

**UNIVERSITE PARIS 13**  
U.F.R. LEONARD DE VINCI  
SANTÉ - MÉDECINE - BIOLOGIE HUMAINE

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

**THESE DE SCIENCE**

Pour l'obtention du grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS 13**  
**Discipline: Biologie cellulaire et moléculaire**

Présentée et soutenue publiquement par

**Elodie Lemadre**

Le 3 juillet 2014

**Titre:**

**Nouveaux rôles anti-tumoraux de STAT1:  
Expression des immunoglobulines et réparation de l'ADN**

Directeur de thèse: Dr. Nadine Varin Blank  
Co-directeur de thèse: Dr. Emmanuelle Fabre

**Jury**

Pr. Laurent Zelec, Président  
Dr. Laura Corbo, Rapporteur  
Pr. Bertrand Arnulf, Rapporteur  
Dr. Fabrice Gouilleux, Examineur  
Dr. Nadine Varin Blank, Directeur  
Dr. Emmanuelle Fabre, Co-directeur

## Remerciements

Je tiens à remercier tous les membres du jury de thèse:

Le président de séance, le Pr **Laurent Zelec**,

Le Dr **Laura Corbo** et le Pr **Bertrand Arnulf**, d'avoir accepté de rapporter ma thèse.

Le Dr **Fabrice Gouilleux**, d'avoir accepté d'examiner ma thèse.

Je tiens à remercier en premier lieu ma co-directrice de thèse le Dr **Emmanuelle Fabre** pour le soutien qu'elle m'a témoigné pendant tant d'années, sa patience et son encouragement. Elle a été l'encadrante de mon stage de M2 et la directrice de thèse de mon doctorat. Durant les cinq années de formation, elle m'a transmis sa rigueur, son savoir faire, ses compétences et qualités scientifiques qui m'ont aidé à gérer mon projet de thèse.

Je tiens particulièrement à remercier le Dr **Nadine Varin Blank**, ma directrice de thèse, de m'avoir accueillie dans son laboratoire, de m'avoir toujours consacré du temps et d'avoir cru en moi. Je la remercie sincèrement pour son implication, son soutien et son intérêt pour moi et mon travail. Il est rare de trouver une personne qui puisse autant s'adapter à chaque profil de ses membres de l'unité et ayant un souci réel de réussite envers les doctorants mais également les autres membres. Elle s'est toujours rendue disponible pour l'avancement des projets de chacun. Pour toutes ses qualités, je la remercie.

Je tiens à remercier le Pr **Remi Fagard**, sans qui cette thèse n'aurait pas été possible. Il a été présent dans la majorité des moments de ma thèse et toujours pleins de bons conseils. Merci pour la confiance que vous avez mis en moi. Vous avez été le souffle qui m'a inspiré pour cette thèse. Tout a commencé avec lui et je l'en remercie. Merci pour tout ce que vous m'avez apporté.

Un grand merci au Pr **Olivier Oudar**, au Pr **Didier Lutomski**, au Dr **Dominique Briane**, au Pr **Natasha Bessis** qui ont contribué à développer mon intérêt et ma curiosité scientifique ainsi qu'un goût très prononcé pour la biologie et m'ont donné l'envie de poursuivre dans cette voie.

Un grand merci à tous les membres de l'unité U978:

D'abord le Pr **Dominique Ledoux**, mon professeur de biologie moléculaire, qui m'a guidé dans tous mes choix universitaires et sans qui toute cette aventure n'aurait pas été possible. Il est LE professeur qui m'a donné envie d'aimer la science et d'avoir développé une passion pour celle-ci.

Je tiens à remercier le Pr **Pierre Olivier Schischmanoff** et le Dr **Denis Lesage** pour le soutien, l'encouragement et l'aide qu'ils m'ont apporté. Nous avons tous les trois collaborés ensemble et échanger des idées sur un projet scientifique. Nous avons fait une sacrée équipe!!!!

Je tiens à remercier le Dr **Bela Papp** qui a été de très bons conseils durant toutes nos longues conversations.

Un grand merci à **Claude**. Tu as été une grande confidente. Merci pour ta bonne humeur qui enjolivait mes journées.

Merci aux autres membres de l'unité: le Dr **Christine Leroy**, Dr **Lionel Guittat**, le Dr **Laura Velazquez** et le Dr **Elisabetta Dondi** pour leurs conseils avisés.

**Maude**, toi, mon amie, ma binôme, ma confidente. Un merci ne serait pas assez fort pour te témoigner et te démontrer à quel point tu es quelqu'un d'exceptionnel. J'ai eu la chance immense de pouvoir te côtoyer pendant tant d'années et ce, même pendant les moments difficiles qui, nous le savons toutes les deux, ont été nombreux. Je sais que je peux compter sur toi les yeux fermés. Notre amitié est indestructible et même si à un moment tu es loin de mes yeux, tu ne seras jamais loin de mon cœur.

**Stéphanie**, merci à toi pour les supers moments passés. Tu as été mon rayon de soleil qui illuminait mes journées. Merci pour ta gentillesse et ta bonne humeur.

L'aventure n'aurait pas été super sans tous les doctorants du laboratoire, Ils sont pour moi  
comme une deuxième famille:

Merci à **Inès** pour toutes ses années passées ensemble, pour ton amitié, ta gentillesse et ton soutien.

Merci à **Laurent** d'avoir été présents pour moi pendant plusieurs années et pour ton amitié.

Merci à **Stéphane** pour ta zénitude, tes conseils généreux et pour ton soutien.

Merci à **Hager** et à **Lyra** pour leur gentillesse.

Merci à **Vanessa** pour tes moments d'humour et tes taquineries qui ont été une source de joie.

Merci aux nouveaux doctorants qui prendront la relève, je pense à **Maximilien**, à **Anouchka** et à **Hervé**, qui montrent déjà un bon esprit d'équipe et une bonne cohésion dans le groupe des doctorants.

Merci à **Hanan** avec qui j'ai beaucoup parlé et qui a été de bons conseils.

Je tiens à remercier les différentes sources de financement qui m'ont permis d'aboutir à la fin de mon projet de thèse:

- La bourse MENRT (3 ans) délivrée par l'Ecole Doctorale Galilée de l'Université Paris XIII que je remercie.
- Un financement de 2 mois délivré par le LABEX que je remercie également.

Un grand merci à tous les membres de l'unité de biochimie et d'hématologie de l'hôpital Avicenne:

Merci aux membres de l'unité d'hématologie: le Pr **Florence Cimbalista**, le Dr **Fanny Baran-Marszak** et le Dr **Rémi Letestu**.

**Claudine**, merci pour ton aide et tes conseils. Je ne t'oublierai pas.

Merci beaucoup aux techniciennes du laboratoire de Biochimie et d'hématologie de l'hôpital d'Avicenne pour leur gentillesse, leurs disponibilités à tout moment et leur temps consacré à m'aider dans ma recherche.

Je remercie mes anciens camarades de Fac notamment **Mathieu Ribon**, **Carole Yacinthe** et **Ingrid Gomez** avec qui je garde contact et qui sont mes amis. Nous avons passé d'excellents moments ensemble. Ils ont toujours été là pour moi et ont été la source de motivation supplémentaire à mon projet de thèse.

Un merci tout particulier à toute ma famille et mes amis qui m'ont soutenu et ont montré des élans de générosité durant toutes les épreuves de ma vie.

# TABLE DES MATIERES

<b>GLOSSAIRE.....</b>	<b>7</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>10</b>
<b>Tableaux.....</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>12</b>
<b>CHAPITRE I. LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION STAT1 .....</b>	<b>13</b>
<b>1.1 STRUCTURE ET DOMAINES DE STAT1 .....</b>	<b>13</b>
1.1.1 MONOMERE DE STAT1 ET SES DOMAINES.....	13
1.1.2 DIMERE DE STAT1.....	16
1.1.3 OLIGOMERES DE STAT1.....	18
<b>1.2 VOIES D'ACTIVATION DE STAT1 .....</b>	<b>18</b>
1.2.1 VOIES CANONIQUES.....	19
1.2.1.1 ACTIVATION DES RECEPTEURS A L'IFN $\gamma$ (RECEPTEURS DE TYPE II).....	19
1.2.1.2 ACTIVATION DES RECEPTEURS A L'IFN $\alpha/\beta$ (RECEPTEURS DE TYPE I).....	19
1.2.2 VOIES ALTERNATIVES.....	20
<b>1.3 MECANISMES D'ACTION DE STAT1 .....</b>	<b>21</b>
1.3.1 RECONNAISSANCE DE SEQUENCES D'ADN CONSENSUS.....	21
1.3.1.1 LES SEQUENCES GAS.....	22
1.3.1.2 LES SEQUENCES ISRE.....	23
1.3.2 INTERACTION AVEC DES CO-ACTIVATEURS DE LA MACHINERIE TRANSCRIPTIONNELLE.....	24
1.3.3 PARTICIPATION A DES COMPLEXES TRANSCRIPTIONNELS.....	24
<b>1.4 NAVETTE NUCLEO-CYTOPLASMIQUE DE STAT1.....</b>	<b>25</b>
1.4.1 L'IMPORT NUCLEAIRE DE STAT1.....	25
1.4.2 L'EXPORT NUCLEAIRE DE STAT1.....	26
<b>1.5 INHIBITIONS DE L'ACTIVITE DE STAT1 .....</b>	<b>27</b>
1.5.1 MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DE STAT1.....	28
1.5.1.1 DEPHOSPHORYLATION.....	28
1.5.1.2 UBIQUITINYLATION.....	29
1.5.1.3 SUMOYLATION.....	30
1.5.1.4 ACETYLATION.....	31
1.5.2 INHIBITION DU RECEPTEUR.....	31
1.5.2.1 SOCS.....	31

