et même un peu plus forte. Il nous est donc apparu étrange que la courbe de prolifération de ces cellules, en réponse au LPA, soit moindre que celle obtenue avec la thrombine. L'hypothèse que nous émettons est basée sur le principe même de l'activation de ces deux sous-familles de récepteurs. Effectivement, il est connu que la thrombine est une enzyme qui clive la queue N-terminale du récepteur PAR-1 afin de l'activer de façon constitutive. Il est également connu qu'une seule molécule de thrombine peut activer plusieurs récepteurs. Par contre, le LPA est un phospholipide métabolisé par son récepteur LPA₁, et donc, il est fort probable que la concentration de LPA utilisée soit davantage limitante que celle de la thrombine. Nous avons effectué ces courbes de prolifération sur 5 jours, en remplaçant le milieu de culture par du milieu frais avec agoniste aux deux jours. Afin d'obtenir une réponse aussi forte que celle obtenue pour la thrombine, il est probable que nous devrions ajouter du LPA tous les jours de la courbe de

prolifération. Il est aussi possible que le LPA active d'autres STATs, tel que STAT1 qui exerce un rôle anti-prolifératif. Il est intéressant de mentionner que l'AngII induit la prolifération cellulaire de façon un peu plus modérée que la thrombine dans les VSMCs (Figure 4.2). L'AngII et la thrombine activent les mêmes voies de signalisation, à l'exception de STAT1 qui est activée uniquement par l'AngII. De ce fait, il est tentant de spéculer que cette différence de potentiel mitogénique pourrait être due à l'activation de ce facteur de transcription (Pelletier et al., 2003a; Pelletier et al., 2003b). Il serait simple de vérifier cette hypothèse en observant si le LPA active STAT1 dans les VSMCs et les Rat1, et de mesurer son impact sur la régulation de la prolifération cellulaire. Cette hypothèse sera à vérifier suivant les résultats obtenus avec les MEFs *SOCS1*^{-/-} et qui sont discutés dans la section 5.2.2. Bien que nous avons tout de même pu vérifier l'hypothèse voulant que la voie Jak/STAT soit impliquée dans la réponse mitogénique des GPCRs dans les Rat1, nous tenterons tout de même d'optimiser cet essai pour les prochaines expériences à venir.

Il serait fort intéressant de poursuivre la caractérisation de ces lignées clonales stables surexprimant *SOCS1*, dans la réponse mitogénique des GPCRs. Effectivement, la mise au point de cette approche étant complétée, nous devrions prochainement examiner la synthèse protéique de ces cellules en réponse aux GPCRs. Il a par ailleurs été démontré que la petite protéine RhoA était impliquée dans l'hypertrophie occasionnée par le LPA dans les myocytes cardiaques (Hilal-Danda et al., 2004). Suivant notre modèle établissant un rôle essentiel de RhoA dans l'activation de la voie Jak/STAT en réponse aux GPCRs, il serait intéressant de vérifier l'implication de cette voie de signalisation dans cette réponse biologique. Il serait aussi simple et rapide d'observer le niveau d'apoptose de ces cellules, ce qui nous informerait également sur l'impact de cette voie dans la réponse de survie cellulaire des GPCRs.

De plus, des essais de migration pourront nous donner un bon indice de l'implication de la voie Jak/STAT dans cette réponse biologique, et nous permettre de la comparer avec de récentes études suggérant une implication de STAT3 en réponse à la thrombine et à des formes actives de petites protéines G de la famille Rho (Debidida et al.,

2005). Par contre, il serait nécessaire d'effectuer quelques tests supplémentaires au niveau des régulateurs de la migration cellulaire. Effectivement, il a été démontré que SOCS1 interagit avec p125FAK, une kinase essentielle à la migration cellulaire (Liu et al., 2003). Il serait donc possible que l'effet observé dans ces lignées clonales soit dû à cette interaction et non pas à l'inhibition de la voie Jak/STAT. De récentes données obtenues par microscopie à contraste de phase, dans notre laboratoire, indiquent une migration proliférative différente des cellules contrôles par rapport aux lignées surexprimant SOCS1 (données non-présentées).

Finalement, il sera intéressant d'observer si nous obtenons les mêmes résultats dans les lignées clonales stables de VSMCs surexprimant SOCS1, comparativement aux lignées clonales stables Rat1-SOCS1. La première étape sera de déterminer si la voie de signalisation Jak/STAT est inhibée en réponse aux GPCRs dans ces lignées. Par la suite, nous pourrons répéter les expériences effectuées avec les lignées clonales stables de Rat1 surexprimant SOCS1.

5.2.2 SOCS1, un régulateur naturel de la voie Jak/STAT en réponse aux GPCRs

Afin d'évaluer l'implication de SOCS1 dans la régulation de la voie Jak/STAT, nous avons utilisé des fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs) isolés de souris déficientes en SOCS1 (*SOCS1^{-/-}*). Il est intéressant de mentionner qu'à notre connaissance, il s'agit de la première étude utilisant cette lignée cellulaire dans le contexte de la régulation des GPCRs. Effectivement, cette lignée est principalement étudiée en rapport à la réponse aux IFNs; réponse qui est gravement perturbée dans ces cellules. (Ilangumaran et al., 2002).

La première étape consistait à examiner l'influence de cette délétion sur l'activation de la voie Jak/STAT, et plus particulièrement de STAT3. En réponse aux agonistes de GPCRs, nous avons observé que la phase tardive d'activation de STAT3, en plus d'être

d'une plus forte amplitude, était davantage soutenue dans les MEFs *SOCS1*^{-/-} que dans les MEFs isolées de souris de type sauvage (Figure 4.8). Ce résultat démontre de façon convaincante l'implication de SOCS1 dans la désensibilisation de l'activation de STAT3 en réponse aux GPCRs. Il est essentiel de mentionner que nous n'avons pas observé d'activation des Jaks ou de STAT3 par la thrombine dans ces cellules. Pour l'instant, l'hypothèse proposée est que dans les lignées fibroblastes de souris, il est possible que les récepteurs de la thrombine, à tout le moins PAR-1, soient limitants et que cela influence l'activation des voies de signalisation habituellement activées par cet agoniste. En effet, nous n'avons pas non plus observé d'activation de STAT3 en réponse à la thrombine dans les fibroblastes de souris NIH 3T3 (données non-présentées). Par contre, certaines études utilisant la thrombine ont été effectuées dans ces cellules, ce qui semble indiquer la présence de ces récepteurs (Marinissen et al., 2003). Nous devons répéter cette expérience prochainement afin de valider ou d'infirmer notre hypothèse. Il est également possible qu'il s'agisse d'un problème de spécificité de récepteurs, puisque nous utilisons de la thrombine recombinante humaine pour stimuler des cellules de souris.

Afin d'examiner l'implication biologique de l'activation soutenue de STAT3, nous avons effectué une courbe de prolifération de ces cellules en réponse au LPA et nous l'avons comparé aux cellules de type sauvage. Il est clairement apparu que ces lignées cellulaires avaient un avantage certain pour la prolifération (Figure 4.9). Effectivement, ces cellules ont les caractéristiques de cellules transformées; elles ne se synchronisent pas dans un milieu dépourvu de sérum et d'agents mitogéniques. De plus, une très forte activation de STAT3 a été observée dans ces cellules, en croissance exponentielle, comparativement aux cellules de type sauvage (Figure 4.8). Ceci pourrait expliquer, en partie, la croissance désordonnée et la caractéristique de transformation de ces cellules, en se basant sur les études qui indiquent que STAT3 a un potentiel de transformation (Broomberg et al., 1999).

Un élément intéressant est apparu lors de la stimulation de ces cellules au LPA sur plusieurs jours. En effet, nous avons observé un important retard de croissance des MEFs *SOCS1*^{-/-} (Figure 4.9). Il est intéressant de mentionner que, dans les MEFs *SOCS1*^{-/-}, il a été

rapporté que l'activation de STAT1 était davantage soutenue en réponse à l'IFN- γ (Ilangumaran et al., 2002). Une stimulation à l'IFN- γ augmente l'expression de STAT1, en plus de l'activer très fortement et de façon soutenue à long terme. Il est important de se rappeler que STAT1 est décrit comme jouant un rôle d'inhibiteur de la croissance. STAT1 est activée en réponse à plusieurs cytokines mais semble jouer un rôle essentiel et non redondant uniquement en réponse aux IFNs (Meraz et al., 1996). Les IFNs ont généralement un rôle négatif sur la croissance cellulaire et cette action antiproliférative est due à l'activation de STAT1 puisqu'en son absence, les IFNs peuvent promouvoir la croissance (Nguyen et al., 2000). Se basant sur ces découvertes, nous avons donc examiné l'activation de STAT1 dans ces cellules, en réponse au LPA. Nous avons observé une très forte activation de STAT1, soutenue à long terme, dans les MEFs *SOCS1*^{-/-} en réponse au LPA. Il est tout de même surprenant que le LPA n'active pas STAT1 dans les MEFs de type sauvage (*SOCS1*^{+/+}) (Figure 4.10). Il semble donc que SOCS1 soit davantage impliqué que ce que nous pensions au niveau de la régulation de la voie Jak/STAT en réponse aux GPCRs. Nous avons émis l'hypothèse que cette forte activation de STAT1, malgré l'activation soutenue de STAT3, pourrait être en partie responsable du retard de croissance perçu dans les MEFs *SOCS1*^{-/-} en réponse au LPA.

Il est essentiel de mentionner que les MEFs *SOCS1*^{+/+} et les MEFs *SOCS1*^{-/-} n'activent pas STAT1 en croissance exponentielle (Figure 4.10). Il est possible que, malgré l'activation soutenue de STAT3 en réponse au LPA dans les MEFs *SOCS1*^{-/-}, l'activation de STAT1 soit tellement importante qu'elle compense négativement sur la prolifération de ces cellules. Par contre, nous n'avons pas observé une stimulation de la prolifération des MEFs *SOCS1*^{+/+} en réponse au LPA. Il est intéressant de mentionner que le LPA a déjà été décrit comme un régulateur négatif de la croissance de cellules tumorales (Furui et al., 1999). Il serait aussi possible que l'impact du LPA sur la prolifération de ces cellules soit minimisé, comme mentionné dans la section 5.2.1, dû au fait qu'il est métabolisé et que sa concentration dans le milieu de culture soit limitante. Cette hypothèse sera prochainement vérifiée.

De plus, il pourrait être intéressant de pousser plus loin l'étude de l'impact de SOCS1 sur l'activation de STAT1. Effectivement, il est étrange d'observer une différence aussi majeure d'activation de STAT1 entre ces deux lignées cellulaires. L'activation de STAT1 en réponse au LPA, passe de nulle dans les MEFs *SOCS1*^{+/+}, à très forte dans les MEFs *SOCS1*^{-/-} (Figure 4.10). Par contre, il est important de mentionner que l'expression de STAT1 dans les MEFs *SOCS1*^{-/-} est également très forte, comparativement aux MEFs *SOCS1*^{+/+}. Il est donc possible que le LPA active STAT1 dans les cellules de type sauvage, mais tellement faiblement qu'avec une expression dite « normale », nous ne pouvons la percevoir.

En conclusion, nous avons démontré de façon convaincante que SOCS1 est un régulateur négatif naturel de la voie Jak/STAT en réponse aux GPCRs. Malgré le fait que la lignée cellulaire déficiente en SOCS1 était très prometteuse au départ, elle s'est avérée plutôt limitante en raison de ses caractéristiques suggérant sa transformation. Nos observations sont donc en accord avec la théorie suggérant que SOCS1 aurait un potentiel de suppresseur tumoral (Rottapel et al., 2002). Finalement, nos observations nous ont permis d'appuyer les études précédentes suggérant un potentiel de transformation pour STAT3 (Broomberg et al., 1999).

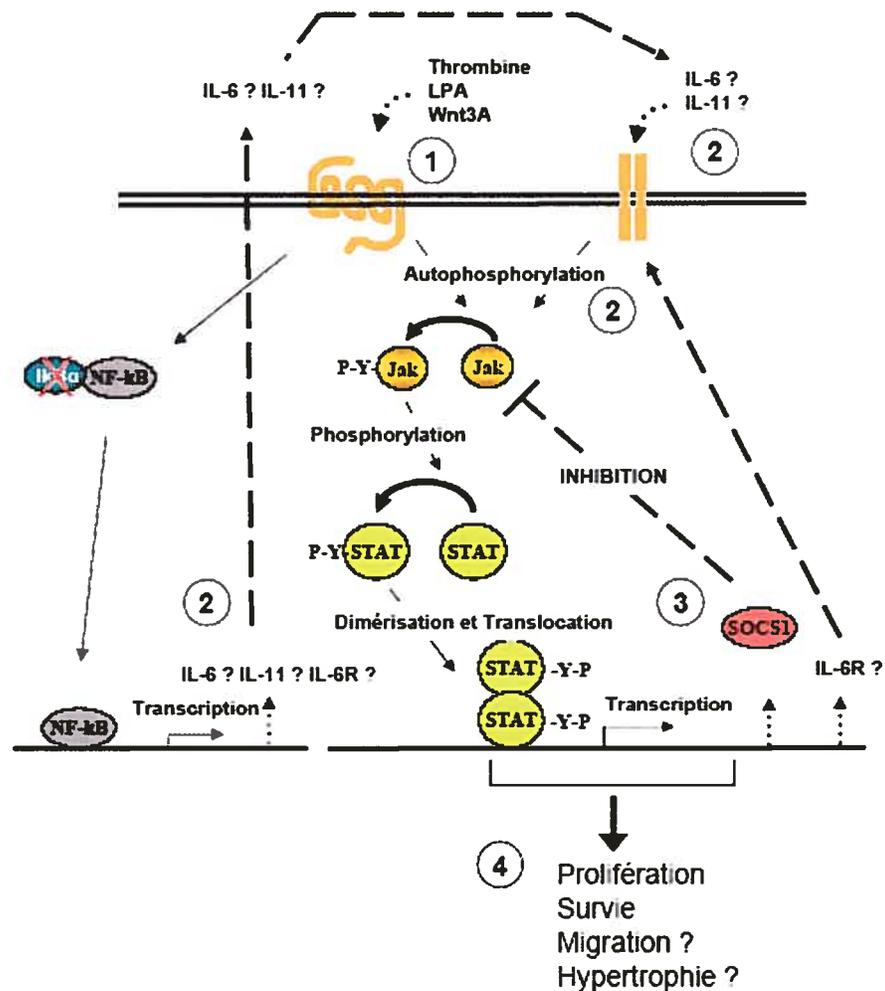


Figure 5.1. Modèle d'activation de la voie de signalisation Jak/STAT3 en réponse aux GPCRs.
 1- La voie Jak/STAT est activée par les agonistes de GPCRs (Thr, LPA, Wnt3A). 2- NF-kappaB est essentiel dans l'activation tardive de STAT3 en réponse aux GPCRs. 3- SOCS1 est un régulateur négatif naturel de la voie Jak/STAT en réponse aux GPCRs. 4- La voie Jak/STAT est impliquée au niveau de la prolifération et possiblement de la survie cellulaire, en réponse aux GPCRs

5.3 Approches spécifiques complémentaires

Bien que la phosphorylation des Jaks ne semble pas complètement inhibée dans les lignées clonales stables surexprimant SOCS1, il est clair que leur activité l'est, puisque STAT3 est complètement inactivé (Figure 4.3). Puisque tous les membres de la voie

Jak/STAT sont inhibés dans la lignée surexprimant SOCS1, nous nous devons de développer de nouvelles approches plus spécifiques afin d'évaluer le potentiel de chacun des membres dans la réponse mitogénique des GPCRs. À cette fin, plusieurs approches ont été effectuées, dont une approche de siRNAs, de vecteurs rétroviraux encodant des shRNAs et de vecteurs rétroviraux encodant des formes inactives des différentes protéines de la voie Jak/STAT.