1.5.2.2	DEPHOSPHORYLATION DES JAKs .....	32
<b>CHAPITRE II. ROLES DE STAT1 .....</b>		<b>33</b>
<b>2.1</b>	<b>DEFICIENCES EN STAT1 .....</b>	<b>33</b>
<b>2.2</b>	<b>ROLE DE STAT1 DANS L'IMMUNITE .....</b>	<b>34</b>
2.2.1	ROLE DE STAT1 DANS L'IMMUNITE INNEE .....	34
2.2.1.1	ACTIVITE ANTIVIRALE.....	35
2.2.1.2	ACTIVITE ANTIBACTERIENNE .....	37
2.2.1.3	MODULATION DE LA PRESENTATION ANTIGENIQUE .....	37
2.2.1.4	MODULATION DE LA DIFFERENCIATION DES LYMPHOCYTES T.....	38
2.2.2	ROLE DE STAT1 DANS L'IMMUNITE ADAPTATIVE.....	39
2.2.2.1	EXPRESSION DES IMMUNOGLOBULINES PAR LES LB MATURES.....	40
2.2.2.2	ROLE DE STAT1 DANS L'IMMUNITÉ ADAPTATIVE .....	46
<b>2.3</b>	<b>ROLE PRO APOPTOTIQUE .....</b>	<b>47</b>
2.3.1	ACTIVITE TANSSCRIPTIONNELLE PRO-APOPTOTIQUE .....	47
2.3.1.1	LIGANDS ET RECEPTEURS DE MORT: FAS/FASL, TRAIL/TRAILR.....	47
2.3.1.2	LES CASPASES.....	48
2.3.1.3	iNOS.....	49
2.3.1.4	Bcl-XL, Bcl2 .....	49
2.3.2	AUTRES ACTIVITES PRO-APOPTOTIQUES .....	49
2.3.2.1	INTERACTION AVEC TRADD.....	50
2.3.2.2	LA p53.....	51
2.3.2.3	NF-κB.....	51
<b>2.4</b>	<b>ROLE ANTI-PROLIFERATIF DE STAT1.....</b>	<b>52</b>
<b>2.5</b>	<b>ROLE ANTI-TUMORAL.....</b>	<b>53</b>
2.5.1	ACTION ANTI-TUMORALE DE STAT1 .....	54
2.5.2	ACTIONS ANTI-ANGIOGENIQUE ET D'INHIBITION DES METASTASES.....	54
2.5.3	ROLE DE STAT1 DANS LA REPONSE AUX AGENTS GENOTOXIQUES.....	55
2.5.3.1	LES AGENTS ALKYLANTS GENOTOXIQUES.....	57
2.5.3.2	LES SYSTEMES DE REPARATION DE L'ADN.....	59
2.5.3.3	IMPLICATIONS DE STAT1 DANS LA SENSIBILITE AUX AGENTS GENOTOXIQUES.....	63
<b>CHAPITRE III PROBLEMATIQUE DE LA THESE.....</b>		<b>67</b>
<b>CHAPITRE IV RESULTATS.....</b>		<b>69</b>
<b>4.1</b>	<b>ROLE DE STAT1 DANS L'IMMUNITE ADAPTATIVE: MODULATION DE L'EXPRESSION DE BLIMP1 ET DES IMMUNOGLOBULINES .....</b>	<b>70</b>

4.1.1 INTRODUCTION .....	70
4.1.2 RESULTATS .....	71
4.1.3 ARTICLE 1: STAT1 INTERFERENCE ON STAT3 REGULATION OF BLIMP1 AND PLASMA CELL DIFFRENCIATION. ....	73
4.1.4 RESULTATS COMPLEMENTAIRES.....	100
4.1.4.1 CARACTERISATION DE LA LIGNEE SD2 .....	100
4.1.4.2 DECLENCHEMENT DE LA COMMUTATION DE CLASSE DES CELLULES SD2 PAR LA TRANSFECTION INDEPENDAMMENT DE STAT1.....	101
<b>4.2 STAT1 INDUIT UNE REPOSE VERS LA SURVIE CELLULAIRE VIA C-ABL ET P53.....</b>	<b>105</b>
4.2.1 INTRODUCTION .....	105
4.2.2 RESULTATS .....	106
4.2.3 ARTICLE 2: STAT1 ORIENTATES CELLULAR RESPONSE TO ALKYLATING AGENT MNNG. ....	108
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>140</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>148</b>

# GLOSSAIRE

<b>aa:</b>	acide aminé
<b>AID:</b>	<i>Activation-Induced cytidine Deaminase</i>
<b>ATM:</b>	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
<b>ATR:</b>	<i>Ataxia-telangiectasia and Rad3-related</i>
<b>Bax:</b>	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
<b>BCL6:</b>	<i>B cell lymphoma 6</i>
<b>BCR:</b>	<i>B Cell Receptor</i> ou récepteur des cellules B
<b>BER:</b>	<i>Base Excision Repair</i>
<b>BLIMP1:</b>	<i>B lymphocyte Induced Maturation Protein 1</i>
<b>CIITA:</b>	<i>Class II of MHC TransActivating protein</i>
<b>CBP:</b>	<i>(CREB)-Binding Protein</i>
<b>CC:</b>	<i>Coiled-Coil domain</i> ou domaine super-enroulé
<b>CDK:</b>	<i>Cyclin-Dependent Kinases</i>
<b>CG:</b>	Centre germinatif
<b>CKI:</b>	<i>CDK Inhibitors</i>
<b>CMH:</b>	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
<b>CREB:</b>	<i>C-AMP Response Element Binding protein</i>
<b>CRM-1:</b>	<i>Chromosome Region Maintenance-1</i>
<b>CSR:</b>	Commutation de classe
<b>CXCL:</b>	<i>CXC (C-X-C motif) Chemokine Ligand</i>
<b>CXCR3:</b>	<i>CXC (C-X-C motif) Chemokine Receptor 3</i>
<b>DBD:</b>	<i>DNA Binding Domain</i> ou domaine de liaison à l'ADN
<b>DNA-PK:</b>	<i>DNA-dependent Protein kinase</i>
<b>GAS:</b>	<i>Gamma-interferon Activated Sequence</i>
<b>G-CSF:</b>	<i>Granulocyte Colony Stimulating Factor</i>
<b>HAT:</b>	<i>Histone AcetylTransferases</i>
<b>HDAC:</b>	<i>Histone DeAcetylases</i> ou histones désacétylases
<b>HR:</b>	<i>Homologous Recombination</i> ou recombinaison homologue
<b>EGF:</b>	<i>Epidermal Growth Factor</i>
<b>Ets-1:</b>	<i>E26 transformation-specific 1</i>
<b>FADD:</b>	<i>Fas Associated Death Domain</i>
<b>IFN:</b>	Interféron
<b>Ig:</b>	Immunoglobuline
<b>IL:</b>	Interleukine
<b>iNOS:</b>	<i>inducible Nitric Oxide Synthase</i>
<b>ISG:</b>	<i>Interferon Stimulated Gene</i>
<b>ISGF3:</b>	<i>Interferon Stimulated Gene Factor 3</i>
<b>ISRE:</b>	<i>IFN- Stimulated gene Response Element</i>
<b>IRDS:</b>	<i>Interferon Related DNA Damage resistance Signature</i>