5.3.1 Vecteurs encodant des shRNAs vs siRNAs synthétiques

Une approche par vecteur encodant des shRNAs permet de produire des lignées déficientes en une protéine ciblée, donc l'équivalent de cellules « *knockout* », et ce, sans avoir à posséder l'expertise de la génétique murine. Elle permet de diminuer l'expression d'une protéine ciblée dans n'importe quelle lignée cellulaire où la protéine est exprimée, dans n'importe quelle espèce, et de façon très efficace en autant que la séquence codante pour cette protéine soit connue. De plus, il y a trois avantages majeurs non négligeables à cette approche par rapport aux siRNAs conventionnels. Premièrement, elle n'est pas limitante puisque c'est un vecteur qui induit les shRNAs; ils ne sont pas synthétiques. Deuxièmement, elle permet une diminution stable à long terme de la protéine ciblée. La durée de l'efficacité d'un siRNA synthétique est de quelques jours, environ 72 heures dans notre laboratoire, comparativement à une diminution permanente par approche de vecteurs encodant des shRNAs. Troisièmement, bien qu'il commence à apparaître plusieurs banques de séquences cibles efficaces contre diverses protéines, le choix de la séquence est empirique et nous ne pouvons pas savoir, à priori, si elle sera efficace afin de diminuer l'expression de la protéine cible. La modification de la séquence cible de l'approche par vecteurs encodant des shRNAs est simple et très peu coûteuse par rapport à l'approche de siRNAs synthétiques. Il n'est pas négligeable de considérer qu'une approche de vecteurs encodant des shRNAs offre la possibilité d'effectuer des expériences de reconstitution de systèmes. Effectivement, une fois cette approche mise au point, il nous sera possible de reconstituer le système de ces cellules avec une forme inactive de la protéine ciblée. Ceci nous permettra, dans le cas d'une kinase, de mesurer l'impact de son rôle de protéine

adaptatrice, s'il y en a un, par rapport à son rôle catalytique. Il est donc intéressant de développer une approche de formes inactives en parallèle. En conclusion, une approche par vecteur encodant un shRNA est beaucoup plus avantageuse qu'une approche conventionnelle par siRNA, ce qui motive son développement et son optimisation.

5.3.2 Vecteurs encodant des shRNAs

Dans notre cas, l'approche de vecteurs encodant des shRNAs semble nécessiter quelques modifications; nous en suggérons deux. Premièrement, le mode de sélection. Effectivement, la puromycine semble être un agent efficace pour sélectionner les cellules, mais de manière très drastique avec une sélection à court terme. Ne se basant pas sur le même principe de sélection que la néomycine (G418), la puromycine fonctionne par résistance innée des cellules qui possède le gène *pac* encodant une « *puromycin N-acetyl transferase* » (PAC). Nous avons observé une mortalité des cellules Rat1 exprimant les shRNAs contre Jak2 et STAT3 lors de la sélection à la puromycine. Il est probable que la production de shRNAs contre ces deux protéines influence la survie cellulaire et qu'une sélection plutôt stricte par la suite ne leur permet pas de survivre. Pour contourner ce problème, le vecteur rétroviral sera modifié en vecteur dit « biscistronique ». Le principe de ce vecteur est d'avoir deux promoteurs régulant deux gènes différents. Dans ce cas-ci, le premier promoteur (U6) permettra d'exprimer les virus encodant les shRNAs contre les protéines cibles, tandis que le second promoteur PGK (*Phosphoglycerate kinase*) permettra l'expression de la protéine EGF (*Enhanced Green Fluorescent Protein*). Cette protéine permet de trier les cellules qui l'expriment par FACS, plutôt que de leur faire subir une sélection par un agent chimique. Nous croyons fortement au potentiel de cette approche dont l'efficacité a déjà été démontrée par d'autres groupes de recherche (Gupta et al., 2004).

Il est connu que Jak2 et STAT3 sont directement impliqués au niveau de la survie cellulaire. Afin de pouvoir moduler davantage la diminution de l'expression de ces protéines en rapport avec la survie cellulaire, nous modifierons également le promoteur U6

afin de le rendre inductible à la doxycycline. Présentement, dans notre laboratoire, une approche de vecteur rétroviral inductible a été mise au point et démontre une induction significative de l'expression de la protéine encodée en 8 heures; ce qui est relativement rapide (données non-présentées). En insérant des sites de liaison à la doxycycline au promoteur U6, selon un protocole établi par un autre groupe de recherche (Lin et al., 2004), nous croyons pouvoir développer une approche qui sera efficace et applicable à plusieurs autres systèmes et projets du laboratoire. De plus, il n'est pas étonnant ou inhabituel que cette approche nécessite quelques modifications. En effet, le Dr. Devroe, créateur du vecteur rétroviral encodant les shRNAs que nous utilisons, a mentionné que cette approche avait des limites bien définies. Il a notamment proposé qu'afin de cibler des protéines impliquées directement dans le cycle cellulaire, ou très importantes pour la survie cellulaire, il serait nécessaire d'utiliser une approche inductible plutôt que leur approche constitutive (Devroe et Silver, 2002).

Qui plus est, nous savons que nos séquences sont efficaces, puisqu'elles ont permis la génération de clones stables diminuant fortement Jak2 et STAT3 dans les fibroblastes de souris NIH 3T3. Nos séquences cibles choisies sont spécifiques pour la forme de souris et de rat des protéines ciblées. Il serait donc surprenant qu'une séquence spécifique à deux espèces ne soit efficace que pour une seule. Parce que les Rat1 meurent en réponse à cette approche, nous pouvons conclure qu'il est probable que Jak2 et STAT3 sont davantage importantes dans les fibroblastes de rat (Rat1), à tout le moins au niveau de la survie cellulaire, que dans les fibroblastes de souris (NIH 3T3).

5.3.3 siRNAs synthétiques

Par la suite, nous avons essayé une approche par siRNAs synthétiques afin de vérifier si elle serait plus efficace. Nous avons immédiatement observé certains désavantages de cette approche. Effectivement, les siRNAs contre Jak2 et STAT3 permettent la diminution de l'expression de ces protéines respectives, mais à court terme uniquement. En effet, dans ces deux cas précis, la diminution maximale des protéines cibles

est à 24 heures et remonte rapidement par la suite, pour pratiquement atteindre le niveau basal à 48 heures. Il nous est donc impossible d'effectuer des courbes de prolifération sur plusieurs jours avec cette approche. Par contre, il sera possible d'optimiser cette approche afin de l'appliquer à divers essais, comme par exemple, de mesurer l'incorporation de thymidine et de leucine tritiées en réponse aux GPCRs, dans des cellules transfectées ou non avec ces siRNAs. Puisque nous avons démontré, par l'approche de surexpression de SOCS1, que la voie Jak/STAT est impliquée dans la prolifération cellulaire en réponse aux GPCRs (Figure 4.7), nous nous attendons à percevoir une diminution de la synthèse d'ADN dans les cellules transfectées avec ces siRNAs. Par la suite, une étude exhaustive des régulateurs du cycle cellulaire sera effectuée dans des cellules Rat1 transfectées avec ces siRNAs, en réponse aux GPCRs. Puisque l'impact de la voie Jak/STAT sur le cycle cellulaire en réponse à ces récepteurs est encore méconnu, nous croyons que nous obtiendrons des résultats intéressants avec cette approche.

5.3.4 Formes dominantes-négatives

Les vecteurs répressibles encodant des formes inactives des Jaks et de STAT3 se sont avérés plutôt inefficaces, ne permettant pas une expression de certaines protéines dans les Rat1. Puisque ces formes inactives ont pu être exprimées dans les HEK293, nous supposons que l'impact de la perte de l'activité de Jak2 et STAT3, principalement, est critique pour la survie des fibroblastes de rat (Rat1). De plus, les approches de shRNAs et de siRNAs semblent aller dans le même sens, démontrant un effet sur la survie cellulaire également (Figure 4.14). Une alternative serait, comme proposée précédemment dans la section 5.3.2, d'utiliser une approche inductible plutôt que répressible. Nous croyons que de cette manière, il nous serait davantage possible de moduler l'expression de ces formes inactives, et ainsi de contre-balancer la létalité qu'elles induisent dans les Rat1. Il est d'autant plus intéressant de poursuivre l'étude dans cette lignée cellulaire (Rat1), malgré la difficulté encourue, puisque tout semble indiquer un rôle davantage important pour la voie Jak/STAT dans ces cellules, en comparaison avec les autres lignées cellulaires utilisées jusqu'à maintenant.

Finalement, des vecteurs rétroviraux inductibles des formes inactives des Jaks et de STAT3 nous permettront d'étudier plus spécifiquement l'impact de leur activité catalytique et transcriptionnelle, respectivement, dans la réponse mitogénique des GPCRs. En effet, les approches de siRNAs et de shRNAs ont comme principe de base d'évaluer l'impact de l'absence d'une protéine dans un système. Nous croyons qu'en combinaison avec les approches de shRNAs et de siRNAs, les formes inactives inductibles apporteront plusieurs éléments nouveaux et essentiels à la compréhension du rôle de la voie JAK/STAT dans la réponse mitogénique des GPCRs.

5.4 Avenues intéressantes

Une autre approche, indéniablement efficace, est l'utilisation de MEFs isolées de souris déficientes en ces protéines. Des MEFs *Tyk2*^{-/-} ont été générées dans notre laboratoire au cours de ce projet. Les premières expériences effectuées dans cette lignée, en parallèle avec sa lignée contrôle, fourniront d'autres informations sur le rôle de Tyk2 dans la voie Jak/STAT en réponse aux GPCRs. Nous saurons aussi, à ce moment, s'il est possible d'étudier la voie Jak/STAT en réponse aux GPCRs dans ce système (MEFs), n'ayant pas été d'une très bonne efficacité jusqu'à maintenant, comme expliqué dans la section 5.2.2. Si ces cellules s'avèrent être un bon modèle d'étude, il sera simple et très intéressant d'obtenir les cellules déficientes en Jak1 et Jak2 (Rodig et al., 1998; Parganas et al., 1998). Les cellules STAT3^{-/-} ont été produites par la stratégie de souris Cre-Lox, puisque les souris « *knockout* » sont létales au jour 7.5 de gestation (Takeda et al., 1997; Akira, 1999). L'intérêt d'obtenir précisément les cellules déficientes des autres Jaks sera d'effectuer une étude sur la redondance fonctionnelle de ces protéines en réponse aux GPCRs, qui en elle-même, constituerait une étude innovatrice. À notre connaissance, aucune étude n'a évalué les rôles de Jak1 et Tyk2 en réponse aux GPCRs, mais il est maintenant clair que ces protéines jouent un rôle dans l'activation de la voie Jak/STAT en réponse à ces récepteurs (Pelletier et al., 2003b; Figure 4.1). De plus, à l'aide des vecteurs rétroviraux inductibles que nous optimisons présentement, il sera très aisément réalisable de reconstituer le

système de ces cellules déficientes avec la forme inactive de chacune de ces protéines. Nous pourrions ainsi observer, comme mentionné dans la section 5.3.4, si l'activité catalytique des Jaks a un impact au niveau de la réponse mitogénique des GPCRs et de l'activation de la voie Jak/STAT en réponse à ces récepteurs.

Il est connu que les GPCRs sont impliqués dans diverses conditions pathophysiologiques, tel que le cancer et les maladies cardiovasculaires (Hunyady et Turu, 2004; Rahika et al., 2005). Il serait donc grandement intéressant de tester les nouvelles approches que nous développons dans ces conditions, à l'instar de certains groupes, par exemple au niveau des récepteurs KSHV-GPCR et CCK2R (Burger et al., 2005; Ferrand et al., 2005). Une lignée tumorale surexprimant un GPCR, ou en exprimant une forme constitutive, serait un modèle d'étude pathophysiologique des plus intéressants, ce qui permettrait possiblement d'établir un lien entre les découvertes effectuées dans notre étude et des désordres physiologiques importants. Il serait aussi possible d'évaluer le potentiel de transformation des Jaks et de STAT3 en lien avec la transformation occasionnée par les GPCRs, dont le récepteur PAR-1 ou une forme de GPCR constitutivement actif (Martin et al., 2001).

6. CONCLUSIONS

Au cours des dernières années, plusieurs GPCRs ont été démontrés comme étant des activateurs de la voie Jak/STAT, et tout récemment, que ce mécanisme d'activation transigerait via les petites protéines G de la famille Rho. Par contre, bien peu est connu en ce qui a trait au rôle biologique de cette voie en réponse à ces GPCRs. À la lumière de nos résultats, il est clair que la voie de signalisation Jak/STAT est impliquée dans la réponse mitogénique des GPCRs. De plus, nos travaux ont conduit à l'identification de nouveaux partenaires impliqués dans la régulation de cette voie de signalisation. D'une part, nous avons démontré que le facteur de transcription NF-kappaB est essentiel à l'activation tardive de STAT3, et d'autre part, que SOCS1 est directement impliqué dans la régulation négative à long terme de la voie Jak/STAT en réponse aux GPCRs. Cependant, dans les deux cas, les détails du mécanisme restent encore à être élucidés. De plus, nous avons démontré que la voie Jak/STAT peut être activée par de nouveaux agonistes de GPCRs, tel que le LPA et possiblement Wnt3A. Également, nous considérons le développement de plusieurs approches inhibitrices spécifiques effectuées au cours de ce projet, comme le cheval de Troie d'une prochaine étude innovatrice sur le rôle fonctionnel des différents membres de la voie Jak/STAT en réponse aux GPCRs, et dont les membres individuels ne sont que très peu caractérisés jusqu'à présent. Ces approches nous permettront aussi d'étudier la redondance fonctionnelle existant entre les membres des Jaks, et de distinguer leur rôle de protéines kinases de celui d'adaptateur qui leur est suggéré. Éventuellement, il nous sera possible d'appliquer ces approches dans des contextes pathophysiologiques, tel qu'au niveau du cancer et des désordres cardiovasculaires, où la voie Jak/STAT est omniprésente.

7. BIBLIOGRAPHIE

Abraham LA, Mackie EJ. (1999) Modulation of osteoblast-like-cell behavior by activation of protease activated receptor-1. *J Bone. Miner. Res.* 14, 1320-1329.

Akira S. (2000) Roles of STAT3 defined by tissue-specific gene targeting. *Oncogene.* 19, 2607-11.

Akira S, Nishio Y, Inoue M, Wang XJ, Wei S, Matsusaka T, Yoshida K, Sudo T, Naruto M, Kishimoto T. (1994) Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway. *Cell.* 77, 63-71.

Akiyama T. (2000) Wnt/beta-catenin signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 11, 273-282.

Alexander WS, Starr R, Fenner JE, Scott CL, Handman E, Sprigg NS, Corbin JE, Cornish AL, Darwiche R, Owczarek CM, Kay TW, Nicola NA, Hertzog PJ, Metcalf D, Hilton DJ. (1999) SOCS1 is a critical inhibitor of interferon γ signaling and prevents the potentially fatal neonatal actions of this cytokine. *Cell.* 98, 597-608.

Ali MS, Sayeski PP, Bernstein KE. (2000) Jak2 acts as both a STAT1 kinase and as a molecular bridge linking STAT1 to the angiotensin II AT1 receptor. *J.Biol.Chem.* 275, 15586-15593.

Ali MS, Sayeski PP, Dirksen LB, Hayzer DJ, Marrero MB, Bernstein KE. (1997) Dependence on the motif YIPP for the physical association of Jak2 kinase with the intracellular carboxyl tail of the angiotensin II AT1 receptor. *J.Biol.Chem.* 272, 23382-23388.

- Ali MS, Sayeski PP, Safavi A, Lyles M, Bernstein KE. (1998) Janus kinase 2 (Jak2) must be catalytically active to associate with the AT1 receptor in response to angiotensin II. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 249, 672-677.
- Alonzi T, Maritano D, Gorgoni B, Rizzuto G, Libert C, Poli V. (2001) Essential role of STAT3 in the control of the acute-phase response as revealed by inducible gene activation in the liver. *Mol. Cell. Biol.* 21, 1621-1632.
- Anliker B, Chun J. (2004) Cell surface receptors in lysophospholipid signaling. *Seminars in Cell & Developmental Biology.* 15, 457-465.
- Aoki N, Matsuda T. (2000) A cytosolic protein-tyrosine phosphatase PTP1B specifically dephosphorylates and deactivates prolactin-activated STAT5a and STAT5b. *J. Biol. Chem.*, 275, 39718-39726.
- Aoki N, Matsuda T. (2002) A nuclear protein tyrosine phosphatase TCPTP is a potential negative regulator of the PRL-mediated signaling pathway: dephosphorylation and deactivation of signal transducer and activator of transcription 5a and 5b by TC-PTP in nucleus. *Mol. Endocrinol.* 16, 58-69.
- Arnould C, Philippe C, Bourdon V, Gregoire MJ, Berger R, Jonveaux P. (1999) The signal transducer and activator of transcription STAT5b gene is a new partner of retinoic acid receptor alpha in acute promyelocytic-like leukaemia. *Hum. Mol. Genet.* 8, 1741-1749.
- Asao H, Okuyama C, Kumaki S, Ishii N, Tsuchiya S, Foster D, Sugamura K. (2001) Cutting edge: the common gamma-chain is an indispensable subunit of the IL-21 receptor complex. *J. Immunol.* 167, 1-5.

- Aubry L, Firtel R. (1999) Integration of signalling networks that regulate Dictyostelium differentiation. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 15, 469-517.
- Azam M, Erdjument-Bromage H, Kreider BL, Xia M, Quelle F, Basu R, Saris C, Tempst P, Ihle JN, Schindler C. (1995) Interleukin-3 signals through multiple isoforms of Stat5. *EMBO J.* 14, 1402-1411.
- Bach EA, Aguet M, Schreiber RD. (1997) The IFN-gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 563-93
- Bhanot P, Brink M, Samos CH, Hsieh JC, Wang Y, Macke JP, Andrew D, Nathans J, Nusse R. (1996) A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wingless receptor. *Nature.* 382, 225-30.
- Baird AM, Lucas JA, Berg LJ. (2000) A profound deficiency in thymic progenitor cells in mice lacking Jak3. *J. Immunol.* 165, 3680-8.
- Bakhiet M, Tjernlund A, Mousa A, Gad A, Stromblad S, Kuziel WA, Seiger A, Andersson J. (2001) RANTES promotes growth and survival of human first-trimester forebrain astrocytes. *Nat. Cell. Biol.* 3, 150-7.
- Barahmand-Pour F, Meinke A, Groner B, Decker T. (1998) Jak2-Stat5 interactions analyzed in yeast. *J. Biol. Chem.* 273, 12567-12575.
- Barillas-Mury C, Han YS, Seeley D, Kafatos FC. (1999) *Anopheles gambiae* Ag-STAT, a new insect member of the STAT family, is activated in response to bacterial infection. *EMBO J.* 18, 959-67.
- Becker S, Groner B, Müller CW. (1998) Three-dimensional structure of the Stat3b homodimer bound to DNA. *Nature.* 394, 145-151.

- Begitt A, Meyer T, van Rossum M, Vinkemeier U. (2000) Nucleocytoplasmic translocation of Stat1 is regulated by a leucine-rich export signal in the coiled-coil domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 10418–10423.
- Belham CM, Scott PH, Twomey DP, Gould GW, Wadsworth RM, Plevin R. (1997) Evidence that thrombin-stimulated DNA synthesis in pulmonary arterial fibroblasts involves phosphatidylinositol 3-kinase-dependent p70 ribosomal S6 kinase activation. *Cell Signalling.* 9, 109-116
- Bhat GJ, Thekkumkara TJ, Thomas WG, Conrad KM, Baker KM. (1994) Angiotensin II stimulates sis-inducing factor-like DNA binding activity. Evidence that the AT1A receptor activates transcription factor-Stat91 and/or a related protein. *J. Biol. Chem.* 269, 31443-31449.
- Binari R, Perrimon N. (1994) Stripespecific regulation of pair-rule genes by hopscotch, a putative Jak family tyrosine kinase in *Drosophila*. *Genes Dev.* 8, 300–12.
- Biswas SK, Sodhi A. (2002) Tyrosine phosphorylation-mediated signal transduction in MCP-1-induced macrophage activation: role for receptor dimerization, focal adhesion protein complex and JAK/STAT pathway. *Int. Immunopharmacol.* 8, 1095-107.
- Bluyssen HAR, Levy DE. (1997) Stat2 is a transcriptional activator that requires sequence specific contacts provided by Stat1 and p48 for stable interaction with DNA. *J. Biol. Chem.* 272, 4600–4605.
- Bogdan C, Rollinghoff M, Diefenbach A. (2000) The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol. Rev.* 173, 17-26.

- Booz GW, Day JN, Baker KM. (2002) Interplay between the cardiac renin angiotensin system and JAK-STAT signaling: role in cardiac hypertrophy, ischemia/reperfusion dysfunction, and heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* Nov;34(11) :1443-53.
- Bos JL. (1998) All in the family? New insights and questions regarding interconnectivity of Ras, Rap1 and Ral. *EMBO J.* 17, 6776-6782.
- Bowman T, Broome MA, Sinibaldi D, Wharton W, Pledger WJ, Sedivy JM, Irby R, Yeatman R, Courtneidge SA, Jove R. (2001) Stat3-mediated Myc expression is required for Src transformation and PDGF-induced mitogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 98, 7319-7324.
- Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R. (2000) STATs in oncogenesis. *Oncogene.* 19, 2474–2488.
- Boyer L, Travaglione S, Falzano L, Gauthier NC, Popoff MR, Lemichez E, Fiorentini C, Fabbri A. (2004) Rac GTPase instructs nuclear factor-kappaB activation by conveying the SCF complex and I κ B α to the ruffling membranes. *Mol. Biol. Cell.* 3, 1124-33.
- Brass LF, Pizarro S, Ahuja M, Belmonte E, Blanchard N, Stadel JM, Hoxie JA (1994) Changes in the structure and function of the human thrombin receptor during receptor activation, internalization, and recycling. *J. Biol. Chem.* 269, 2943–2952.
- Brender C, Nielsen M, Kaltoft K, Mikkelsen G, Zhang Q, Wasik M, Billestrup N, Odum N. (2001) STAT3-mediated constitutive expression of SOCS-3 in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood.* 97;1056-62.
- Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C, Darnell JE. (1999) Stat3 as an oncogene. *Cell.* 98, 295– 303.

- Burger M, Burger JA, Hoch RC, Oades Z, Takamori H, Schraufstatter IU. (1999) Point mutation causing constitutive signalling of CXCR2 leads to transforming activity similar to Kaposi's sarcoma herpesvirus-G protein-coupled receptor. *J. Immunol.* 163, 2017-22.
- Burger M, Hartmann T, Burger JA, Schraufstatter I. (2005) KSHV-GPCR and CXCR2 transforming capacity and angiogenic responses are mediated through a JAK2-STAT3-dependant pathway. *Oncogene.* 24, 2067-75.
- Caldenhoven E, Van Dijk TB, Solari R, Armstrong J, Raaijmakers JAM, Lammers JWJ, Koenderman L, De Groot RP. (1996) STAT3 β , a splice variant of transcription factor STAT3, is a dominant negative regulator of transcription. *J. Biol. Chem.* 271, 13221-13227.
- Candotti F, Oakes SA, Johnston JA, Giliani S, Schumacher RF, Mella P, Fiorini M, Ugazio AG, Badolato R, Notarangelo LD, Bozzi F, Macchi P, Strina D, Vezzoni P, Blaese RM, O'Shea JJ, Villa A. (1997) Structural and functional basis for JAK3-deficient severe combined immunodeficiency. *Blood.* 90, 3996-4003.
- Cao X, Shores EW, Hu-Li J, Anver MR, Kelsall BL, Russell SM, Drago J, Noguchi M, Grinberg A, Bloom ET, et al. (1995) Defective lymphoid development in mice expression of the common cytokine receptor gamma chain. *Immunity.* 3, 223-38.
- Caselli A, Marzocchini R, Camici G, Manao G, Moneti G, Pieraccini G, Ramponi G. (1998) The inactivation mechanism of low molecular weight phosphotyrosine-protein phosphatase by H₂O₂. *J. Biol. Chem.* 273, 32554-60.

- Chang MS, Chang GD, Leu JH, Huang FL, Chou CK, Huang CJ, Lo TB. (1996) Expression, characterization, and genomic structure of carp JAK1 kinase gene. *DNA Cell. Biol.* 15, 827–44.
- Chapelle ADL, Traskelin AL, Juvonen E. (1993) Truncated erythropoietin receptor causes dominantly inherited benign human erythrocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 4495–4499.
- Chapman RS, Lourenco PC, Tonner E, Flint DJ, Selbert S, Takeda K, Akira S, Clarke AR, Watson CJ. (1999) Suppression of epithelial apoptosis and delayed mammary gland involution in mice with a conditional knockout of Stat3. *Genes Dev.* 13, 2604–2616.
- Chatterjee-Kishore M, Wright KL, Ting JP, Stark G. (2000) How Stat1 mediates constitutive gene expression: a complex of unphosphorylated Stat1 and IRF1 supports transcription of the LMP2 gene. *EMBO J.* 19, 4111-4122.
- Chen J, Ishii M, Wang L, Ishii K and Coughlin SR. (1994) Thrombin receptor activation. Confirmation of the intramolecular tethered liganding hypothesis and discovery of an alternative intermolecular liganding mode. *J. Biol. Chem.* 269, 16041-16045.
- Chen LB et Buchanan JM. (1975) Mitogenic activity of blood components. I. Thrombin and prothrombin. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 72, 131-135.
- Chen M, Cheng A, Chen YQ, Hymel A, Hanson EP, Kimmel L, Minami Y, Taniguchi T, Changelian PS, O'Shea JJ. (1997) The amino terminus of JAK3 is necessary and sufficient for binding to the common gamma chain and confers the ability to transmit interleukin 2-mediated signals. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 94, 6910-6915.

- Chen X, Vinkemeier U, Zhao Y, Jeruzalmi D, Darnell JE, Kuriyan J. (1998) Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA. *Cell*. 93, 827–839.
- Chim CS, Fung TK, Cheung WC, Liang R, Kwong YL. (2004) SOCS1 and SHP1 hypermethylation in multiple myeloma: implications for epigenetic activation of the Jak/STAT pathway. *Blood*. 103, 4630-5.
- Chin YE, Kitagawa M, Kuida K, Flavell RA, Fu XY. (1997) Activation of the STAT signaling pathway can cause expression of caspase 1 and apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 17, 5328–5337.
- Chitnis T, Najafian N, benou C, Salama AD, Grusby MJ, Sayegh MH, Khoury SJ. (2001) Effect of targeted disruption of STAT4 and STAT6 on the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J.Clin.Invest.* 108, 739-747.
- Chung CD, Liao J, Liu B, Rao X, Jay P, Berta P, Shuai K. (1997a) Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science*. 278, 1803-1805.
- Chung J, Uchida E, Grammer TC, Blenis J. (1997b) STAT3 serine phosphorylation by ERK-dependant and –independent pathways negatively modulates its tyrosine phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 11, 6508-16.
- Claing A. (2004) Regulation of G protein-coupled receptor endocytosis by ARF6 GTP-binding proteins. *Biochem. Cell. Biol.* 82, 610-7.
- Contos JJ, Fukushima N, Weiner JA, Kaushal DJ. (2000) Requirement for the LPA1 lysophosphatidic acid receptor gene in normal suckling behavior. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 97, 13384–13389.

- Contos JJ, Ishii I, Fukushima N, Kingsbury MA, Ye XQ, Kawamura S, Brown JH, Chun J. (2002) Characterization of lpa(2) (Edg4) and lpa(1) / lpa(2) (Edg2/Edg4) lysophosphatidic acid receptor knockout mice: signaling deficits without obvious phenotypic abnormality attributable to lpa(2). *Mol. Cell. Biol.* 22, 6921–29.
- Cook SJ, Rubinfeld B, Albert I, McCormick F. (1993) RapV12 antagonizes Ras-dependant activation of ERK1 and ERK2 by LPA and EGF in Rat-1 fibroblasts. *EMBO J.* 9, 3475-85.
- Cunnick JM, Dorsey JF, Mei L, Wu J. (1998) Reversible regulation of SHP-1 tyrosine phosphatase activity by oxidation. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 45, 887-94.
- Dahmen H, Horsten U, Kuster A, Jacques Y, Minvielle S, Kerr IM, Ciliberto G, Paonessa G, Heinrich PC, Muller-Newen G. (1998) Activation of the signal transducer gp130 by interleukin-1 and interleukin-6 is mediated by similar molecular interactions. *Biochem. J.* 331, 695-702
- Daniel NN, Rothman P. (2000) JAK-STAT signaling activated by Abl oncogenes. *Oncogene.* 19, 2523-2531.
- Darnell JE Jr. (1997a) Phosphotyrosine signaling and the single cell :metazoan boundary. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94, 11767-9.
- Darnell JE Jr. (1997b) STATs and gene regulation. *Science.* 277, 1630-5.
- Darnell JE Jr. (2002). Transcription factors as targets for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer.* 10, 740-9.

- Darnell JE Jr, Kerr IM, Stark GM. (1994) Jak-STAT pathway and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*. 264, 1415-1421.
- David M, Chen HE, Goetz S, Lerner AC, Neel BG. (1995) Differential regulation of the alpha/beta interferon-stimulated Jak/Stat pathway by the SH2 domain-containing tyrosine phosphatase SHPTP1. *Mol. Cell Biol.* 15, 7050-7058.
- Debidda M, Wang L, Zang H, Poli V, Zheng Y. (2005) A role of STAT3 in Rho GTPase regulated cell migration and proliferation. *J. Biol. Chem.* 280, 17275-85.
- Decker T, Kovarik P. (2000) Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene* 19, 2628-2637.
- Decker T, Kovarik P, Meinke A. (1997) GAS elements: A few nucleotides with a major impact on cytokine-induced gene expression. *J. Interferon Cytokine Res.* 17, 121-134.
- De Sepulveda P, Illangumaran S, Rottapel R. (2000) Suppressor of cytokine signaling-1 inhibits VAV function through protein degradation. *J. Biol. Chem.* 275, 14005-14008.
- Devroe E, Silver PA. (2002) Retrovirus-delivered siRNA. *BMC Biotechnology.* 2, 15.
- Dong F, Qiu Y, Yi T, Touw IP, Lerner AC. (2001) The carboxyl terminus of the granulocyte colony-stimulating factor receptor, truncated in patients with severe congenital neutropenia/acute myeloid leukemia, is required for SH2-containing phosphatase-1 suppression of Stat activation. *J. Immunol.* 167, 6447-52.
- Dronadula N, Liu Z, Wang C, Cao H, Rao GN. (2005) STAT-3-dependent cytosolic phospholipase A2 expression is required for thrombin-induced vascular smooth muscle cell motility. *J. Biol. Chem.* 280, 3112-20.

- Duhé RJ, Farrar WL. (1995) Characterization of active and inactive forms of the JAK2 protein-tyrosine kinase produced via the baculovirus expression vector system. *J. Biol. Chem.* 270, 23084-23089.
- Duhé RJ, Farrar WL. (1998) Structural and mechanistic aspects of Janus kinases: how the two-faced god wields a double-edged sword. *J. Interferon Cytokine Res.* 18, 1-15.
- Durbin JE Jr, Hackenmiller R, Simon MC, Levy DE. (1996) Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. *Cell.* 84, 443-450.
- Ehret GB, Reichenbach P, Schindler U, Horvath CM, Fritz S, Nabholz M, Bucher P. (2001) DNA binding specificity of different STAT proteins. Comparison of in vitro specificity with natural target sites. *J. Biol. Chem.* 276, 6675-6688.
- Eidt JF, Ashton J, McNatt J, Buja LM, Willerson JT. (1988) Thrombin is an important mediator of platelet-aggregation in vivo. *Clin. Res.* 36, A603-A603.
- Endo TA, Masuhara M, Yokouchi M, Suzuki R, Sakamoto H, Mitsu K, Matsumoto A, Tanimura S, Ohtsubo M, Misawa H, Miyazaki T, Leonor N, Taniguchi T, Fujita T, Kanakura Y, Komiya S, Yoshimura A. (1997) A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature.* 387, 921-4.
- Etienne-Manneville S, Hall A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature.* 420, 629-635.
- Even-Ram CS, Maoz M, Pokroy E, Reich R, Katz BZ, Gutwein P, Altevogt P, Bar-Shavit R. (2001) Tumor cell invasion is promoted by activation of protease activated receptor-1 in cooperation with $\alpha v \beta 5$ integrin. *J. Biol. Chem.* 276, 10952-10962.