<b>IRF:</b>	<i>Interferon Regulatory Factor</i>
<b>JAK:</b>	<i>Janus Kinase</i>
<b>LB:</b>	<i>Lymphocyte B</i>
<b>LMP:</b>	<i>Low Molecular mass Polypeptide</i>
<b>LPS:</b>	<i>Lypopolysaccharide</i>
<b>LT:</b>	<i>Lymphocyte T</i>
<b>MDC1:</b>	<i>Mediator of DNA damage checkpoint protein 1</i>
<b>Mdm2:</b>	<i>Mouse double minute 2</i>
<b>MLH1:</b>	<i>MutL homolog 1</i>
<b>MMR:</b>	<i>MisMatch Repair</i>
<b>MNNG:</b>	<i>N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoGuanidine</i>
<b>MSH:</b>	<i>MutS protein homolog</i>
<b>MutSa:</b>	<i>Mutator Sa</i>
<b>MutLa:</b>	<i>Mutator La</i>
<b>NER:</b>	<i>Nucleotide Excision Repair</i>
<b>NES:</b>	<i>Nuclear Export Signal</i>
<b>NF-κB:</b>	<i>Nuclear Factor Kappa B</i>
<b>NHEJ:</b>	<i>Non-Homologous End-Joining</i>
<b>NLS:</b>	<i>Nuclear Localization Site</i>
<b>NO:</b>	<i>Nitric Oxide</i>
<b>NPC:</b>	<i>Nuclear pore complexe: complexe du pore nucléaire</i>
<b>npISGF3:</b>	<i>ISGF3 non phosphorylé sur la tyrosine 701 de STAT1 et sur la tyrosine 690 de STAT2</i>
<b>npSTAT1:</b>	<i>STAT1 non phosphorylé sur sa tyrosine 701</i>
<b>OAS:</b>	<i>2'5'Oligoadenylate Synthetase</i>
<b>PAX 5:</b>	<i>Paired-box Protein 5</i>
<b>PBMC:</b>	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
<b>PCNA:</b>	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
<b>PIAS:</b>	<i>Protein Inhibitors of Activated STATs</i>
<b>PDGF:</b>	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
<b>PKR:</b>	<i>Protein Kinase R</i>
<b>PMS2:</b>	<i>PostMeiotic Segregation increased 2</i>
<b>PRDM1:</b>	<i>PR Domain containing 1</i>
<b>pSTAT1:</b>	<i>STAT1 phosphorylé sur sa tyrosine 701</i>
<b>PTP:</b>	<i>Protein Tyrosin Phosphatases</i>
<b>Rb:</b>	<i>Retinoblastoma tumor suppressor protein</i>
<b>RORγt:</b>	<i>RAR-related orphan receptor γt</i>
<b>RPA:</b>	<i>Replication protein A</i>
<b>SH2:</b>	<i>Src Homology domain 2</i>
<b>SHM:</b>	<i>Somatic HyperMutation</i>
<b>SHP:</b>	<i>Src-Homology tyrosine Phosphatase</i>
<b>SOCS:</b>	<i>Suppressor Of Cytokine Signaling</i>
<b>Src:</b>	<i>Sarcoma</i>
<b>STAT:</b>	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
<b>SUMO:</b>	<i>Small Ubiquitin like Modifier</i>

<b>TAD:</b>	<i>TransActivator Domain</i> ou domaine transactivateur
<b>TAP:</b>	<i>Transporter in Ag Processing</i>
<b>TFIIH:</b>	<i>Transcription factor II Human</i>
<b>Th:</b>	<i>T helper</i>
<b>TNF:</b>	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
<b>TNFR:</b>	<i>TNF<math>\alpha</math> Receptor</i>
<b>TRADD:</b>	<i>Tumor necrosis factor Receptor type 1-Associated DEATH Domain protein</i>
<b>TRAF:</b>	<i>TNF Receptor Associated Factor</i>
<b>TRAIL:</b>	<i>Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand</i>
<b>TYK2:</b>	<i>Tyrosin kinase 2</i>
<b>UNG:</b>	<i>Uracil N Glycosylase</i>
<b>VDJ:</b>	<i>Variable Diversity Joining</i>
<b>VEGF:</b>	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
<b>XBP1:</b>	<i>X-box Binding Protein 1</i>
<b>XP:</b>	<i>Xeroderma Pigmentosum</i>
<b>53BP1:</b>	<i>Tumor suppressor p53-binding protein 1</i>

# LISTE DES FIGURES

<i>Figure 1: Structure des STATs.</i> .....	14
<i>Figure 2: Structure cristallographique de l'homodimère de STAT1 phosphorylé lors de sa liaison à l'ADN.</i> .....	16
<i>Figure 3: Conformations parallèle et antiparallèle des homodimères de STAT1 en fonction de son état d'activation.</i> .....	17
<i>Figure 4: Modèle de l'oligomérisation de STAT1 après phosphorylation de la tyrosine 701.</i> 18	
<i>Figure 5: Action transcriptionnelle directe de STAT1 après son activation par les voies de signalisation des récepteurs aux IFN<math>\gamma</math> et IFN <math>\alpha/\beta</math>.</i> .....	20
<i>Figure 6: Activation des STATs par d'autres récepteurs que les IFNs.</i> .....	21
<i>Figure 7: Localisation du NLS dans les domaines structuraux et fonctionnels de STAT1.</i> .....	26
<i>Figure 8: Schéma récapitulatif de la navette nucléo-cytoplasmique de STAT1.</i> .....	27
<i>Figure 9: Régulation inhibitrice de la voie de signalisation JAK/STAT1.</i> .....	29
<i>Figure 10: Structure cristallographique des dimères STAT1 activés liant l'ADN et leurs sites de modifications post-traductionnelles.</i> .....	30
<i>Figure 11: Rôles de STAT1 dans l'immunité innée.</i> .....	36
<i>Figure 12: Structure schématique de la molécule IgG.</i> .....	41
<i>Figure 13: Mécanisme de la CSR.</i> .....	42
<i>Figure 14: Orientation de la CSR.</i> .....	44
<i>Figure 15: Modèle schématique de l'épissage par polyadénylation d'une Immunoglobuline (ici IgM).</i> .....	45
<i>Figure 16: Régulation croisée de la CSR et de la différenciation plasmocytaire.</i> .....	46
<i>Figure 17: Régulation de l'apoptose par STAT1 (d'après (Kim and Lee, 2007)).</i> .....	48
<i>Figure 18: Action de STAT1 sur les voies de signalisation induites par le TNF<math>\alpha</math>.</i> .....	50
<i>Figure 19: STAT1 et l'arrêt du cycle cellulaire.</i> .....	52
<i>Figure 20: Type de lésions d'ADN.</i> .....	56
<i>Figure 21: Origines des lésions à l'ADN et conséquences.</i> .....	56

<i>Figure 22: Structures chimiques du N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) et du cisplatine.</i> .....	58
<i>Figure 23: Représentation moléculaire de l'action du MNNG sur la guanine impliquant des mésappariements et du cisplatine sur la les bases puriques (A ou G) impliquant des pontages de l'ADN.</i> .....	59
<i>Figure 24: Représentation schématique de la réparation post-réplivative du MMR dans les cellules procaryotes.</i> .....	61
<i>Figure 25: la formation de <math>\gamma</math>H2AX mène à l'amplification du signal suite aux dommages à l'ADN par cassures double brin.</i> .....	63
<i>Figure 26: L'expression de STAT1 est associée à une augmentation de la croissance tumorale.</i> .....	65
<i>Figure 27 : Modèle hypothétique impliquant STAT1 du mécanisme de résistance des clones tumoraux aux radio et/ou chimiothérapies.</i> .....	66
<i>Figure 28: Immunoglobulines membranaires exprimées par les lignées Ct1 et SD2.</i> .....	101
<i>Figure 29: Expression protéique de STAT1 et des immunoglobulines par les cellules SD2-<math>\alpha</math> et SD2-E après sélection des cellules transfectées.</i> .....	102
<i>Figure 30: Etude transcriptionnelle de l'expression de STAT1, des immunoglobulines et de l'AID dans les cellules SD2-<math>\alpha</math> et SD2 après sélection des cellules transfectées.</i> .....	103

#### *Tableaux*

<i>Tableau 1: Exemples de gènes cibles de STAT1 contenant une séquence GAS et leur effets biologiques</i> .....	23
<i>Tableau 2: Principales modifications post-traductionnelles inhibitrices de STAT1.</i> ..	28
<i>Tableau 3: Rôles de STAT1 dans la tumorigénèse</i> .....	54
<i>Tableau 4: Marqueurs de surface des lignées SD2 et Ct1</i> .....	103

# INTRODUCTION

La famille des facteurs de transcription STATs (Signal Transducers and Activators of Transcription) a été découverte il y a une vingtaine d'années. Cette famille compte sept membres: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B et STAT6. Les structures des facteurs STATs (cf. chapitre 1.1) et leurs mécanismes d'activation et d'action (cf. chapitres 1.2 et 1.3) sont relativement homologues. Suite à la fixation de cytokines ou de facteurs de croissance sur leurs récepteurs membranaires des effecteurs initiaux, dont des kinases telles la Janus kinase, vont activer par phosphorylation les facteurs STATs dans le cytoplasme. Ceux-ci forment alors des homodimères et sont transportés vers le noyau pour activer la transcription de leurs gènes cibles (cf. chapitre 1.4) (Aaronson and Horvath, 2002).

Au cours de ma thèse j'ai plus particulièrement étudiée le rôle fonctionnel du premier de ces facteurs de transcription. STAT1 est le premier facteur de la famille à avoir été identifié en 1994 par J. Darnell (Darnell et al., 1994). Il est le principal effecteur de la signalisation des interférons (IFN). Ainsi, une déficience complète en STAT1 conduit irrévocablement à une forme sévère d'immunodéficience et fréquemment à la mort des patients (Chapgier et al., 2006). Les cellules humaines totalement déficientes pour STAT1 sont donc rares mais nous avons utilisé l'une d'elle dans nos études. Outre ce rôle important dans l'immunité innée et une action anticancéreuse *via* l'activation du système immunitaire, STAT1 est aussi impliqué dans d'autres processus biologiques tels que l'apoptose et la régulation de la prolifération cellulaire. Ainsi, ce chapitre introductif décrira la structure et les différentes fonctions de STAT1 ainsi que son impact dans différents processus biologiques. Nous avons identifié, au cours de ce travail, deux nouveaux rôles anti-tumoraux de STAT1: un rôle de STAT1 dans l'immunité adaptative par la modulation de l'expression des immunoglobulines et un second rôle anti-tumoral dans la réponse aux agents génotoxiques.

# CHAPITRE I. LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION STAT1

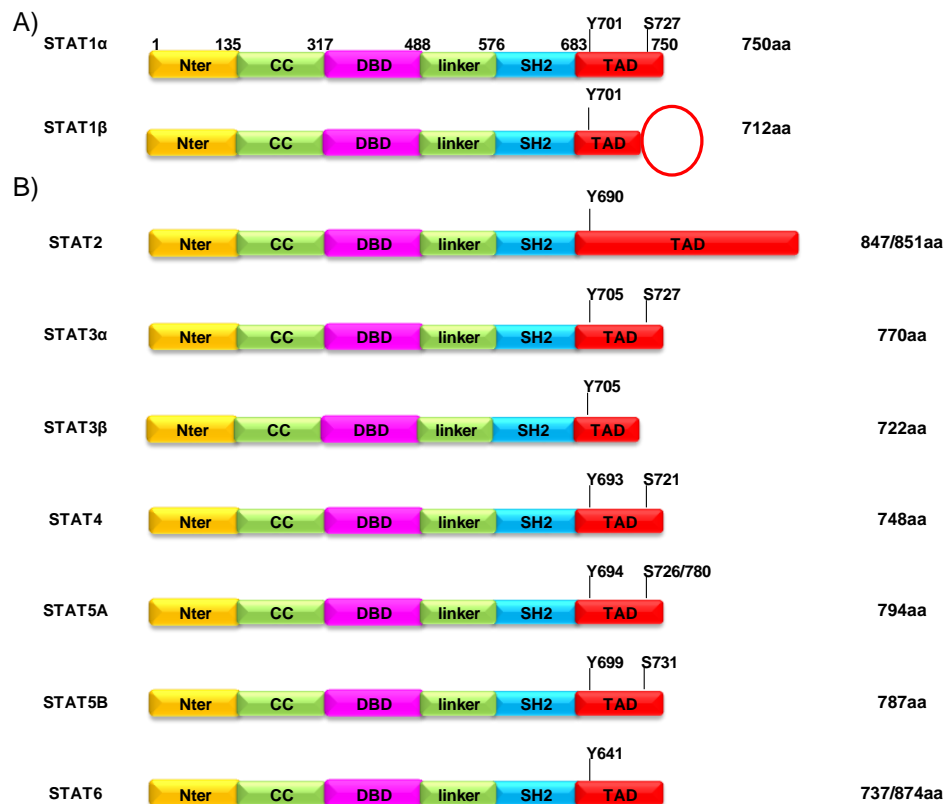
## 1.1 STRUCTURE ET DOMAINES DE STAT1

STAT1 présente différents états de polymérisation dans la cellule. Les monomères de STAT1 correspondent le plus souvent à la forme latente et inactive de ce facteur de transcription (Darnell, 1997; Levy and Darnell, 2002; Lim and Cao, 2006; Sehgal, 2008; Zhang et al., 1996). Ces monomères peuvent cependant s'associer à d'autres facteurs de transcription ou à certains co-activateurs de la machinerie transcriptionnelle dont la CBP/p300 (Chatterjee-Kishore et al., 2000a; Gough et al., 2008; Horvath, 2000; Kiu and Nicholson, 2012; Lim and Cao, 2006; Zhang et al., 1996). Ils participent alors à la formation de complexes transcriptionnels et agissent comme cofacteurs transcriptionnels. Le principal mécanisme d'activation transcriptionnelle médiée par STAT1 correspond à celui mis en œuvre au cours de la signalisation de l'IFN $\gamma$ . Les homodimères de STAT1 phosphorylés (pSTAT1) régulent directement l'expression de leurs gènes cibles (Sato and Tabunoki, 2013). De plus, il a été démontré que les homodimères de STAT1 peuvent être présents dans la cellule à l'état d'oligomères modulant ainsi la durée de son action transcriptionnelle (Meyer et al., 2004; Wenta et al., 2008).

### 1.1.1 MONOMERE DE STAT1 ET SES DOMAINES

STAT1 possède deux isoformes STAT1 $\alpha$  et STAT1 $\beta$  codées par le même gène situé sur le chromosome en position 2q12-33 qui résultent d'un épissage alternatif (Kim and Lee, 2007; Schindler et al., 1992). Les voies de signalisation activatrices, les mécanismes d'action transcriptionnels et les fonctions attribuées à STAT1 ont été principalement analysées pour l'isoforme STAT1 $\alpha$ . STAT1 $\alpha$  est constitué de 750 acides aminés (aa) et présente un poids moléculaire de 91kDa. L'isoforme STAT1 $\beta$  compte 712 aa et possède un poids moléculaire de 84kDa. Elle correspond à la protéine STAT1 $\alpha$  tronquée de 38 aa à son extrémité C-terminale. Si STAT1 $\beta$  a jusqu'alors été considéré comme une isoforme transcriptionnellement inactive de STAT1, cette conception a récemment été remise en question.

En effet, Semper *et al* ont mis en évidence des actions transcriptionnelles communes à STAT1 $\alpha$  et STAT1 $\beta$  ainsi que des actions transcriptionnelles propres à STAT1 $\alpha$  (Semper et al., 2014). Des études cristallographiques ainsi que la comparaison des séquences protéiques ont révélé la présence de six domaines conservés dans la structure des STATs (figure 1B). Ces domaines donnent une organisation structurale commune. Ils sont, depuis l'extrémité N-terminale, les suivants (figure 1A) (Bromberg and Darnell, 2000; Chen et al., 1998; Kim and Lee, 2007; Lim and Cao, 2006; Najjar and Fagard, 2010):



**Figure 1: Structure des STATs.**

A) Différence structurale entre les isoformes STAT1 $\alpha$  et STAT1 $\beta$ . B) Structures des autres membres de la famille STAT. Y: tyrosine ; S: serine; les chiffres indiquent la position des acides aminés (aa) dans la séquence primaire des STATs ; Nter: domaine N-terminal ; CC: domaine surenroulé (coiled-coil) ; DBD: domaine de liaison à l'ADN (DNA Binding Domain) ; linker: domaine de liaison.

➤ Le domaine N-terminal.

C'est un domaine hautement conservé dans la famille des STATs. Il est constitué des aa 1 à 135 de STAT1. Il est impliqué dans les interactions entre STAT1 et d'autres protéines dont les autres STATs. Il est également nécessaire à la formation des oligomères de STAT1.