- Even-Ram S, Uziely B, Cohen P, Grisaru-Granovsky S, Maoz M, Ginzburg Y, Reich R, Vlodaysky I, Bar-Shavit R. (1998). Thrombin receptor overexpression in malignant and physiological invasion processes. *Nat. Med.* 8, 909-14.
- Fagerlund R, Melén K, Kinnunen L, Julkunen I. (2002) Arginine/lysine-rich NLSs mediate interactions between dimeric STATs and importin α 5. *J. Biol. Chem.* 277, 30072-30078.
- Fain JN, Ihle JH, Bahouth SW. (1999) Stimulation of lipolysis but not of leptin release by growth hormone is abolished in adipose tissue from Stat5a and b knockout mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 263, 201–205.
- Fang X, Yu S, Bast RC, Liu S, Xu HJ, Hu SX, LaPushin R, Claret FX, Aggarwal BB, Lu Y, Mills GB. (2004) Mechanisms for lysophosphatidic acid-induced cytokine production in ovarian cancer cells. *J. Biol. Chem.* 279, 9653-61.
- Fang X, Yu S, LaPushin R, Lu Y, Furui T, Penn LZ, Stokoe D, Erickson JR, Bast RC Jr, Mills GB. (2000) Lysophosphatidic acid prevents apoptosis in fibroblasts via G(i)-protein-mediated activation of mitogenactivated protein kinase. *Biochem. J.* 352, 135–143.
- Farrar JD, Smith JD, Murphy TL, Murphy KM. (2000) Selective loss of type I interferon-induced Stat4 activation caused by a minisatellite insertion in mouse Stat2. *Nat. Immunol.* 1, 65–69.
- Faruqi TR, Gomez D, Bustelo XR, Bar-Sagi D, Reich NC. (2001) Rac1 mediates STAT3 activation by autocrine IL-6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98, 9014-9.

- Feener EP, Rosario F, Dunn SL, Stancheva Z, Myers MG Jr. (2004) Tyrosine phosphorylation of Jak2 in the JH2 domain inhibits cytokine signalling. *Mol. Cell Biol.* 24, 4968-78.
- Feng J, Witthuhn BA, Matsuda T, Kohlhuber F, Kerr IM, Ihle JN. (1997) Activation of Jak2 catalytic activity requires phosphorylation of Y1007 in the kinase activation loop. *Mol. Cell Biol.* 17, 2497-2501.
- Ferguson SS. (2001) Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol. Rev.* 53, 1-24.
- Ferrand A, Kowalski-Chauvel A, Bertrand C, Escrieut C, Mathieu A, Portolan G, Pradayrol L, Fourmy D, Dufresne M, Seva C. (2005) A novel mechanism for JAK2 activation by a G protein-coupled receptor, the CCK2R: implication of this signaling pathway in pancreatic tumor models. *J. Biol. Chem.* 280, 10710-5.
- Filali M, Cheng N, Abbott D, Leontiev V, Engelhardt JF. (2002) Wnt-3A/beta-catenin signaling induces transcription from the LEF-1 promoter. *J. Biol. Chem.* 277, 33398-33410.
- Fishman DA, Liu Y, Ellerbroek SM, Stack MS. (2001) Lysophosphatidic acid promotes matrix metalloproteinase (MMP) activation and MMP-dependent invasion in ovarian cancer cells. *Cancer Res.* 61, 3194-3199.
- Flores-Morales A, Pircher TJ, Silvennoinen O, Gustafsson JA, Sanchez-Gomez M, Norstedt G, Haldosen LA, Wood TJ. (1998) In vitro interaction between STAT 5 and JAK 2; dependence upon phosphorylation status of STAT 5 and JAK 2. *Mol. Cell. Endocrinol.* 138, 1-10.

- Flowers LO, Johnson HM, Mujtaba MG, Ellis MR, Haider SM, Subramaniam PS. (2004) Characterization of a peptide inhibitor of Janus kinase 2 that mimics suppressor of cytokine signaling 1 function. *J. Immunol.* 172, 7510-8.
- Frank SJ, Yi W, Zhao Y, Goldsmith JF, Gilliland G, Jiang J, Sakai I, Kraft AS. (1995) Regions of the JAK2 tyrosine kinase required for coupling to the growth hormone receptor. *J.Biol.Chem.* 270, 14776-14785.
- Fukada T, Ohtani T, Yoshida Y, Shirogane T, Nishida K, Nakajima K, Hibi M, Hirano T. (1998) STAT3 orchestrates contradictory signals in cytokine-induced G1 to S cell-cycle transition. *EMBO J.* 17, 6670-6677.
- Fukuhara S, Murga C, Zohar M, Igishi T, Gutkind JS. (1999) A novel PDZ domain containing guanine nucleotide exchange factor links heterotrimeric G proteins to Rho. *J. Biol. Chem.* 274, 5868-5879
- Furui T, LaPushin R, Mao M, Khan H, Watt SR, Watt MA, Lu Y, Fang X, Tsutsui S, Siddik ZH, Bast RC, Mills GB. (1999) Overexpression of *edg-2/vzg-1* induces apoptosis and anoikis in ovarian cancer cells in a lysophosphatidic acid-independent manner. *Clin. Cancer Res.* 5, 4308-18.
- Galceran J, Farinas I, Depew MJ, Clevers H, Grosschedl R. (1999) *Wnt3a*^{-/-}-like phenotype and limb deficiency in *Lef1*^(-/-)*Tcf1*^(-/-) mice. *Genes Dev.* 13, 709-717.
- Galm O, Yoshikawa H, Esteller M, Osieka R, Herman JG. (2003) SOCS-1 a negative regulator of cytokine signaling is frequently silenced by methylation in multiple myeloma. *Blood.* 101, 2784-8.
- Garzon R, Soriano SF, Rodriguez-Frade JM, Gomez L, Martin de Ana A, Sanchez-Gomez M, Martinez-A C, Mellado, M. (2004) CXCR4-mediated suppressor of cytokine

signaling up-regulation inactivates growth hormone function. *J. Biol. Chem.* 279, 44460-6.

Gauzzi MC, Velasquez L, McKendry R, Mogensen KE, Fellous M, Pellegrini S. (1996) Interferon-alpha-dependent activation of Tyk2 requires phosphorylation of positive regulatory tyrosines by another kinase. *J.Biol.Chem.* 271, 20494-20500.

Gerhartz C, Heesel B, Sasse J, Hemmann U, Landgraf C, Schneider-Mergener J, Horn F, Heinrich PC, Graeve L. (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, 12991-12998.

Giasson E, Sevant MJ, Meloche S. (1997) Cyclic AMP-mediated inhibition of angiotensin II-induced protein synthesis is associated with suppression of tyrosine phosphorylation signaling in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 272, 26879-86.

Girault JA, Labesse G, Mornon JP, Callebaut I. (1998) Janus kinases and focal adhesion kinases play in the 4.1 band: a superfamily of band 4.1 domains important for cell structure and signal transduction. *Mol. Med.* 4, 751-769.

Glembotski CC, Irons CE, Krown KA, Murray SF, Sprenkle AB, Sei CA. (1993) Myocardial alpha-thrombin receptor activation induces hypertrophy and increases atrial natriuretic factor gene expression. *J. Biol. Chem.* 268, 20646-52.

Grad JM, Zeng XR, Boise LH. (2000) Regulation of Bcl-xL: a little bit of this and a little bit of STAT. *Curr.Opin.Oncol.* 12, 543-549.

- Gupta S, Yan H, Wong LH, Ralph S, Krolewski J, Schindler C. (1996) The SH2 domains of Stat1 and Stat2 mediate multiple interactions in the transduction of IFN-alpha signals. *EMBO J.* 15, 1075–1084.
- Gupta S, Schoer RA, Egan JE, Hannon GJ, Mittal V. (2004) Inducible, reversible, and stable RNA interference in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101, 1927-1932.
- Guschin D, Rogers N, Briscoe J, Witthuhn B, Watling D, Horn F, Pellegrini S, Yasukawa K, Heinrich P, Stark GR et al. (1995) A major role for the protein tyrosine kinase JAK1 in the JAK/STAT signal transduction pathway in response to interleukin-6. *EMBO J.* 14, 1421-1429.
- Hang JG, Farley A, Nicholson SE, Willson TA, Zugaro LM, Simpson RJ, Moritz RL, Cary D, Richardson R, Hausmann G, Kile BJ, Kent SB, Alexander WS, Metcalf D, Hilton DJ, Nicola NA, Baca M. (1999) The conserved SOCS box motif in suppressors of cytokine signaling binds to elongins B and C and may couple bound proteins to proteasomal degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 96, 2071-6.
- Harashima A, Suzuki M, Okochi A, Yamamoto M, Matsuo Y, Motoda R, Yoshioka T, Orita K. (2002) CD45 tyrosine phosphatase inhibits erythroid differentiation of umbilical cord blood CD34+ cells associated with selective inactivation of Lyn. *Blood* 100, 4440-4445.
- Harpur AG, Andres AC, Ziemiecki A, Aston RR, Wilks AF. (1992) JAK2, a third member of the JAK family of protein tyrosine kinases. *Oncogene* 7, 1347-1353.
- He B, You L, Uematsu K, Zang K, Xu Z, Lee AY, Costello JF, McCormick F, Jablons DM. (2003) SOCS-3 is frequently silenced by hypermethylation and suppresses cell growth in human lung cancer. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 100, 14133-8.

- He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. (1998) Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science*. 281, 1509-1512.
- Helbig G, Christopherson II KW, Bhat-Nakshatri P, Kumar S, Kishimoto H, Miller KD, Broxmeyer HE, Nakshatri H. (2003) NF- κ B promotes breast cancer cell migration and metastasis by inducing the expression of the chemokine receptor CXCR4. *J. Biol. Chem.* 278, 21631-38.
- Henriksen MA, Betz A, Fuccillo MV, Darnell JE Jr. (2002) Negative regulation of STAT92E by an N-terminally truncated STAT protein derived from an alternative promoter site. *Genes Dev.* 16, 2379-89.
- Hilal-Dandan R, Means CK, Gustafsson AB, Morissette MR, Adams Jw, Brunton LL, Heller Brown J. (2004) Lysophosphatidic acid induces hypertrophy of neonatal cardiac myocytes via activation of Gi and Rho. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 36, 481-93.
- Hilkens CM, Is'harc H, Lillemeier BF, Strobl B, Bates PA, Behrmann I, Kerr IM. (2001) A region encompassing the FERM domain of Jak1 is necessary for binding to the cytokine receptor gp130. *FEBS Lett.* 505, 87-91.
- Holtsberg FW, Steiner MR, Bruce-Keller AJ, Keller JN, Mattson MP, Moyers JC, Steiner SM. (1998) Lysophosphatidic acid and apoptosis of nerve growth factor-differentiated PC12 cells. *J. Neurosci. Res.* 53, 685-696.
- Hordijk PL, Verlaan I, van Corven EJ, Moolenaar WH. (1994) Protein tyrosine phosphorylation induced by lysophosphatidic acid in Rat-1 fibroblasts. Evidence that phosphorylation of map kinase is mediated by the Gi-p21ras pathway. *J. Biol. Chem.* 269, 645-51.

- Horvath CM. (2000) STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals. *Trends Biochem. Sci.* 10, 496-502.
- Horvath CM, Darnell JE. (1997) The state of STATs: recent developments in the study of signal transduction to the nucleus. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 9, 233-39
- Horvath CM, Stark GR, Kerr IM, Darnell JE Jr. (1996) Interactions between STAT and non-STAT proteins in the interferon-stimulated gene factor 3 transcription complex. *Mol. Cell. Biol.* 16, 6957-6964.
- Hoxie JA, Ahuja M, Belmonte E, Pizarro S, Parton R and Brass LF (1993) Internalization and recycling of activated thrombin receptors. *J. Biol. Chem.* 268, 13756-13763.
- Hou J, Schindler U, Henzel WJ, Ho TC, Brasseur M, McKnight SL. (1994) An interleukin-4 induced transcription factor: IL-4 Stat. *Science.* 265, 1701-1705.
- Houndolo T, Boulay PL, Claing A. (2005) G protein-coupled receptor endocytosis in ADP-ribosylation factor 6-depleted cells. *J. Biol. Chem.* 280, 5598-604.
- Huang YQ, Li JJ, Karpatkin S. (2000) Thrombin inhibits tumor cell growth in association with up-regulation of p21(waf/cip) and caspases via a p53-independant, STAT-1-dependant pathway. *J. Biol. Chem.* 275, 6462-8.
- Hubbard SR, Till JH. (2000) Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 373-98.
- Hubbard SR, Wei L, Ellis L, Hendrickson WA. (1994) Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor. *Nature.* 372, 746-754.

- Hung DT, Wong YH, Vu TK, Coughlin SR. (1992) The cloned platelet thrombin receptor couples to at least two distinct effectors to stimulate phosphoinositide hydrolysis and inhibit adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* 267, 20831-20834.
- Hunyady L, Turu G. (2004) The role of AT1 angiotensin receptor in cardiac hypertrophy : angiotensin II receptor or stretch sensor? *Trends Endocrinol. Metab.* 15, 405-8.
- Iaccarino G, Rockman HA, Shotwell KF, Tomhave ED, Koch WJ. (1998) Myocardial overexpression of GRK3 in transgenic mice: evidence for in vivo selectivity of GRKs. *Am. J. Physiol.* 275, H1298-H1306.
- Ihle JN. (1995a) The Janus protein tyrosine kinase family and its role in cytokine signaling. *Adv. Immunol.* 60, 1-35
- Ihle JN. (1995b) Cytokine receptor signalling. *Nature.* 377, 591-594.
- Ihle JN. (2001) The Stat family in cytokine signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 211–217.
- Ilangumaran S, Finan D, La Rose J, Raine J, Silverstein A, De Sepulveda P, Rottapel R. (2002) A positive regulatory role for suppressor of cytokine signaling 1 in IFN-gamma-induced MHC class II expression in fibroblasts. *J. Immunol.* 169, 5010-20.
- Ilangumaran S, Ramanathan S, Rottapel R. (2004) Regulation of the immune system by SOCS family adaptor proteins. *Semin. Immunol.* 16, 351-65.
- Imamura F, Imamura F, Horai T, Mukai M, Shinkai K, Sawada M, Akedo H. (1993) Induction of *in vitro* tumour cell invasion of cellular monolayers by lysophosphatidic acid or phospholipase D. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 193, 497–503.

- Ishii I, Fukushima N, Ye X, Chun J. (2004) Lysophospholipid receptors : Signaling and Biology. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 321–54.
- Ishii K, Chen J, Ishii M, Koch WJ, Freedman NJ, Lefkowitz RJ, Coughlin SR. (1994) Inhibition of thrombin receptor signaling by a G-protein coupled receptor kinase. Functional specificity among G-protein coupled receptor kinases. *J. Biol. Chem.* 269, 1125-1130.
- Ishii K, Gerszten R, Zheng YW, Welsh JB, Turck CW, Coughlin SR. (1995) Determinants of thrombin receptor cleavage. Receptor domains involved, specificity, and role of the P3 aspartate. *J. Biol. Chem.* 270, 16435–16440.
- James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garcon L, Raslova H, Berger R, Bennaceur-Griscelli A, Villeval JL, Constantinescu SN, Casadevall N, Vainchenker W. (2005) A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signaling causes polycythaemia vera. *Nature*. [Epub ahead of print].
- Jang HD, Yoon K, Shin YJ, Kim J, Lee SY. (2004) PIAS3 suppresses NF-kappaB-mediated transcription by interacting with the p65/RelA subunit. *J. Biol. Chem.* 279, 24873-80.
- Ju H, Venema VJ, Liang H, Harris MB, Zou R, Venema RC. (2000) Bradykinin activates the Janus-activated kinase/signal transducers and activators of transcription (JAK/STAT) pathway in vascular endothelial cells: localization of JAK/STAT signalling proteins in plasmalemmal caveolae. *Biochem. J.* 351, 257-264.
- Kamio M, Yoshida T, Ogata H, Douchi T, Nagata Y, Inoue M, Hasegawa M, Yonemitsu Y, Yoshimura A. (2004) SOCS1 inhibits HPV-E7 transformation by inducing degradation of E7 protein. *Oncogene.* 23, 3107-15.