- Le domaine CC (*coiled-coil*) ou domaine hélicoïdal surenroulé.  
Il est constitué des aa 136 à 317 de STAT1. Il est lui aussi impliqué dans les interactions de STAT1 avec d'autres protéines dont plusieurs protéines régulatrices telles que « *N-myc interacting protein* » (Nmi-1) qui sert au recrutement de la protéine « *CREB Binding protein* » (CBP). Ces interactions contribuent à l'activité transcriptionnelle de STAT1.
- Le domaine DBD (*DNA Binding Domain*) ou domaine de liaison à l'ADN.  
Ce domaine constitué des aa 318 à 488 de STAT1 (figure 1A), est un homologue structural des « *immunoglobulin like binding domain* ». Il contient des structures secondaires en feuillettes  $\beta$  identiques à celles d'autres facteurs de transcription tels que NF- $\kappa$ B ou p53. Le DBD de STAT1 assure la reconnaissance spécifique des séquences consensus présentes dans la région promotrice de ses gènes cibles. Ce domaine contient aussi le signal de localisation nucléaire (NLS ou *Nuclear Localization Site*) de STAT1 entre les aa 406 et 415 et un signal d'export nucléaire (NES ou *Nuclear Export Sequence*) qui est constitué des aa 392 à 413 et recouvre partiellement le NLS.
- Le domaine de liaison ou *linker*.  
Ce domaine, constitué des aa 489 à 576 contient des structures secondaires en hélice  $\alpha$ . Il sépare les domaines DBD et SH2 de STAT1. Sa fonction demeure mal définie mais des études mutationnelles ont démontré qu'il est nécessaire à la signalisation de l'IFN $\gamma$ . En effet, certaines mutations du domaine *linker* entraînent une diminution de la liaison du DBD de STAT1 aux promoteurs de ses gènes cibles.
- Le domaine SH2 (*Src Homology domain 2*).  
Il est formé des aa 577 à 683 et correspond à un domaine d'interaction avec des protéines présentant des tyrosines phosphorylées. Ce domaine est essentiel à l'activation de STAT1 puisqu'il permet son recrutement au niveau de récepteurs des cytokines. Ce domaine est également nécessaire à l'action transcriptionnelle de STAT1 en permettant la formation d'homodimères de STAT1 phosphorylés.
- Le domaine TAD (*TransActivator Domain*) ou domaine d'activation de la transcription.  
Il s'agit du domaine C-terminal de STAT1 qui est constitué des aa 684 à 750 pour l'isoforme STAT1 $\alpha$  et des aa 684 à 712 pour l'isoforme STAT1 $\beta$ . Ce domaine comporte deux sites majeurs de régulation de l'activité transcriptionnelle de STAT1. Le premier d'entre-eux présent à la fois dans le TAD de STAT1 $\alpha$  et STAT1 $\beta$ , correspond à la tyrosine 701 (Y701).



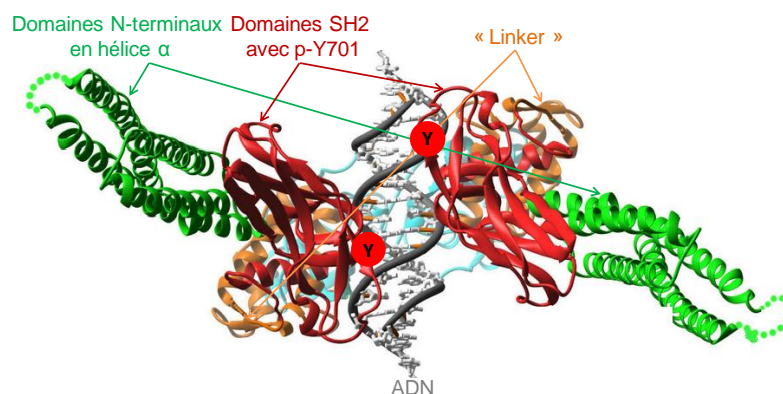
La phosphorylation de l'Y701 (pY701) est un marqueur de l'activation de STAT1 car elle est nécessaire à son homodimérisation et favorise sa translocation nucléaire et sa liaison à l'ADN. La pY701 est donc requise pour l'action transcriptionnelle directe de STAT1. La sérine 727 (S727) correspond au second site majeur de régulation de l'activité transcriptionnelle de STAT1. Ce site est absent du domaine TAD de STAT1 $\beta$ . Il a été démontré qu'une mutation de S727 qui empêche la phosphorylation de ce site, entraîne une absence de recrutement des co-activateurs transcriptionnels de STAT1, ce qui réduit son activité transcriptionnelle de 20%. La phosphorylation de la sérine 727 (S727) du domaine TAD garantit une activité transcriptionnelle maximale de STAT1 activé.

Au-delà de son rôle clé dans l'activation de la transcription par STAT1, le domaine TAD est impliqué dans les interactions protéiques de STAT1 avec d'autres facteurs de transcription et les composants de la machinerie transcriptionnelle.

### 1.1.2 DIMERE DE STAT1

En fonction de l'état d'activation de STAT1, des dimères STAT1 parallèles ou antiparallèles se forment (Wenta et al., 2008).

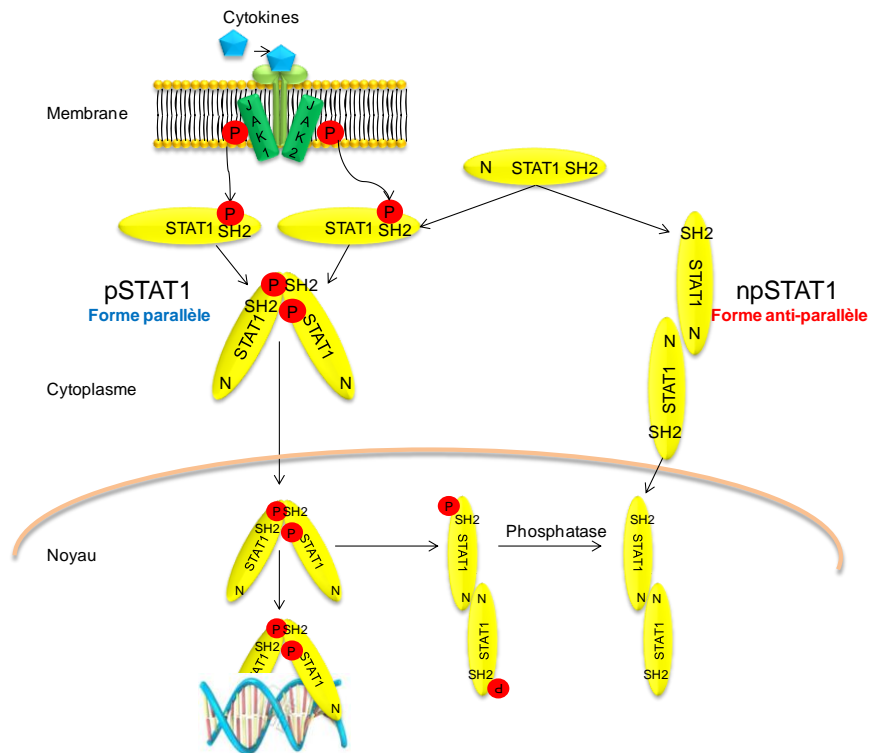
Le principal mécanisme d'action transcriptionnelle de STAT1 est assuré par les homodimères de STAT1 phosphorylés (pSTAT1) sur leur Y701 (Sato and Tabunoki, 2013). La formation de ces homodimères implique le résidu Y701 phosphorylé et le domaine SH2 de chacun des monomères et aboutit à la formation d'une conformation dite « parallèle ». Ces homodimères parallèles sont transportés dans le noyau où ils reconnaissent de façon spécifique une séquence d'ADN cible (figures 2 et 3).



**Figure 2: Structure cristallographique de l'homodimère de STAT1 phosphorylé lors de sa liaison à l'ADN.**

(Chen et al., 1998)

En l'absence de stimulation, deux monomères de STAT1 non phosphorylés forment un homodimère de conformation antiparallèle dans laquelle les extrémités de chaque monomère sont positionnées de manière opposée. La formation de ces homodimères antiparallèles implique les domaines Nter, « coiled-coil » et DBD de chaque monomère. Contrairement aux homodimères parallèles, le domaine SH2 n'est pas impliqué (figure 3) (Mao et al., 2005).



**Figure 3: Conformations parallèle et antiparallèle des homodimères de STAT1 en fonction de son état d'activation.**

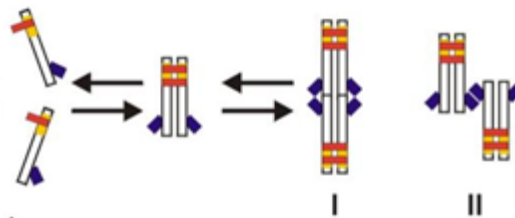
La forme phosphorylée de STAT1 (pSTAT1) participe à la formation des homodimères de STAT1 ayant une conformation parallèle grâce à la reconnaissance du résidu Y701 phosphorylé (P) par le domaine SH2 de chacun des monomères. Ces dimères sont transportés dans le noyau et activent directement la transcription de gènes cibles. La forme non phosphorylée de STAT1 (npSTAT1) entraîne la formation de dimères antiparallèles de STAT1 impliquant le domaine N-terminal (N) de chaque monomère. Ces homodimères antiparallèles peuvent indirectement contribuer à certaines régulations transcriptionnelles par le biais d'interactions protéiques. Une partie des dimères de pSTAT1 peuvent prendre une conformation antiparallèle qui favorise leur déphosphorylation.

L'équilibre entre les dimères parallèles et antiparallèles dépend de l'activation des voies de signalisation menant à la phosphorylation de STAT1. En outre, une fraction minoritaire de l'homodimère parallèle, formé suite à une stimulation, est capable d'adopter la conformation antiparallèle. Les Y701 phosphorylés sont alors davantage accessibles aux phosphatases.

La déphosphorylation des Y701 stabilise la conformation antiparallèle de l'homodimère STAT1. L'extrémité N-terminale joue un rôle essentiel dans la régulation de ce changement de conformation (Mertens et al., 2006) (figure 3).

### 1.1.3 OLIGOMERES DE STAT1

STAT1 est capable de former des tétramères correspondants à l'association d'homodimères parallèles de STAT1. L'extrémité N-terminale, en particulier le tryptophane 37, est essentiel à cette tétramérisation. Ces tétramères adoptent deux types de conformation (figure 4). Dans la conformation de type I, les deux extrémités N-terminales d'un dimère interagissent avec les deux extrémités N-terminales du second dimère. Dans la conformation de type II, une seule des extrémités N-terminales de chaque dimère est engagée (Meyer et al., 2004). Cette conformation de type II est celle observée lors de la liaison à l'ADN (figure 4II) (Wenta et al., 2008).



**Figure 4: Modèle de l'oligomérisation de STAT1 après phosphorylation de la tyrosine 701.**

*D'après Chen et al. (Wenta et al., 2008). Les domaines N-terminaux sont en bleu, les domaines SH2 en jaune et les phosphotyrosines 701 en rouge. I et II: deux conformations possibles des tétramères.*

## 1.2 VOIES D'ACTIVATION DE STAT1

Les voies canoniques d'activation de STAT1 sont celles de la réponse aux IFNs de type I ( $\alpha$  et  $\beta$ ) et de type II ( $\gamma$ ). Cependant, la fixation de certaines cytokines ou facteurs de croissances peut également aboutir à l'activation de STAT1, on parle alors de voies alternatives. L'activation aboutit à la phosphorylation sur la tyrosine 701 (Y701) de STAT1 qui forme alors les dimères transcriptionnellement actifs.

## 1.2.1 VOIES CANONIQUES

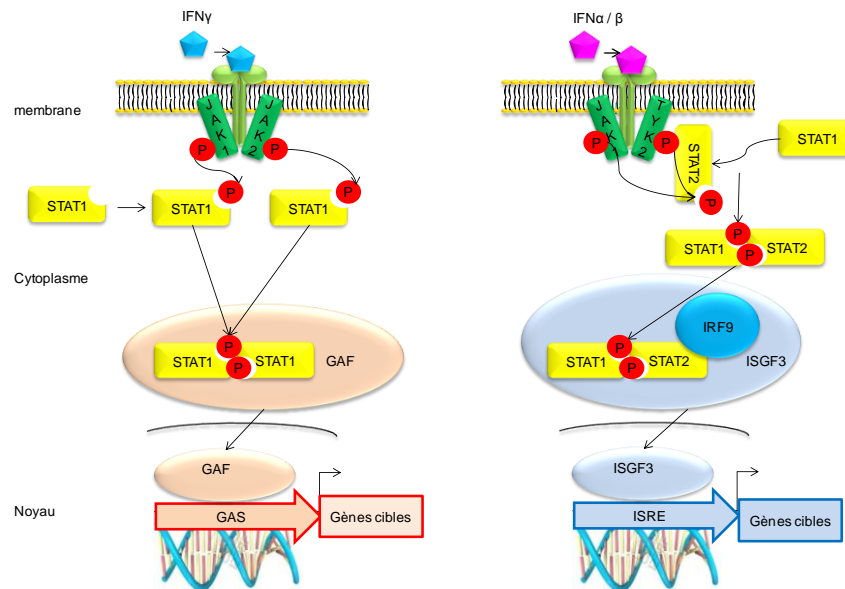
### 1.2.1.1 ACTIVATION DES RECEPTEURS A L'IFN $\gamma$ (RECEPTEURS DE TYPE II)

Une des principales voies de signalisation aboutissant à l'activation de STAT1 implique la fixation de l'IFN $\gamma$  sur son récepteur (Stark et al., 1998). Ce dernier est constitué de deux sous unités  $\alpha$  et  $\beta$  associées à des tyrosines kinases de la famille des Janus kinases (JAK), JAK1 et JAK2 (Kim and Lee, 2007). La liaison de l'IFN $\gamma$  à son récepteur induit la dimérisation des deux sous unités  $\alpha$  et  $\beta$ . JAK2 est alors activé par autophosphorylation et phosphoryle à son tour JAK1 (Stark et al., 1998). JAK1/2 activés phosphorylent les résidus tyrosines des domaines cytoplasmiques du récepteur ce qui crée un site d'ancrage pour STAT1 *via* son SH2 (Kim and Lee, 2007; Stark et al., 1998). JAK1/2 phosphorylent alors la Y701 des monomères de STAT1. STAT1 phosphorylé (pSTAT1) se dissocie du récepteur et forme un homodimère parallèle appelé « *Gamma-interferon Activated Factor* » (GAF) (figure 5).

Cette voie de signalisation permet également la phosphorylation de STAT1 sur la S727. Cette modification post-traductionnelle augmente l'activité transcriptionnelle de STAT1 activé (chapitre I, 1.5.1) (Kim and Lee, 2007).

### 1.2.1.2 ACTIVATION DES RECEPTEURS A L'IFN $\alpha/\beta$ (RECEPTEURS DE TYPE I)

Les récepteurs aux IFN $\alpha/\beta$  contiennent deux sous unités: la sous unité IFNAR1 associée à TYK2, un autre membre de la famille des JAK, et la sous unité IFNAR2 associée à JAK1 (Kim and Lee, 2007). La liaison de l'IFN $\alpha$  à son récepteur provoque la dimérisation des deux sous unités et la transphosphorylation de TYK2 et JAK1 (Kim and Lee, 2007). TYK2 et JAK1 phosphorylent les tyrosines des domaines cytoplasmiques du récepteur ce qui crée un site de fixation potentiel pour STAT2 (Kim and Lee, 2007). STAT2 se fixe sur le récepteur et est phosphorylé sur sa Y690 par les JAKs (Krishnan et al., 1996). A son tour STAT1 se fixe sur STAT2 et est phosphorylé par les JAKs sur sa Y701. STAT1 et STAT2 phosphorylés se dissocient du récepteur et forment un hétérodimère qui, associé avec l' « *Interferon Regulatory Factor 9* » (IRF9), forme un complexe transcriptionnellement actif appelé « *Interferon Stimulated Gene Factor 3* » (ISGF3) (Kim and Lee, 2007) (figure 5).

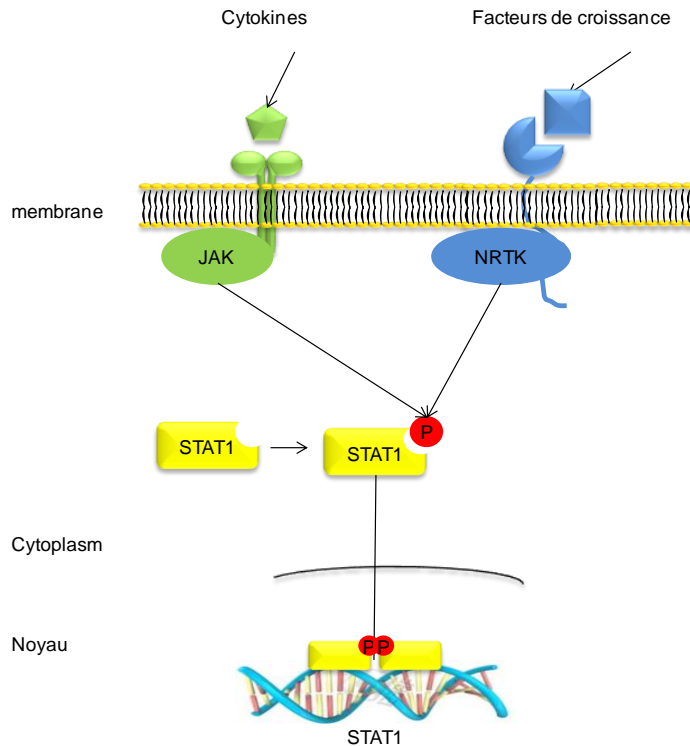


**Figure 5: Action transcriptionnelle directe de STAT1 après son activation par les voies de signalisation des récepteurs aux IFN $\gamma$  et IFN  $\alpha/\beta$ .**

*P*: phosphorylation. IFN $\gamma$  ou  $\alpha/\beta$ : interféron  $\gamma$  ou  $\alpha/\beta$ . STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription. GAF: Gamma-interferon Activated Factor. ISGF3: Interferon Stimulated Gene Factor. IRF9: Interferon regulatory factor 9. GAS: Gamma-interferon Activated Sequence (TTCXXXGAA ou TTCXXXXGAA). ISRE: IFN $\alpha$ - Stimulated gene Response Element (AGTTTCNNTTTCN(C/T)).