- Kamura T, Sato S, Haque D, Liu L, Kaelin WG Jr, Conaway RC, Conaway JW. (1998) The Elongin BC complex interacts with the conserved SOCS-box motif present in members of the SOCS, ras, WD-40 repeat, and ankyrin repeat families. *Genes Dev.* 12, 3872-81.
- Kaplan MH, Schindler U, Smiley ST, Grusby MJ. (1996a) Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for the development of Th2 cells. *Immunity* 4, 313–319.
- Kaplan MH, Sun YL, Hoey T, Grusby MJ. (1996b) Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature.* 382, 174–177.
- Karaghiosoff M, Neubauer H, Lassnig C, Kovarik P, Schindler H, Pircher H, McCoy B, Bogdan C, Decker T, Brem G, Pfeffer K, Muller M. (2000) Partial impairment of cytokine responses in Tyk2-deficient mice. *Immunity.* 4, 549-60.
- Kessler DS, Levy DE, Darnell JE. (1988) Two interferon-induced nuclear factors bind a single promoter element in interferon-stimulated genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85, 8521–8525.
- Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler CW. (2002) Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene.* 285, 1-24.
- Kleinberger-Doron N, Shelah N, Capone R, Gazit A, Levitzki A. (1998) Inhibition of Cdk2 activation by selected tyrophostins causes cell cycle arrest at late G1 and S phase. *Exp. Cell. Res.* 241, 340-51.
- Klingmuller U, Lorenz U, Cantley LC, Neel BG, Lodish HF. (1995) Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. *Cell.* 80, 729-38.

- Kohlhuber F, Rogers NC, Watling D, Feng J, Guschin D, Briscoe J, Witthuhn BA, Kotenko SV, Pestka S, Stark GR, Ihle JN, Kerr IM. (1997) A JAK1/JAK2 chimera can sustain alpha and gamma interferon responses. *Mol. Cell. Biol.* 17, 695–706.
- Komyod W, Bauer UM, Heinrich PC, Haan S, Behrmann I. (2005) Are STATs arginine-methylated? *J. Biol. Chem.* [Epub ahead of print].
- Kovarik P, Mangold M, Ramsauer K, Heidari H, Steinborn R, Zotter A, Levy DE, Muller M, Decker T. (2001) Specificity of signaling by STAT1 depends on SH2 and C-terminal domains that regulate Ser727 phosphorylation, differentially affecting specific target gene expression. *EMBO J.* 20, 91-100.
- Kranenburg O, Moolenaar WH, (2001) Ras-MAP kinase signaling by lysophosphatidic acid and other G protein-coupled receptor agonists. *Oncogene.* 20, 1540 – 1546.
- Kranenburg O, Poland M, van Horck FP, Drechsel D, Hall A, Moolenaar WH. (1999) Activation of RhoA by lysophosphatidic acid and Galpha12/13 subunits in neuronal cells: induction of neurite retraction. *Mol. Biol. Cell.* 10, 1851–1857.
- Krebs DL, Hilton DJ. (2001) SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem Cells.* 19, 378-387.
- Krolewski JJ, Lee R, Eddy R, Shows TB, Dalla-Favera R. (1990) Identification and chromosomal mapping of new human tyrosine kinase genes. *Oncogene.* 5, 277-282.
- Ku DD, Dai J. (1997) Expression of thrombin receptors in human atherosclerotic coronary arteries leads to an exaggerated vasoconstrictory response in vitro. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 30, 649-657.

- Kwon H, Pelletier N, DeLuca C, Genin P, Cisternas S, Lin R, Wainberg MA, Hiscott J. (1998) Inducible expression of I κ B α repressor mutant interferes with NF- κ B activity and HIV-1 replication in Jurkat T cells. *J. Biol. Chem.* 273, 7431-7440.
- Lai CF, Ripperger J, Morella KK, Wang Y, Gearing DP, Fey GH, Baumann H. (1995) Separate signaling mechanisms are involved in the control of STAT protein activation and gene regulation via the interleukin 6 response element by the box 3 motif of gp130. *J. Biol. Chem.* 270, 14847-14850.
- Lawless VA, Zhang S, Ozes ON, Bruns HA, Oldam I, Hoey T, Grusby MJ, Kaplan MH. (2000) Stat4 regulates multiple components of IFN- γ -inducing signaling pathways. *J. Immunol.* 165, 6803-6808.
- Lee C, Piazza F, Brutsaert S, Valens J, Strehlow I, Jarosinski M, Saris C, Schindler C. (1999) Characterization of the Stat5 protease. *J. Biol. Chem.* 274, 26767-26775.
- Lee JS, Ishimoto A, Yanagawa S. (1999b) Characterization of mouse dishevelled (Dvl) proteins in Wnt/Wingless signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 274, 21464-21470.
- Lentsch AB, Kato A, Davis B, Wang W, Chao C, Edwards MJ. (2001) STAT4 and STAT6 regulate systemic inflammation and protect against lethal endotoxemia. *J. Clin. Invest* 108, 1475-1482.
- Leonard WJ. (1996) Stats and cytokine specificity. *Nature Med.* 2, 968-69.
- Leonard WJ, O'Shea JJ. (1998) Jaks and STATs: biological implications. *Annu. Rev. Immunol.* 16, 293-322.
- Leung S, Li X, Stark GR. (1996) STATs find that hanging together can be stimulating. *Science* 273, 750-751.

- Levy DE, Darnell JE Jr. (2002) Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3, 651-62.
- Levy DE, Gilliland DG. (2000) Divergent roles of STAT1 and STAT5 in malignancy as revealed by gene disruptions in mice. *Oncogene.* 19, 2505-10.
- Li M, Sendtner M, Smith A. (1995) Essential function of LIF receptor in motor neurons. *Nature.* 378, 724-727.
- Li X, Massa PE, Hanidu A, Peet GW, Aro P, Savitt A, Mische S, Li J, Marcu KB. (2002) IKKalpha, IKKbeta, and NEMO/IKKgamma are each required for the NF-kappaB-mediated inflammatory response program. *J. Biol. Chem.* Nov 22;277(47):45129-40.
- Liang H, Chen Q, Coles AH, Anderson SJ, Pihan G, Bradley A, Gerstein R, Jurecic R, Jones SN. (2003) Wnt5a inhibits B cell proliferation and functions as a tumor suppressor in hematopoietic tissue. *Cancer Cell.* 4, 349-60.
- Lin JX, Migone TS, Tsang M, Friedmann M, Weartherbee JA, Zhou L, Yamauchi A, Bloom ET, Mietz J, John S, Leonard WJ. (1995) The role of shared receptor motifs and common STAT proteins in the generation of cytokine pleiotropy and redundancy by IL-2, IL-4, IL-7, IL-13, and IL-15. *Immunity.* 2, 331-339.
- Ling L, Lobie PE. (2004) RhoA/ROCK activation by growth hormone abrogates p300/histone deacetylase 6 repression of Stat5-mediated transcription. *J. Biol. Chem.* 279, 32737-50.
- Lin X, Yang J, Chen J, Gunasekera A, Fesik SW, Shen Y. (2004) Development of a tightly regulated U6 promoter for shRNA expression. *FEBS Letters.* 577, 376-380.

- Liu B, Liao J, Rao X, Kushner SA, Chung CD, Chang DD, Shuai K. (1998) Inhibition of STAT1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 10626-31.
- Liu B, Gross M, ten Hoeve J, Shuai K. (2001) A transcriptional corepressor of Stat1 with an essential LXXLL signature motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98, 3203-7.
- Liu E, Cote JF, Vuori K. (2003) Negative regulation of FAK signaling by SOCS proteins. *EMBO J.* 22, 5036-46
- Liu X, Robinson GW, Wagner KU, Garrett L, Wynshaw-Boris A, Hennighausen L. (1997) Stat5a is mandatory for adult mammary gland development and lactogenesis. *Genes Dev.* 11, 179-186.
- Lo RKH, Cheung H, Wong YH. (2003) Constitutively Active G α 16 Stimulates STAT3 via a c-Src/JAK- and ERK-dependent Mechanism. *J. Biol. Chem.* 278, 52154-52165.
- Lo RKH, Wong YH. (2004) Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Activation by the δ -Opioid Receptor via G α 14 Involves Multiple Intermediates. *Mol. Pharmacol.* 65, 1427-1439.
- Logan CY, Nusse R. (2004) The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 20, 781-810.
- Lund RJ, Chen Z, Scheinin J, Lahesmaa R. (2004) Early target genes of IL-12 and STAT4 signaling in Th cells. *J. Immunol.* 172, 6775-82.

- Luo H, Rose P, Barber D, Hanratty WP, Lee S, Roberts TM, D'andrea AD, Dearolf CR. (1997) Mutation in the Jak kinase JH2 domain hyperactivates *Drosophila* and mammalian Jak-Stat pathways. *Mol.Cell Biol.* 17, 1562-1571.
- Lukashova V, Asselin C, Krolewski JJ, Rola-Pleszczynski M, Stankova J. (2001) G-protein-independent activation of Tyk2 by the platelet-activating factor receptor. *J.Biol.Chem.* 276, 24113-24121.
- Lütticken C, Wegenka UM, Yuan J, Buschmann J, Schindler C, Ziemiecki A, Harpur AG, Wilks AF, Yasukawa K, Taga T. et al. (1994) Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130. *Science.* 263, 89-92.
- Ma J, Zhang T, Novotny-Diermayr V, Tan AL, Cao X. (2003) A novel sequence in the coiled-coil domain of STAT3 essential for its nuclear translocation. *J. Biol. Chem.* 278, 29252-60.
- Macfarlane SR, Seatter MJ, Kanke T, Hunter GD, Plevin R. (2001) Proteinase-activated receptors. *Pharmacol. Rev.* 53, 245-82.
- Madamanchi NR, Li S, Patterson C, Runge MS. (2001) Thrombin regulates vascular smooth muscle cell growth and heat shock proteins via the JAK-STAT pathway. *J. Biol. Chem.* 276, 18915-24.
- Malliri A, van der Kammen RA, Clark K, van der Valk M, Michiels F, Collard JG. (2002) Mice deficient in the Rac activator Tiam1 are resistant to Ras-induced skin tumours. *Nature.* 417, 867-871.

- Mao X, Ren Z, Parker GN, Sondermann H, Pastorello MA, Wang W, McMurray JS, Demeler B, Darnell JE Jr, Chen X. (2005) Structural bases of unphosphorylated STAT1 association and receptor binding. *Mol Cell*. 17, 761-71.
- Marine JC, Topham DJ, McKay C, Wang D, Parganas E, Stravopodis D, Yoshimura A, Ihle JN. (1999a) SOCS1 deficiency causes a lymphocyte-dependent perinatal lethality. *Cell*. 98, 609-616.
- Marine JC, McKay C, Wang D, Topham DJ, Parganas E, Nakajima H, Pendeville H, Yasukawa H, Sasaki A, Yoshimura A, Ihle JN. (1999b) SOCS3 is essential in the regulation of fetal liver erythropoiesis. *Cell*. 98, 617-27.
- Marinissen MJ, Servitja JM, Offermans S, Simon MI, Gutkind JS. (2003) Thrombin protease-activated receptor-1 signals through Gq- and G13-initiated MAPK cascades regulating c-Jun expression to induce cell transformation. *J. Biol. Chem*. 278, 46814-25.
- Maritano D, Sugrue ML, Tininini S, Dewilde S, Strobl B, Fu X, Murray-Tait V, Chiarle R, Poli V. (2004) The STAT3 isoforms alpha and beta have unique and specific functions. *Nat. Immunol*. 5, 401-9.
- Marrero MB, Schieffer B, Paxton WG, Heerdt L, Berk BC, Delafontaine P, Bernstein KE. (1995) Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT1 receptor. *Nature*. 375, 247-250.
- Marrero MB, Schieffer B, Li B, Sun J, Harp JB, Ling BN. (1997) Role of Janus kinase/signal transducer and activator of transcription and mitogen-activated protein kinase cascades in angiotensin II- and platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell proliferation. *J. Biol. Chem*. 272, 24684-90.

- Martin CB, Mahon GM, Klinger MB, Kay RJ, Symons M, Der CJ, Whitehead IP. (2001) The thrombin receptor, PAR-1 causes transformation by activation of Rho-mediated signaling pathways. *Oncogene*. 20, 1953-1963.
- Maruyama I, Shigeta K, Miyahara H, Nakajima T, Shin H, Ide S, Kitajima I. (1997) Thrombin activates NF-kappaB through thrombin receptor and results in proliferation of vascular smooth muscle cells: role of thrombin in atherosclerosis and restenosis. *Ann. NY Acad. Sci.* 811, 429, 36.
- Matsukawa A, Kaplan MH, Hogaboam CM, Lukacs NW, Kunkel SL. (2001) Pivotal role of signal transducer and activator of transcription (Stat)4 and Stat6 in the innate immune response during sepsis. *J.Exp.Med.* 193, 679-688.
- Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ. (1999) The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependant proteolysis. *Nature*. 399, 271-5.
- McBride KM, Banninger G, McDonald C, Reich NC. (2002) Regulated nuclear import of the STAT1 transcription factor by direct binding of importin- α . *EMBO J.* 21, 1754-1763.
- McNamara CA, Sarembock IJ, Gimple LW, Fenton JW, Coughlin SR et Owens GK. (1993) Thrombin stimulates proliferation of cultured rat aortic smooth muscle cells by a proteolytically activated receptor. *J.Clin.Invest.* 91, 94-98.
- Meissner T, Krause E, Lodige I, Vinkemeier U. (2004) Arginine methylation of STAT1: a reassessment. *Cell*. 119, 587-589; discussion 589-590.

- Mellado M, Rodriguez-Frade JM, Aragay A, del Real G, Martin AM, Vila-Coro AJ, Serrano A, Mayor F Jr, Martinez AC. (1998) The chemokine monocyte chemoattractant protein 1 triggers Janus kinase 2 activation and tyrosine phosphorylation of the CCR2B receptor. *J.Immunol.* 161, 805-813.
- Meloche S. (1995) Cell cycle reentry of mammalian fibroblasts is accompanied by the sustained activation of p44mapk and p42mapk isoforms in the G1 phase and their inactivation at the G1/S transition. *J.Cell Physiol.* 163, 577-588.
- Meloche S, Pages G, Pouyssegur J. (1992) Functional expression and growth factor activation of an epitope-tagged p44 mitogen-activated protein kinase, p44mapk. *Mol.Biol.Cell.* 3, 63-71.
- Meloche S, Pelletier S, Servant MJ. (2000) Functional cross-talk between the cyclic AMP and Jak/STAT signaling pathways in vascular smooth muscle cells. *Mol. Cell. Biochem.* 212, 99-109.
- Meraz MA, White JM, Sheehan KC, Bach EA, Rodig SJ, Dighe AS, Kaplan DH, Riley JK, Greenlund AC, Campbell D, Carver-Moore K, DuBois RN, Clark R, Aguet M, Schreiber RD. (1996) Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiological specificity in the JAK-STAT pathway. *Cell.* 84, 431-442.
- Metcalf D, Mifsud S, Di Rago L, Nicola NA, Hilton DJ, Alexander WS. (2002) Polycystic kidneys and chronic inflammatory lesions are the delayed consequences of loss of the suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS-1). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99, 943-8.
- Meyer J, Jucker M, Ostertag W, Stocking C. (1998) Carboxyl-truncated STAT5 β is generated by a nucleus-associated serine protease in early hematopoietic progenitors. *Blood.* 91, 1901-1908.

- Meyer T, Begitt A, Lodige I, van Rossum M, Vinkemeier U. (2002) Constitutive and IFN- γ -induced nuclear import of STAT1 proceed through independent pathways. *EMBO J.* 21, 344-354.
- Miller JR. (2002) The Wnts. *Genome Biol.* 3, 1-15.
- Mills GB, May C, McGill M, Roifman C, Mellors A. (1998) A putative new growth factor in ascitic fluid from ovarian cancer patients: identification, characterization and mechanism of action. *Cancer Res.* 48, 1066-1071.
- Mills GB, Moolenaar WH. (2003) The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 3, 582-91.
- Miyazaki T, Takaoka A, Nogueira L, Dikic I, Fujii H, Tsujino S, Mitani Y, Maeda M, Schlessinger J, Taniguchi T. (1998) Pyk2 is a downstream mediator of the IL-2 receptor-coupled Jak signaling pathway. *Genes Dev.* 12, 770-775.
- Montaner S, Perona R, Saniger L, Lacal JC. (1998) Multiple signalling pathways lead to the activation of the nuclear factor kappaB by the Rho family of GTPases. *J. Biol. Chem.* 273, 12779-12785.
- Montaner S, Sodhi A, Pece S, Mesri EA, Gutkind JS. (2001) The Kaposi's sarcoma-associated Herpesvirus G protein-coupled receptor promotes endothelial cell survival through the activation of Akt/Protein kinase B. *Cancer Research.* 61, 2641-2648.
- Moriggl R, Gouilleux-Gruart V, Jaehne R, Berchtold S, Gatmann C, Liu X, Hennighausen L, Sotiropoulos A, Groner B, Gouilleux F. (1996) Deletion of the carboxy-terminal transactivation domain of MGF-Stat5 results in sustained DNA binding and a dominant negative phenotype. *Mol. Cell. Biol.* 16, 5691-5700.

- Moriggl R, Topham DJ, Teglund S, Sexl V, McKay C, Wang D, Hoffmeyer A, van Deursen J, Sangster MV, Bunting KD, Grosveld GC, Ihle JN. (1999) Stat5 is required for IL-2-induced cell cycle progression of peripheral T cells. *Immunity*. 10, 249–259.
- Mowen KA, Tang J, Zhu W, Schurter BT, Shuai K, Herschman HR, David M. (2001) Arginine methylation of STAT1 modulates IFN α /beta-induced transcription. *Cell*. 104, 731-41.
- Mui A, Wakao H, O'Farrell AM, Harada N, Miyajima A. (1995) Interleukin-3, granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin-5 transduce signals through two Stat5 homologues. *EMBO J*. 14, 1166–1175.
- Muller M, Briscoe J, Laxton C, Guschin D, Ziemiecki A, Silvennoinen O, Harpur AG, Barbieri G, Witthuhn BA, Schindler C et al. (1993) The protein tyrosine kinase JAK1 complements defects in interferon- α /beta and -gamma signal transduction. *Nature*. 366, 129-135.
- Muramatsu I, Laniyonu A, Moore GJ, Hollenberg MD. (1992) Vascular actions of thrombin receptor peptide. *Can. J. Physiol. Pharmacol*. 70, 996-1003.
- Murph MM, Scaccia LA, Volpicelli LA, Radhakrishna H. (2003) Agonist-induced endocytosis of lysophosphatidic acid-coupled LPA1/EDG-2 receptors via a dynamin2- and Rab5-dependent pathway. *J. Cell. Sci*. 116, 1969-80.
- Myers MP, Andersen JN, Cheng A, Tremblay ML, Horvath CM, Parisien JP, Salmeen A, Bradford D, Tonks NK. (2001) TYK2 and JAK2 are substrates of protein tyrosine phosphatase 1B. *J.Biol.Chem*. 276, 47771-47774.

- Nagai H, Kim YS, Konishi N, Baba M, Kubota T, Yoshimura A, Emi M. (2002) Combined hypermethylation and chromosome loss associated with inactivation of SSI-1/SOCS-1/JAB gene in human hepatocellular carcinomas. *Cancer Lett.* 186, 59-65.
- Naka T, Matsumoto T, Narazaki M, Fujimoto M, Morita Y, Ohsawa Y, Saito H, Nagasawa T, Uchiyama Y, Kishimoto T. (1998) Accelerated apoptosis of lymphocytes by augmented induction of Bax in SSI-1 (STAT-induced STAT inhibitor-1) deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 15577-15582.
- Naka T, Narazaki M, Hirata M, Matsumoto T, Minamoto S, Aono A, Nishimoto N, Kajita T, Taga T, Yoshizaki K, Akira S, Kishimoto T. (1997) Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature.* 387, 924-929.
- Naka T, Tsutsui H, Fujimoto M, Kawazoe Y, Kohzaki H, Morita Y, Nakagawa Y, Narazaki M, Adachi K, Yoshimoto T, Nakanishi K, Kishimoto T. (2001) SOCS-1/SSI-1-Deficient NKT cells participate in severe hepatitis through dysregulated cross-talk inhibition of IFN-gamma and IL-4 signaling in vivo. *Immunity.* 14, 535-545.
- Nakajima T, Kitajima I, Shin H, Takasaki I, Shigeta K, Abeyama K, Yamashita Y, Tokioka T, Soejima Y, Maruyama I. (1994) Involvement of NF-kappa B activation in thrombin-induced human vascular smooth muscle cell proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204, 950-8.
- Narazaki M, Fujimoto M, Matsumoto T, Morita Y, Saito H, Kajita T, Yoshizaki K, Naka T, Kishimoto T. (1998) Three distinct domains of SSI-1/SOCS-1/JAB protein are required for its suppression of interleukin 6 signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 13130-4.
- Nelson KL, Rogers JA, Bowman TL, Jove R, Smithgall TE. (1998) Activation of STAT3 by the c-Fes protein-tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 273, 7072-7077.

- Neubauer H, Cumano A, Muller M, Wu H, Huffstadt U, Pfeffer K. (1998) Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis. *Cell*. 93, 397-409.
- Nguyen KB, Cousens LP, Doughty LA, Pien GC, Durbin JE, Biron CA. (2000) Interferon α/β -mediated inhibition and promotion of interferon γ : STAT1 resolves a paradox. *Nat. Immunol.* 1, 70–76.
- Nicholson SE, De Souza D, Fabri LJ, Corbin J, Willson TA, Zhang JG, Silva A, Asimakis M, Farley A, Nash AD, Metcalf D, Hilton DJ, Nicola NA, Baca M. (2000) Suppressor of cytokine signaling-3 preferentially binds to the SHP-2-binding site on the shared cytokine receptor subunit gp130. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97, 6493-8.
- Nicholson SE, Willson TA, Farley A, Starr R, Zhang JG, Baca M, Alexander WS, Metcalf D, Hilton DJ, Nicola NA. (1999) Mutational analyses of the SOCS proteins suggest a dual domain requirement but distinct mechanisms for inhibition of LIF and IL-6 signal transduction. *EMBO J.* 18, 375-85.
- Nosaka T, van Deursen JM, Tripp RA, Thierfelder WE, Witthuhn BA, McMickle AP, Doherty PC, Grosveld GC, Ihle JN. (1995) Defective lymphoid development in mice lacking Jak3. *Science*. 270, 800-2.
- Nystedt S, Emilsson K, Wahlestedt C, Sundelin J. (1994) Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. 91, 9208-9212.
- Oda Y, Renaux B, Bjorge J, Saifeddine M, Fujita DJ, Hollenberg MD. (1999) *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 77, 606–617.

- Ohtani T, Ishihara K, Atsumi T, Nishida K, Kaneko Y, Miyata T, Itoh S, Narimatsu M, Maeda H, Fukada T, Itoh M, Okano H, Hibi M, Hirano T. (2000) Dissection of signaling cascades through gp130 in vivo: reciprocal roles for STAT3- and SHP2-mediated signals in immune responses. *Immunity*. 12, 95–105.
- Okita M. (1994) Abnormal plasma lysophosphatidic acid level in ovarian cancer patients. *Bulletin of Faculty of Health and Welfare Science, Okayama Prefectural University*. 1, 29–35.
- Omura T, Yoshiyama M, Ishikura F, Kobayashi H, Takeuchi K, Beppu S, Yoshikawa J. (2001) Myocardial ischemia activates the JAK-STAT pathway through angiotensin II signaling in in vivo myocardium of rats. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 33, 307-16.
- Omura T, Yoshiyama M, Takeuchi K, Kim S, Iwao H, Yamagishi H, Toda I, Teragaki M, Akioka K, Yoshikawa J. (2000) Angiotensin blockade inhibits SIF DNA binding activities via STAT3 after myocardial infarction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1, 23-33.
- Opdam FJ, Kamp M, de Bruijn R, Roos E. (2004) Jak kinase activity is required for lymphoma invasion and metastasis. *Oncogene*. 23, 6647-53.
- O’Shea JJ. (1997) Jaks, STATs, cytokine signaling and immunoregulation: Are we there yet? *Immunity*. 7, 1–11.
- O’Shea JJ, Gadina M, Schreiber RD. (2002) Cytokine signaling in 2002 : new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell*. 109, S121-S131.
- O’Shea JJ, Kanno Y, Chen X, Levy DE. (2005) Cell signalling. Stat acetylation –a key facet of cytokine signalling? *Science*. 307, 217-8.
- Osherov NA, Gazit C, Gilon C, Levitzki A. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 11134–11142.

- Ota N, Brett TJ, Murphy TL, Fremont DH, Murphy KM. (2004) N-domain-dependant nonphosphorylated STAT4 dimers required for cytokine-driven activation. *Nat Immunol.* 5, 208-15.
- Ouyang W, Ranganath SH, Weindel K, Bhattacharya D, Murphy TL, Sha WC, Murphy KM. (1998) Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism. *Immunity.* 9, 745–755.
- Parganas E, Wang D, Stravopidis D, Topham D, Marine JC, Teglund S, Vanin EF, Bodner S, Colamonici OR, Van Deursen JM, Gorsveld G, Ihle JN. (1998) Jak2 is essential for signalling through a variety of cytokine receptors. *Cell.* 93, 385–395.
- Park C, Lecomte MJ, Schindler C. (1999) Murine Stat2 is uncharacteristically divergent. *Nucleic Acids Res.* 27, 4191–4199.
- Park C, Li S, Cha E, Schindler C. (2000) Immune response in Stat2 knockout mice. *Immunity.* 13, 795–804.
- Park SY, Saijo K, Takahashi T, Osawa M, Arase H, Hirayama N, Miyake K, Nakauchi H, Shirasawa T, Saito T. (1995) Developmental defects of lymphoid cells in Jak3 kinase-deficient mice. *Immunity.* 3, 771-82.
- Pellegrini S, Dusanter-Fourt I. (1997) The structure, regulation and function of the Janus kinases (JAKs) and the signal transducers and activators of transcription (STATs). *Eur. J. Biochem.* 248, 615-633.
- Pelletier S. (2003a) Régulation de la voie Jak/STAT par les Récepteurs Couplés aux Protéines G: Rôle des petites protéines G de la famille Rho. Thèse de doctorat. Département de pharmacologie/Faculté de Médecine. Université de Montréal.

- Pelletier S, Duhamel F, Coulombe P, Popoff MR, Meloche S. (2003b) Rho family GTPases are required for activation of Jak/STAT signaling by G protein-coupled receptors. *Mol. Cell Biol.* 23, 1316-1333.
- Perona R, Montaner L, Saniger I, Sanchez-Perez R, Bravo R and Lacal JC. (1997) Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins. *Genes Dev.* 11, 463 - 475.
- Pezet A, Favre H, Kelly PA, Edery M. (1999) Inhibition and restoration of prolactin signal transduction by suppressors of cytokine signaling. *J. Biol. Chem.* 274, 24497-502.
- Piazza F, Valens J, Lagasse E, Schindler C. (2000) Myeloid differentiation of FdCP1 cells is dependant on Stat5 processing. *Blood.* 96, 1358-1365.
- Pilz A, Ramsauer K, Heidari H, Leitges M, Kovarik P, Decker T. (2003) Phosphorylation of the Stat1 transactivating domain is required for the response to type I interferons. *EMBO Rep.* 4, 368-73.
- Pitcher JA, Freedman NJ, Lefkowitz RJ. (1998) G protein-coupled receptor kinases. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 653-692.
- Quelle FW, Sato N, Witthuhn BA, Inhorn RC, Eder M, Miyajima A, Griffin JD, Ihle JN. (1994) JAK2 associates with the beta c chain of the receptor for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and its activation requires the membrane-proximal region. *Mol. Cell Biol.* 14, 4335-4341.
- Rahika V, Hee HA J, Jayaraman M, Tsim ST, Dhanasekaran N. (2005) Mitogenic signaling by lysophosphatidic acid (LPA) involves G α (12). *Oncogene.* Epub ahead of print.

- Rane SG, Reddy EP. (1994) JAK3: a novel JAK kinase associated with terminal differentiation of hematopoietic cells. *Oncogene*. 9, 2415-2423.
- Ridley AJ, Hall A. (1992) The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*. 70, 389-99.
- Rodig SJ, Meraz MA, White JM, Lampe PA, Riley JK, Arthur CD, King KL, Sheehan KCF, Yin L, Pennica D, Johnson EM Jr, Schreiber RD. (1998) Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the Jaks in cytokine-induced biologic responses. *Cell*. 93, 373-383
- Rodriguez-Frade JM, Vila-Coro AJ, Martin A, Nieto M, Sanchez-Madrid F, Proudfoot AE, Wells TN, Martinez-A C, Mellado M. (1999) Similarities and differences in RANTES- and (AOP)-RANTES-triggered signals: implications for chemotaxis. *J.Cell Biol.* 144, 755-765.
- Rodriguez-Linares B, Watson SP. (1994) Phosphorylation of JAK2 in thrombin-stimulated human platelets. *FEBS Lett.* 352, 335-338.
- Rottapel R, Ilangumaran S, Neale C, La Rose J, Ho JM, Nguyen MH, Barber D, Dubreuil P, de Sepulveda P. (2002) The tumor suppressor activity of SOCS-1. *Oncogene*. 21, 4351-62.
- Rui L, Mathews LS, Hotta K, Gustafson TA, Carter-Su C. (1997) Identification of SH2-Bbeta as a substrate of the tyrosine kinase JAK2 involved in growth hormone signalling. *Mol. Cell. Biol.* 17, 6633-6644
- Sachdev S, Bruhn L, Sieber H, Pichler A, Melchior F, Grosschedl R. (2001) PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies. *Genes Dev.* 15: 3088-103.

- Sah VP, Seasholtz TM, Sagi SA, Brown JH. (2000) The role of Rho in G protein-coupled receptor signal transduction. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40, 459-89.
- Saharinen P, Silvennoinen O. (2002) The pseudokinase domain is required for suppression of basal activity of Jak2 and Jak3 tyrosine kinases and for cytokine-inducible activation of signal transduction. *J. Biol. Chem.* 277, 47954-63.
- Saharinen P, Vihinen M, Silvennoinen O. (2003) Autoinhibition of Jak2 tyrosine kinase is dependent on specific regions in its pseudokinase domain. *Mol. Biol. Cell.* 14, 1448-59.
- Sahni M, Ambrosetti DC, Mansukhani A, Gertner R, Levy D, Basilico C. (1999) FGF signaling inhibits chondrocyte proliferation and regulates bone development through the STAT-1 pathway. *Genes Dev.* 13, 1361-1366.
- Sahni M, Raz R, Coffin JD, Levy D, Basilico C. (2001) STAT1 mediates the increased apoptosis and reduced chondrocyte proliferation in mice overexpressing FGF2. *Development.* 128, 2119-2129.
- Saito H, Morita Y, Fujimoto M, Narazaki M, Naka T, Kishimoto T. (2000) IFN regulatory factor-1-mediated transcriptional activation of mouse STAT-induced STAT inhibitor-1 gene promoter by IFN-gamma. *J. Immunol.* 164, 5833-5843.
- Sakai I, Kraft AS. (1997) The kinase domain of Jak2 mediates induction of bcl-2 and delays cell death in hematopoietic cells. *J. Biol. Chem.* 272, 12350-12358.
- Sakamoto H, Yasukawa H, Masuhara M, Tanimura S, Sasaki A, Yuge K, Ohtsubo M, Ohtsuka A, Fujita T, Ohta T, Furukawa Y, Iwase S, Yamada H, Yoshimura A. (1998)

A Janus kinase inhibitor, JAB, is an interferon-gamma-inducible gene and confers resistance to interferons. *Blood*. 92, 1668-1676.