### 1.2.2 VOIES ALTERNATIVES

D'autres voies de signalisation peuvent aboutir à l'activation de STAT1 dont celles stimulées par le « *Granulocyte Colony Stimulating Factor* » (G-CSF), l'interleukine 6 (IL-6), l'*Epidermal Growth Factor* (EGF), le *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF) et l'hormone de croissance (GH) (figure 6) (Ramana et al., 2000). Les mécanismes sont alors différents des voies canoniques d'activation de STAT1. Ainsi, JAK1 est essentiel à l'activation de STAT1 par l'IL-6 ou le G-CSF (Ramana et al., 2000) alors que la signalisation de l'EGF et de l'hormone de croissance utilisent seulement JAK2 (Ramana et al., 2000). Par ailleurs, bien que les JAKs soient phosphorylés suite à la fixation du PDGF sur son récepteur, ce dernier présente une activité tyrosine kinase responsable de l'activation directe de STAT1 (Ramana et al., 2000; Sachsenmaier et al., 1999) (figure 6).



**Figure 6: Activation des STATs par d'autres récepteurs que les IFNs.**

*P: phosphorylation. JAK: Janus Kinase, NRTK: Non Receptor Tyrosine Kinase, STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription.*

### 1.3 MECANISMES D'ACTION DE STAT1

STAT1 peut à la fois reconnaître ses séquences d'ADN consensus ou moduler l'expression de gènes cibles comme cofacteur en formant des complexes avec d'autres facteurs de transcription ou des acteurs de la machinerie transcriptionnelle.

#### 1.3.1 RECONNAISSANCE DE SEQUENCES D'ADN CONSENSUS

En fonction de la stimulation initiale de la cellule, STAT1 participe à la formation de différents complexes transcriptionnels reconnaissant spécifiquement deux types de séquences consensus. Ainsi une stimulation par l'IFN $\gamma$  aboutit à la liaison à la séquence « *Gamma Activated Sequence* » (GAS) par l'homodimère pSTAT1 alors que la stimulation par l'IFN $\alpha$  induit la formation du complexe transcriptionnel ISGF3 se fixant spécifiquement sur la séquence « *IFN $\alpha$ - Stimulated gene Response Element* » (ISRE) (figure 5).

### 1.3.1.1 LES SEQUENCES GAS

---

La voie canonique d'activation de STAT1 par l'IFN $\gamma$  aboutit à la formation d'un homodimère pSTAT1 appelé GAF qui reconnaît spécifiquement la séquence d'ADN consensus « *Gamma-interferon Activated Sequence* » (GAS). Cette séquence comprend un motif de type: **TTC**C(G/C)**GGAA** (**TTC**N<sub>2-4</sub>**GAA**) (Leonard and O'Shea, 1998). Une même séquence GAS peut être à la fois reconnue par STAT1 et STAT3 alors que ceux-ci présentent des actions opposées sur les mêmes gènes cibles (Horvath et al., 1995).

La reconnaissance spécifique des séquences GAS par l'homodimère pSTAT1 permet la régulation de l'expression de nombreux gènes cibles qui vont aller réguler à leur tour les effets biologiques médiés par STAT1 (tableau 1). Parmi ses gènes cibles, on peut citer la p53, la protéine p21, BCL6 (*B cell lymphoma 6*) ou STAT1 lui-même ce qui permet une amplification de ses effets biologiques (Ramana et al., 2000; Saha et al., 2010).

Par ce mécanisme d'action transcriptionnel, STAT1 régule également l'expression de plusieurs membres de la famille des facteurs de transcription « *Interferon Regulatory Factors* » (IRFs) dont IRF1, IRF2, IRF3 et IRF5 (Ikushima et al., 2013; Rogatsky et al., 2014) ce qui augmente le nombre de fonctions ainsi régulées indirectement par STAT1. Par exemple, *via* IRF1, STAT1 régule l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose et la présentation antigénique comme la caspase 1 et le CMH I (Chen et al., 2013). De plus, il peut exister une double régulation de certains gènes à la fois directe par la fixation sur un site GAS et indirecte par l'intermédiaire d'un IRF. C'est le cas de la p53 ou la p21 dont l'expression est induite par STAT1 et IRF1 (Chen et al., 2013; Ramana et al., 2000; Saha et al., 2010).

Exemples de gènes cibles de STAT1 contenant GAS	Rôle de STAT1 correspondant
STAT1, IRF1, IRF2, IRF3, IRF5	Réponse immunitaire innée et adaptative, oncogénèse
OAS1, -2 et -3, PKR, RNase L	Réponse antivirale
IL-12, TNF $\alpha$	Réponse inflammatoire
TAP1, LMP2	Présentation antigénique
Rb, BRCA1, p53, FasL, Bcl2	Cycle cellulaire et survie
STAT1, p21, p27	Cycle cellulaire
STAT1, caspases 4 et 8	Apoptose
ARTEMIS	Réparation de l'ADN

***Tableau 1: Exemples de gènes cibles de STAT1 contenant une séquence GAS et leur effets biologiques.***

### 1.3.1.2 LES SEQUENCES ISRE

L'autre voie canonique d'activation de STAT1 dépend des IFN $\alpha/\beta$  et aboutit à la formation d'un complexe pSTAT1/pSTAT2/IRF9 (ISGF3) qui reconnaît spécifiquement la séquence d'ADN consensus *IFN $\alpha$ - Stimulated gene Response Element* (ISRE). Cette séquence comprend un motif de type AG**TTTCNNTTTC**NC/T (Haque and Williams, 1994; Stark et al., 1998).

La fixation d'ISGF3 sur des séquences ISRE régule l'expression de gènes cibles de l'IFN $\alpha/\beta$  tels que celui d'ISG-15 (Bluyssen and Levy, 1997) impliqué dans la réponse antivirale. Les promoteurs d'autres gènes cibles contiennent à la fois des séquences GAS et ISRE régulant leur expression. C'est le cas du gène codant IRF1 ou encore de ceux codant de nombreux facteurs impliqués dans la présentation antigénique et la réponse immunitaire tels que la chaîne légère du CMH I ou TAP1 (Saha et al., 2010).



### 1.3.2 INTERACTION AVEC DES CO-ACTIVATEURS DE LA MACHINERIE TRANSCRIPTIONNELLE

L'activité transcriptionnelle de pSTAT1 peut également faire intervenir le recrutement de protéines possédant une activité *Histone AcetylTransferase* (HAT) telles que la *cAMP-response element binding (CREB)-Binding Protein* (CBP) ou l'*E1 binding protein* (p300). La formation de ce complexe co-activateur avec la CBP/p300 fait intervenir une interaction protéique à laquelle le domaine N-terminal de STAT1 participe. D'autres facteurs de transcription tels que PU.1 peuvent également s'y associer (Aittomaki et al., 2002; Icardi et al., 2012; Zhuang, 2013). Le complexe ainsi formé module alors la transcription par une décondensation de la chromatine qui facilite son accessibilité (Icardi et al., 2012) et l'initiation de la transcription par fixation directe de pSTAT1 sur la séquence GAS du promoteur de ses gènes cibles. Dans le cadre de l'immunité innée, la régulation transcriptionnelle du gène codant RFcγI illustre par exemple ce mécanisme d'action de STAT1 (Aittomaki et al., 2002).

### 1.3.3 PARTICIPATION A DES COMPLEXES TRANSCRIPTIONNELS

STAT1 participe également à la régulation transcriptionnelle par une association à d'autres facteurs de transcription. Il joue, dans ce cas, un rôle de cofacteur de la transcription. Les deux exemples cités ci-dessous décrivent une participation essentielle de la forme non phosphorylée de STAT1 dans ces complexes.

Par l'intermédiaire du domaine N-terminal de STAT1, le dimère de npSTAT1 participe à la formation d'un complexe transcriptionnel avec IRF1 qui régule l'expression du gène « *Low Mass molecular Polypeptide 2* » (LMP2) (tableau 1) (chapitre 1.3.3) (Cheon and Stark, 2009; Yang and Stark, 2008). Ce complexe se fixe sur une séquence consensus particulière du gène de LMP2 de motif « CGATTTCCGCT/TTCCCCCTAAATG » contenant deux séquences: une séquence de type ISRE, « *Interferon Consensus Sequence 2* » (ICS2) et une séquence GAS reconnues respectivement par IRF1 et npSTAT1 (Chatterjee-Kishore et al., 2000b). L'équipe de M. Chatterjee-Kishore a mis en évidence que STAT1 était nécessaire à la fixation de ce complexe sur le gène de LMP2 à l'induction de sa transcription.