Sano S, Itami S, Takeda K, Tarutani M, Yamaguchi Y, Miura H, Yoshikawa K, Akira S, Takeda J. (1999) Keratinocyte-specific ablation of Stat3 exhibits impaired skin remodeling, but does not affect skin morphogenesis. *EMBO J*. 18, 4657-4668.

Sano M, Fukuda K, Kodama H, Takahashi T, Kato T, Hakuno D, Sato T, Manabe T, Tahara S, Ogawa S. (2000) Autocrine/Paracrine secretion of IL-6 family cytokines causes angiotensin II-induced delayed STAT3 activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Mar 24;269(3) :798-802.

Sardar VM, Bautista DL, Fischer DJ, Yokoyama K, Nusser N, Virag T, Wang DA, Baker DL, Tigyi G, Parrill AI. (2002) Molecular basis for lysophosphatidic acid receptor antagonist selectivity. *Biochim. Biophys. Acta*. 1582, 309-17.

Sasagawa T, Suzuki K, Shiota T, Kondo T, Okita M. (1998) The significance of plasma lysophospholipids in patients with renal failure on hemodialysis. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 44, 809-818.

Sasagawa T, Okita M, Murakami J, Kato T, Watanabe A. (1999) Abnormal serum lysophospholipids in multiple myeloma patients. *Lipids* 34, 17-21.

Sasaki A, Yasukawa H, Shouda T, Kitamura T, Dikic I, Yoshimura A. (2000) CIS3/SOCS-3 suppresses erythropoietin (EPO) signaling by binding the EPO receptor and JAK2. *J. Biol. Chem.* 275, 29338-47.

Sasaki A, Yasukawa H, Suzuki A, Kamizono S, Syoda T, Kinjyo I, Sasaki M, Johnston JA, Yoshimura A. (1999) Cytokine-inducible SH2 protein-3 (CIS3/SOCS3) inhibits janus

tyrosine kinase by binding through the N-terminal kinase inhibitory region as well as SH2 domain. *Genes Cells*. 4, 339-51.

Sasse J, Hemmann U, Schwartz C, Schniertshauer U, Heesel B, Landgraf C, Schneider-Mergener J, Heinrich PC, Horn F. (1997) Mutational analysis of acute-phase response factor/Stat3 activation and dimerization. *Mol. Cell. Biol.* 17, 4677-4686.

Schiemann WP, Bartoe JL, Nathanson NM. (1997) Box 3-independent signaling mechanisms are involved in leukemia inhibitory factor receptor alpha- and gp130-mediated stimulation of mitogen-activated protein kinase. Evidence for participation of multiple signaling pathways which converge at Ras. *J. Biol. Chem.* 272, 16631-16636

Schindler C, Brutsaert S. (1999) Interferons as a paradigm for cytokine signal transduction. *Cell. Mol. Life Sci.* 55, 1509-1522.

Schindler C, Strehlow I. (2000) Cytokines and STAT signaling. *Adv. Pharmacol.* 47, 113-174.

Schindler C, Shuai K, Prezioso VR, Darnell JE Jr. (1992) Interferon-dependant tyrosine phosphorylation of a latent cytoplasmic transcription factor. *Science*. 257, 809-813.

Schindler U, Wu P, Rothe M, Brasseur M, McKnight SL. (1995) Components of a STAT recognition code: Evidence for two layers of molecular selectivity. *Immunity*. 2, 689-697.

Schmitz J, Weissenbach M, Haan S, Heinrich PC, Schaper F. (2000) SOCS3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130. *J. Biol. Chem.* 275, 12848-56.

- Scholz M, Vogel JU, Hover G, Kotchetkov R, Cinatl J, Doerr HW, Cinatl J. (2004) Thrombin stimulates IL-6 and IL-8 expression in cytomegalovirus-infected human retinal pigment epithelial cells. *Int. J. Mol. Med.* 13, 327-31.
- Schwaller J, Parganas E, Wang D, Cain D, Aster JC, Williams IR, Lee CK, Gerthner R, Kitamura T, Frantsve J, Anastasiadou E, Loh ML, Levy DE, Ihle JN, Gilliland DG, (2000) Stat5 is essential for the myelo- and lymphoproliferative disease induced by TEL/JAK2. *Mol. Cell.* 6, 693-704.
- Schwarz M et Murphy PM. (2001) Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus G protein-coupled receptor constitutively activates NF-kB and induces proinflammatory cytokine and chemokine production via a C-terminal signaling determinant. *J. Immunol.* 167, 505-13.
- Seasholtz TM, Majumdar M, Kaplan DD, Brown JH. (1999) Rho and Rho kinase mediate thrombin-stimulated vascular smooth muscle cell DNA synthesis and migration. *Circ. Res.* 84, 1186-1193.
- Seki Y, Kai H, Shibata R, Nagata T, Yasukawa H, Yoshimura A, Imaizumi T. (2000) Role of the Jak/STAT pathway in rat carotid artery remodeling after vascular injury. *Circ. Res.* 87, 12-8.
- Servant MJ, Coulombe P, Turgeon B, Meloche S. (2000) Differential regulation of p27Kip1 expression by mitogenic and hypertrophic factors: involvement of transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *J.Cell.Biol.* 148:543-556.
- Sexl V, Piekorz R, Moriggl R, Rohrer J, Brown MP, Bunting KD, Rothhammer K, Roussel MF, Ihle JN. (2000) Stat5a/b contribute to interleukin 7-induced B-cell precursor

expansion, but abl- and bcr/abl-induced transformation are independent of stat5. *Blood*. 96, 2277–2283.

Shen Y, Schlessinger K, Zhu X, Meffre E, Quimby F, Levy DE, Darnell JE Jr. (2004) Essential role of STAT3 in postnatal survival and growth revealed by mice lacking STAT3 serine 727 phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 24, 407-19.

Shibamoto S, Higano K, Takada R, Ito F, Takeichi M, Takada S. (1998) Cytoskeletal reorganization by soluble Wnt-3a protein signalling. *Genes Cells*. 3, 659-670.

Shimoda K, Van Deursen J, Sangster MY, Sarawar SR, Carson RT, Tripp RA, Chu C, Quelle FW, Nosaka T, Vignali DA, Doherty PC, Grosveld G, Paul WE, Ihle JN. (1996) Lack of IL-4 induce Th2 response in IgE class switching mice with disrupted Stat6 gene. *Nature*. 380, 630–633.

Shimoda K, Kato K, Aoki K, Matsuda T, Miyamoto A, Shibamori M, Yamashita M, Numata A, Takase K, Kobayashi S, Shibata S, Asano Y, Gondo H, Sekiguchi K, Nakayama K, Nakayama T, Okamura T, Okamura S, Niho Y, Nakayama K. (2000). Tyk2 plays a restricted role in IFN alpha signaling, although it is required for IL-12 mediated cell function. *Immunity*. 13, 561-71.

Shin H, Kitajima I, Nakajima T, Shao Q, Tokioka T, Takasaki I, Hanyu N, Kubo T, Maruyama I. (1999) Thrombin receptor mediated signals induce expressions of interleukin 6 and granulocyte colony stimulating factor via NF-kappa B activation in synovial fibroblasts. *Ann Rheum Dis*. 58, 55-60.

Shuai K, Horvath CM, Huang LH, Qureshi SA, Cowburn D, Darnell JE Jr. (1994) Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions. *Cell*. 76, 821–828.

- Siebenlist U, Franzoso G, Brown K. (1994) Structure, regulation and function of NF- κ B. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 10, 405-455.
- Simoncic PD, Lee-Loy A, Barber DL, Tremblay ML, McGlade CJ. (2002) The T cell protein tyrosine phosphatase is a negative regulator of janus family kinases 1 and 3. *Curr.Biol.* 12, 446-453.
- Soldaini E, John S, Moro S, Bollenbacher J, Schindler U, Leonard WJ. (2000) DNA binding site selection of dimeric and tetrameric Stat5 proteins reveals a large repertoire of divergent tetrameric Stat5a binding sites. *Mol. Cell. Biol.* 20, 389-401.
- Soldevila G, Licona I, Salgado A, Ramirez M, Chavez R, Garcia-Zepeda E. (2004) Impaired chemokine-induced migration during T-cell development in the absence of Jak3. *Immunology.* 112, 191-200.
- Soriano SF, Hernanz-Falcon P, Rodriguez-Frade JM, De Ana AM, Garzon R, Carvalho-Pinto C, Vila-Coro AJ, Zaballos A, Balomenos D, Martinez-A C, Mellado M. (2002) Functional inactivation of CXC chemokine receptor 4-mediated responses through SOCS3 up-regulation. *J. Exp. Med.* 196, 311-21.
- Soriano SF, Serrano A, Hernanz-Falcon P, Martin de Ana A, Monterrubio M, Martinez C, Rodriguez-Frade JM, Mellado M. (2003) Chemokines integrate JAK/STAT and G-protein pathways during chemotaxis and calcium flux responses. *Eur. J. Immunol.* 33, 1328-33.
- Stahl N, Boulton TG, Farruggella T, Ip NY, Davis S, Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, Barbieri G, Pellegrini S et al. (1994) Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components. *Science.* 263, 92-95.

- Stahl N, Farruggella TJ, Boulton TG, Zhong Z, Darnell JE Jr, Yancopoulos GD. (1995) Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science*. 267, 1349-1353.
- Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. (1998). How cells respond to interferons. *Annu. Rev. Biochem.*, 67, 227-264.
- Starr R, Metcalf D, Elefanty AG, Brysha M, Willson TA, Nicola NA, Hilton DJ, Alexander WS. (1998) Liver degeneration and lymphoid deficiencies in mice lacking suppressor of cytokine signaling-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95, 14395-14399.
- Sui G, Soohoo C, Affar el B, Gay F, Shi Y, Forrester WC, Shi Y. (2002) A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99, 5515-20.
- Sulciner DJ, Irani K, Yu ZX, Ferrans VJ, Goldschmidt- Clermont P and Finkel T. (1996) *rac1* regulates a cytokine-stimulated, redox-dependent pathway necessary for NF- κ B activation. *Mol. Cell Biol.*, 16, 7115 - 7121.
- Suzuki A, Hanada T, Mitsuyama K, Yoshida T, Kamizono S, Hoshino T, Kubo M, Yamashita A, Okabe M, Takeda K, Akira S, Matsumoto S, Toyonaga A, Sata M, Yoshimura A. (2001) CIS3/SOCS3/SSI3 plays a negative regulatory role in STAT3 activation and intestinal inflammation. *J.Exp.Med.* 193, 471-81.
- Suzuki H, Kuendig TM, Furlonger C, Wakeham A, Timms E, Matsuyama T, Schmits R, Simard JLL, Ohashi PS, Griesser H, Tanaguchi T, Paige CJ, Mak TW. (1995) Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor β . *Science*. 268, 1472-1476.

- Suzuki R, Sakamoto H, Yasukawa H, Masuhara M, Wakioka T, Sasaki A, Yuge K, Komiya S, Inoue A, Yoshimura A. (1998) CIS3 and JAB have different regulatory roles in interleukin-6 mediated differentiation and STAT3 activation in M1 leukemia cells. *Oncogene*.17, 2271-2278.
- Takahashi T, Shirasawa T. (1994) Molecular cloning of rat JAK3, a novel member of the JAK family of protein tyrosine kinases. *FEBS Lett.* 342, 124-128.
- Takahashi-Tezuka M, Hibi M, Fujitani Y, Fukada T, Yamaguchi T, Hirano T. (1997) An alternative pathway for STAT activation that is mediated by the direct interaction between JAK and STAT. *Oncogene* 14, 2273-2282.
- Takai, Y., Sasaki, T. and Matozaki, T. (2001) Small GTP-binding proteins. *Physiol. Rev.* 81, 153–208.
- Takeda K, Clausen BE, Kaisho T, Tsujimura T, Terada N, Forster I, Akira S. (1999) Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity.* 10, 39–49.
- Takeda K, Kaisho T, Yoshida N, Takeda J, Kishimoto T, Akira S. (1998) Stat3 activation is responsible for IL-6-dependent T cell proliferation through preventing apoptosis: generation and characterization of T cell-specific Stat3-deficient mice. *J. Immunol.* 161, 4652–4660.
- Takeda K, Noguchi K, Shi W, Tanaka T, Matsumoto M, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S. (1997) Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 3801–3804.

- Takeda K, Tanaka T, Shi W, Matsumoto M, Minami M, Kashiwamura S, Nakanishi K, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S. (1996) Essential role of Stat6 in IL-4 signaling. *Nature*. 380, 627–630.
- Takeshita T, Arita T, Higuchi M, Asao H, Endo K, Kuroda H, Tanaka N, Murata K, Ishii N, Sugamura K (1997) STAM, signal transducing adaptor molecule, is associated with Janus kinases and involved in signaling for cell growth and c-myc induction. *Immunity*. 6, 449-457.
- Teglund S, McKay C, Schuetz E, VanDeursen JM, Stravopodis D, Wang D, Brown M, Bodner S, Grosveld G, Ihle JN. (1998) Stat5a and Stat5b proteins have essential roles and non essential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell*. 93, 841–850.
- ten Hoeve J, de Jesus Ibarra-Sanchez M, Fu Y, Zhu W, Tremblay M, David M, Shuai K. (2002) Identification of a nuclear Stat1 protein tyrosine phosphatase. *Mol. Cell. Biol*. 22, 5662-5668.
- Terabe M, Matsui S, Noben-Trauth N, Chen H, Watson C, Donaldson DD, Carbone DP, Paul WE, Berzofsky JA. (2000) NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway. *Nat. Immunol*. 1, 515-520.
- Terstegen L, Gatsios P, Bode JG, Schaper F, Heinrich PC, Graeve L. (2000) The inhibition of interleukin-6-dependant STAT activation by mitogen-activated protein kinases depends on tyrosine 759 in the cytoplasmic tail of glycoprotein 130. *J. Biol. Chem*. 275, 188810-7.
- Tetsu C, McCormick F. (1999) Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature*. 398, 422-426.

- Thierfelder WE, Van Deursen JM, Yamamoto K, Tripp RA, Sarawar SR, Carson RT, Sangster MY, Vignali DA, Doherty PC, Grosveld G, Ihle JN. (1996) Requirement for Stat4 in interleukin-12 mediated response of natural killer and T cells. *Nature*. 382, 171–174.
- Thomis DC, Gurniak CB, Tivol E, Sharpe AH, Berg LJ. (1995) Defects in B lymphocyte maturation and T lymphocyte activation in mice lacking Jak3. *Science*. 270, 794-7.
- Tiruppathi C, Yan W, Sandoval R, Naqvi T, Pronin AN, Benovic JL, Malik AB. (2000) G protein-coupled receptor kinase-5 regulates thrombin-activated signaling in endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97, 7440-7445.
- Torsino MA, Carvalheira JB, Calegari VC, Bezerra RM, Saad MJ, Gontijo JA, Velloso LA. (2004) Angiotensin II (AngII) induces the expression of suppressor of cytokine signaling (SOCS)-3 in rat hypothalamus – a mechanism for desensitization of AngII signaling. *J. Endocrinol*. 181, 117-28.
- Udy GB, Towers RP, Snell RG, Wilkins RJ, Park SH, Ram PA, Waxman DJ, Davey HW. (1997) Requirement of Stat5b for sexual dimorphism of body growth rates and liver gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94, 7239–7244.
- Ungureanu D, Saharinen P, Junttila I, Hilton DJ, Silvennoinen O. (2002) Regulation of Jak2 through the ubiquitin-proteasome pathway involves phosphorylation of Jak2 on Y1007 and interaction with SOCS-1. *Mol. Cell. Biol*. 22, 3316-26.
- Ungureanu D, Vanhatupa S, Gronholm J, Palvimo JJ, Silvennoinen O. (2005) SUMO-1 conjugation selectively modulates STAT1-mediated gene responses. *Blood*. [Epub ahead of print].

- van Corven EJ, Hordijk PL, Medema RH, Bos JL, Moolenaar WH. (1993) Pertussis toxin-sensitive activation of p21ras by G protein-coupled receptor agonists in fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 257-61.
- van Corven EJ, Groenink A, Jalink K, Eichholtz T, Moolenaar WH. (1989) Lysophosphatidate-induced cell proliferation: identification and dissection of signaling pathways mediated by G proteins. *Cell.* 59, 45-54.
- Van Leeuwen FN, Giepmans BNG, van Meeteren LA, Moolenaar WH. (2003) Lysophosphatidic acid: mitogen and motility factor. *Biochem. Soc. Trans.* 31, 1209-12.
- Van Leeuwen FN, Olivo C, Grivell S, Giepmans BN, Collard JG, Moolenaar WH. (2003) Rac activation by lysophosphatidic acid LPA1 receptors through the guanine nucleotide exchange factor Tiam1. *J. Biol. Chem.* 278, 400-6.
- Varinou L, Ramsauer K, Karaghiosoff M, Kolbe T, Pfeffer K, Muller M, Decker T. (2003) Phosphorylation of the Stat1 transactivation domain is required for full-fledged IFN-gamma-dependent innate immunity. *Immunity.* 19, 793-802.
- Velazquez L, Mogensen KE, Barbieri G, Fellous M, Uze G, Pellegrini S. (1995) Distinct domains of the protein tyrosine kinase tyk2 required for binding of interferon-alpha/beta and for signal transduction. *J. Biol. Chem.* 270, 3327-3334.
- Vila-Coro AJ, Rodriguez-Frade JM, Martin DA, Moreno-Ortiz MC, Martinez A, Mellado M. (1999) The chemokine SDF-1alpha triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway. *FASEB J.* 13, 1699-1710.
- Vinkemeier U, Moarefi I, Darnell JE Jr, Kuriyan J. (1998) Structure of the amino-terminal protein interaction domain of STAT-4. *Science.* 279, 1048-1052.

- Visconti R, Gadina M, Chiariello M, Chen EH, Stancato LF, Gutkind JS, O'Shea JJ. (2000) Importance of the MKK6/p38 pathway for interleukin-12-induced STAT4 serine phosphorylation and transcriptional activity. *Blood*. 96, 1844-1852.
- von Freeden-Jeffry U, Vieira P, Lucian LA, McNeil T, Burdach SE, Murray R. (1995) Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J. Exp. Med.* 181, 1519–1526.
- Vu TK, Hung DT, Wheaton VI and Coughlin SR. (1991) Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*. 64, 1057–1068.
- Walker TR, Moore SM, Lawson MF, Panettieri RA Jr, Chilvers ER (1998) Platelet-derived growth factor-BB and thrombin activate phosphoinositide 3-kinase and protein kinase B: role in mediating airway smooth muscle proliferation. *Mol. Pharmacol.* 54, 1007-1015.
- Wang DA, Lorincz Z, Bautista DL, Liliom K, Tigyi G, Parrill AL. (2001) A single amino acid determines lysophospholipid specificity of the S1P1 (EDG1) and LPA1 (EDG2) phospholipid growth factor receptors. *J. Biol. Chem.* 276, 49213-20.
- Wang R, Cherukuri P, Luo J. (2005) Activation of Stat3 Sequence-specific DNA Binding and Transcription by p300/CREB-binding Protein-mediated Acetylation. *J. Biol. Chem.* 180, 11528-11534.
- Ware CB, Horowitz MC, Renshaw BR, Hunt JS, Liggitt D, Koblar SA, Gliniak BC, McKenna HJ, Papayannopoulou T, Thoma B, Cheng L, Donovan PJ, Peschon JJ, Bartlett PF, Willis CR, Wright BD, Carpenter MK, Davison BL, Gearing DP. (1995) Targeted disruption of the low-affinity leukemia inhibitory factor receptor gene

causes placental, skeletal, neural and metabolic defects and results in perinatal death. *Development*. 121, 1283–1299.

Weiner JA, Fukushima N, Contos JJ, Scherer SS, Chun J. (2001) Regulation of Schwann cell morphology and adhesion by receptor-mediated lysophosphatidic acid signaling. *J. Neurosci.* 21, 7069–78.

Wen R, Wang D, McKay C, Bunting KD, Marine JC, Vanin EF, Zambetti GP, Korsmeyer SJ, Ihle JN, Cleveland JL. (2001) Jak3 selectively regulates Bax and Bcl-2 expression to promote T-cell development. *Mol. Cell. Biol.* 21, 678-89.

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

Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL. (1999) Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol. Rev.* 79, 143-180.

Wilks AF, Harpur AG, Kurban RR, Ralph SJ, Zurcher G, Ziemiecki A. (1991) Two novel protein-tyrosine kinases, each with a second phosphotransferase-related catalytic domain, define a new class of protein kinase. *Mol. Cell Biol.* 11, 2057-2065.

Wodarz A, Nusse R. (1998) Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14, 59-88

Wong M, Uddin S, Majchrzak B, Huynh T, Proudfoot AE, Plataniias LC, Fish EN. (2001) Rantes activates Jak2 and Jak3 to regulate engagement of multiple signaling pathways in T cells. *J. Biol. Chem.* 276, 11427-11431.

- Wu H, Liu X, Jaenisch R, Lodish HF. (1995) Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell*. 83, 59–67.
- Wurster AL, Tanaka T, Grusby MJ. (2000) The biology of Stat4 and Stat6. *Oncogene*. 19, 2577–2584.
- Xia K, Mukhopadhyay NK, Inhorn RC, Barber DL, Rose PE, Lee RS, Narsimhan RP, D'Andrea AD, Griffin JD, Roberts TM. (1996) The cytokine-activated tyrosine kinase JAK2 activates Raf-1 in a p21ras-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93, 11681-11686.
- Xu Y, Shen Z, Wiper DW, Wu M, Morton RE, Elson P, Kennedy AW, Belinson J, Markman M, Casey G. (1998) Lysophosphatidic acid as a potential biomarker for ovarian and other gynecologic cancers. *JAMA*. 280, 719–723.
- Yamamoto T, Sekine Y, Kashima K, Kubota A, Sato N, Aoki N, Matsuda T. (2002) The nuclear isoform of protein-tyrosine phosphatase TC-PTP regulates interleukin-6-mediated signaling pathway through STAT3 dephosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297, 811-817.
- Yan H, Piazza F, Krishnan K, Pine R, Krolewski JJ. (1998) Definition of the interferon-alpha receptor-binding domain on the TYK2 kinase. *J. Biol. Chem*. 273, 4046–4051.
- Yang MS, Lee J, Ji KA, Min KJ, Lee MA, Jou I, Joe E. (2004) Thrombin induces suppressor of cytokine signaling 3 expression in brain microglia via protein kinase Cdelta activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 317, 811-6.
- Yasukawa H, Misawa H, Sakamoto H, Masuhara M, Sasaki A, Wakioka T, Ohtsuka S, Imaizumi T, Matsuda T, Ihle JN, Yoshimura A. (1999) The JAK-binding protein JAB

- inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *EMBO J.* 18, 1309-20.
- Ye RD. (2001) Regulation of nuclear factor kappaB activation by G protein—coupled receptors. *J. Leukoc. Biol.* 70, 839-48.
- Yeh TC, Dondi E, Uze G, Pellegrini S. (2000) A dual role for the kinase-like domain of the tyrosine kinase Tyk2 in interferon-alpha signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 8991–8996.
- Yetter A, Uddin S, Krolewski JJ, Jiao H, Yi T, Plataniias LC. (1995) Association of the interferon-dependent tyrosine kinase Tyk-2 with the hematopoietic cell phosphatase. *J. Biol. Chem.* 270, 18179-18182.
- Yin T, Shen R, Feng GS, Yang YC. (1997) Molecular characterization of specific interactions between SHP-2 phosphatase and JAK tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* 272, 1032-1037.
- Yi T, Mui AL, Krystal G, Ihle JN. (1993) Hematopoietic cell phosphatase associates with the IL-3 receptor b chain and down-regulates IL-3 induced tyrosine phosphorylation and mitogenesis. *Mol. Cell.Biol.* 13, 7577–7586.
- Yokogami K, Wakisaka S, Avruch J, Reeves SA. (2000) Serine phosphorylation and maximal activation of STAT3 during CNTF signaling is mediated by the rapamycin target mTOR. *Curr. Biol.* 10, 47-50.
- Yoo JY, Huso DL, Nathans D, Desiderio S. (2002) Specific ablation of Stat3beta distorts the pattern of Stat3-responsive gene expression and impairs recovery from endotoxic shock. *Cell.* 108, 331-44.

- Yoshimura A, Ohkubo T, Kiguchi T, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Hara T, Miyajima A. (1995) A novel cytokine-inducible gene CIS encodes an SH2-containing protein that binds to tyrosinephosphorylated interleukin 3 and erythropoietin receptors. *EMBO J.* 14, 2816-2826.
- You M, Yu DH, Feng GS. (1999) Shp-2 tyrosine phosphatase functions as a negative regulator of the interferon-stimulated Jak/STAT pathway. *Mol. Cell. Biol.* 19, 2416-24.
- Yuan ZL, Guan YJ, Chatterjee D, Chin YE. (2005) Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue. *Science.* 307, 269-73.
- Yun MS, Kim SE, Jeon SH, Lee JS, Choi KY. (2005) Both ERK and Wnt/beta-catenin pathways are involved in Wnt3a-induced proliferation. *J. Cell. Sci.* 118, 313-322.
- Zabolotny JM, Bence-Hanulec KK, Stricker-Krongrad A, Haj F, Wang Y, Minokoshi Y, Kim YB, Elmquist JK, Tartaglia LA, Kahn BB, Neel BG. (2002) PTP1B regulates leptin signal transduction in vivo. *Dev Cell.* 4, 489-95.
- Zahradka P, Werner JP, Buhay S, Litchie B, Helwer G, Thomas S. (2002) NF-kB activation is essential for angiotensin II-dependant proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 34, 1609-1621
- Zhang JG, Farley A, Nicholson SE, Willson TA, Zugaro LM, Impson RJ, Cary D, Richardson R, Hausmann G, Kile BJ, Kent SBH, Alexander WS, Metcalf D, Hilton DJ, Nicola NA, Baca M. (1999) The conserved SOCS box motif in suppressors of cytokine signaling binds to elongins B and C and may couple bound proteins to proteasomal degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96, 2071-2076.

- Zhang T, Kee WH, Seow KT, Fung W, Cao X. (2000) The coiledcoil domain of Stat3 is essential for its SH2 domain-mediated receptor binding and subsequent activation induced by epidermal growth factor and interleukin-6. *Mol. Cell. Biol.* 20, 7132–7139.
- Zhang XF, Wang JF, Matczak E, Proper JA, Gropman JE. (2001) Janus kinase 2 is involved in stromal cell-derived factor-1 α -induced tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins and migration of hematopoietic progenitor cells. *Blood.* 97, 3342-8.
- Zhong M, Henriksen MA, Takeuchi K, Schaefer O, Liu B, Hoeve JT, Ren Z, Mao X, Chen X, Shuai K, Darnell JE Jr. (2005) Implications of an antiparallel dimeric structure of nonphosphorylated STAT1 for the activation-inactivation cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102, 3966-71.
- Zhu MH, John S, Berg M, Leonard WJ. (1999) Functional association of Nmi with Stat5 and Stat1 in IL-2 and IFN γ mediated signaling. *Cell.* 96, 121–130.
- Zong CS, Chan J, Levy DE, Horvath C, Sadowski HB, Wang LH. (2000) Mechanism of STAT3 activation by insulin-like growth factor. *J. Biol. Chem.* 275, 15099-105.

Annexe 1.

Liste de publications

1. Pelletier S., **Duhamel F.**, Coulombe P., Popoff MR., Meloche S. (2003). Rho GTPases are required for activation of Jak/STAT signaling by G protein-coupled receptors. *Mol. Cell. Biol.* Feb; 23(4):1316-33.

- Cet article a été sélectionné et recommandé par la "Faculty of 1,000".

Annexe 2.

Résumés de communication

1. Stéphane Pelletier, François Duhamel, Michel R.Popoff and Sylvain Meloche. Regulation of Jak/STAT signalling by GPCR through Small GTPases. Great Lakes GPCR retreat and Club des récepteurs à sept domaines transmembranaires, Bromont, Québec (October 26th to 28th 2001).
2. Stéphane Pelletier, François Duhamel, Michel R.Popoff and Sylvain Meloche. Regulation of Jak/STAT signalling by GPCRs through Rho GTPases. EB 2002 April 19th to April 24th 2001, New Orleans, LA, USA. FASEB J 16:A578, Abstract #448.9.
3. Stéphane Pelletier, François Duhamel, Michel R.Popoff and Sylvain Meloche. Les petites protéines G de la famille Rho sont essentielles à l'activation de la voie Jak/STAT par les Récepteurs couplés aux protéines G. Journée Gabriel L. Plaa, May 10th 2002, Montréal, Québec.
4. Stéphane Pelletier, François Duhamel, Philippe Coulombe, Michel R.Popoff and Sylvain Meloche. Regulation of Jak/STAT signalling by GPCRs through Rho GTPases. Research Day, IRCM, May 20, 2002.
5. Stéphane Pelletier, François Duhamel, Philippe Coulombe, Michel R.Popoff and Sylvain Meloche. Rho GTPases are required for activation of the Jak/STAT signalling pathway by G Protein-Coupled Receptor. Great Lakes GPCR retreat and Club des récepteurs à sept domaines transmembranaires du Québec. October 18th to 20th 2002.

6. François Duhamel, Sylvain Meloche. Caractérisation du rôle physiologique de la voie de signalisation Jak/STAT dans la réponse mitogénique des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR). Journée Gabriel L. Plaa, 14 Mai 2004, Montréal, Québec.
7. François Duhamel, Sylvain Meloche. Caractérisation du rôle de la voie de signalisation Jak/STAT dans la réponse mitogénique des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR). Journée de la recherche de l'IRIC, 30-31 octobre 2004, St-Sauveur, Québec.
8. François Duhamel, Sylvain Meloche. Caractérisation du rôle de la voie de signalisation Jak/STAT dans la réponse mitogénique des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR). Club de Recherche Clinique du Québec (CRCQ), 23-25 septembre 2004, Mont-Ste-Anne, Québec (Résumé seulement).
9. François Duhamel, Sylvain Meloche. Caractérisation du rôle de la voie de signalisation Jak/STAT dans la réponse mitogénique des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR). Great Lakes GPCR retreat and Club des récepteurs à sept domaines transmembranaires du Québec, 5-7 novembre 2004, Bromont, Québec.
10. François Duhamel, Sylvain Meloche. Caractérisation du rôle de la voie de signalisation Jak/STAT dans la réponse mitogénique des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR). Journée Gabriel L. Plaa, 20 mai 2005, Montréal, Québec.

Annexe 3.

Prix, Mentions, Bourses

Bourse U. de Montréal. / F.E.S.	2002
M.Sc. Scholarship	
Bourse U. de Montréal. / F.E.S.	2003
M.Sc. Scholarship	
Bourse U. de Montréal. / F.E.S.	2004
M.Sc. Scholarship	
Représentant sélectionné par le département de pharmacologie pour le concours de Bourse d'Excellence de la FES de l'U. de Montréal.	2004
Ph.D. Scholarship	
Bourse d'Études Supérieures du Canada des IRSC	2005-
Ph.D. Scholarship	