Dans un autre exemple, STAT1 forme un complexe transcriptionnel avec Spi-1 et l'*Interferon Regulatory Factor 8* (IRF8 ou ICSPB) afin de réguler l'expression du gène de l'IL-1β.

Dans ce cadre, le monomère npSTAT1 participe au complexe IRF8/Spi-1 par son domaine N-terminal. Ce complexe se fixe sur la séquence LILRE du gène de l'IL-1 $\beta$  de motif «AGTCTTATAAGAGGTTTCACTTCCTGAGAGTCGA » (Unlu et al., 2007) qui contient une séquence ISRE et une séquence GAS reconnues respectivement par le complexe IRF8/Spi-1 et par npSTAT1 (Unlu et al., 2007). L'équipe de S. Unlu a également montré qu'après une stimulation par les LPS dans les monocytes, npSTAT1 est nécessaire à l'activation, à l'augmentation et au maintien du complexe IRF8/Spi-1 sur le gène de l'IL-1 $\beta$  (Unlu et al., 2007).

## 1.4 NAVETTE NUCLEO-CYTOPLASMIQUE DE STAT1

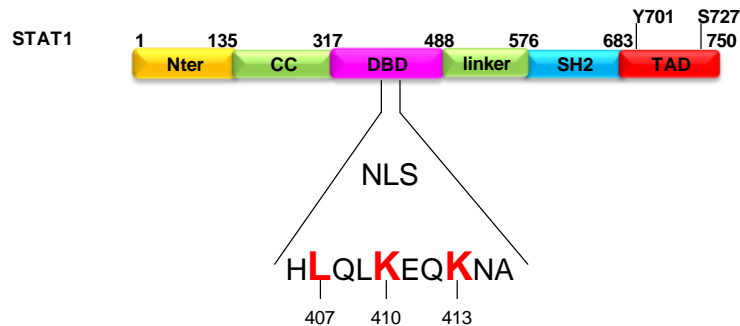
STAT1 est majoritairement présent dans le cytoplasme en l'absence de stimulation, cependant npSTAT1 peut éventuellement être importé dans le noyau par un mécanisme non conventionnel. Suite à son activation, pSTAT1 est transporté dans le noyau où il exerce ses fonctions biologiques. Il est ensuite déphosphorylé et retourne dans le cytoplasme. Cette navette nucléo-cytoplasmique est à un processus rapide ne durant que quelques minutes (Bromberg and Darnell, 2000; Marg et al., 2004). Si le mécanisme d'export nucléaire est identique en présence et en l'absence de stimulation, le mécanisme d'import nucléaire de STAT1 dépend, quant à lui, de l'état d'activation.

### 1.4.1 L'IMPORT NUCLEAIRE DE STAT1

Après stimulation par l'IFN $\gamma$ , le transport des dimères de pSTAT1 à travers les pores nucléaires met en jeu un processus actif qui fait intervenir les récepteurs du transport nucléaire nommés karyophérines ou importines. Le domaine DBD de STAT1 présente une séquence NLS dont la leucine L407 et les lysines K410 et K413 (figure 7) permettent sa reconnaissance par l'importine  $\alpha 5$  (McBride and Reich, 2003). Il a également été démontré que le domaine N-terminal de STAT1 est requis pour son import nucléaire sous forme activée. Ainsi, la conformation spatiale adoptée par le dimère pSTAT1 permet de former un complexe avec les importines (Antunes et al., 2011; Levy and Darnell, 2002). Le mécanisme d'import nucléaire comprend un transport actif impliquant l'hydrolyse de GTP par les petites protéines GTPases Ran (Sekimoto et al., 1996). Après hydrolyse du GTP, Ran-GDP reconnaît le complexe pSTAT1/importine  $\alpha 5$ /importine  $\beta$  (McBride and Reich, 2003).

Le complexe est ensuite dissocié, libérant les dimères de pSTAT1 qui pourront se fixer aux promoteurs de leurs gènes cibles (Levy and Darnell, 2002) (figure 7).

Le mécanisme d'import nucléaire de npSTAT1 implique une interaction directe entre son domaine linker et les nucléoporines Nup153 et Nup214, deux composants des pores nucléaires (Marg et al., 2004). Cette translocation nucléaire de npSTAT1 s'effectue indépendamment d'une phosphorylation et d'une consommation d'énergie (Cheon et al., 2011; Marg et al., 2004).

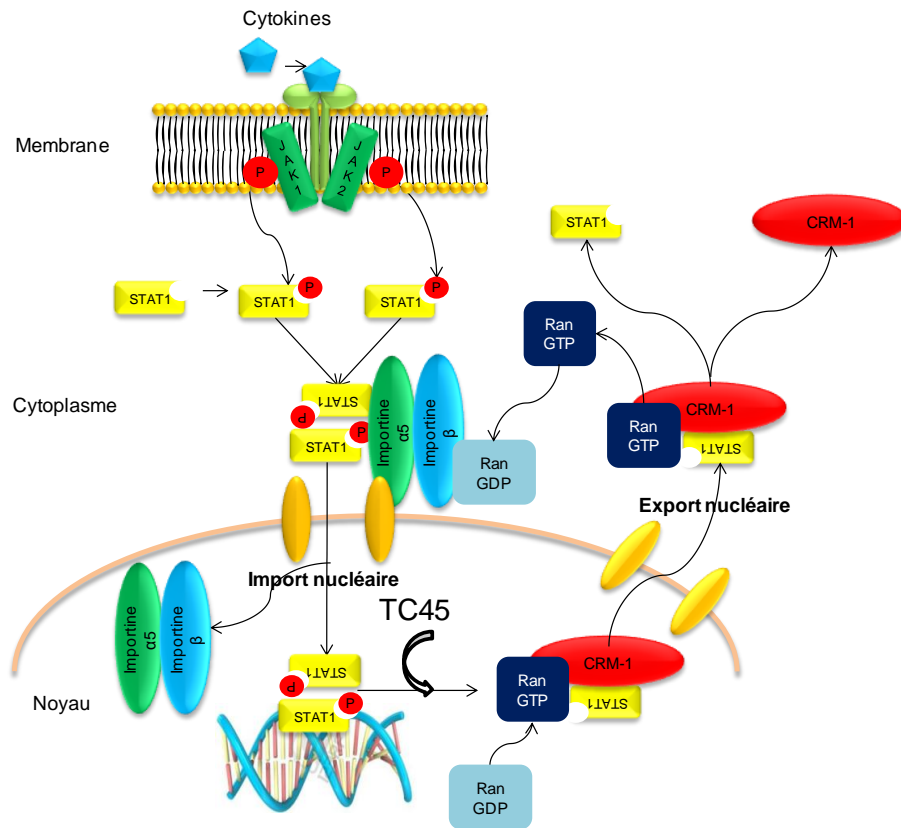


**Figure 7: Localisation du NLS dans les domaines structuraux et fonctionnels de STAT1.**

*H: Histidine, L: Leucine, Q: Glutamine, K: Lysine, E: acide glutamique, N: asparagine, A: Alanine. NLS: Nuclear Localization Site. Y: tyrosine, S: Sérine. Nter: N-terminal domain, CC: Coiled-coil domain, DBD: DNA Binding Domain, SH2: Src Homology domain 2, TAD: TransActivator Domain. 1 à 750: acides amines.*

#### 1.4.2 L'EXPORT NUCLEAIRE DE STAT1

L'export nucléaire de STAT1 nécessite au préalable la déphosphorylation de sa Y701 par la tyrosine phosphatase nucléaire TC45. L'absence de cette enzyme entraîne l'accumulation de pSTAT1 dans le noyau (Levy and Darnell, 2002). Le mécanisme d'export nucléaire de pSTAT1 le mieux décrit implique une interaction entre le NES présent dans le DBD de STAT1 (aa entre 392 à 413) et l'exportine-1 (ou CRM-1). Ce mécanisme est également dépendant de l'utilisation des GTPases Ran associées au GTP (McBride et al., 2000; Richards et al., 1997) (figure 8). En outre, un autre mécanisme d'export nucléaire impliquant un motif riche en leucine du domaine CC de STAT1 a également été décrit (Begitt et al., 2000; Levy and Darnell, 2002).



***Figure 8: Schéma récapitulatif de la navette nucléo-cytoplasmique de STAT1.***

*JAK: Janus Kinase, STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription.*

## 1.5 INHIBITIONS DE L'ACTIVITE DE STAT1

L'activation de STAT1 est un processus transitoire régulé qui dure de quelques minutes à quelques heures (Bowman et al., 2000). Il existe donc un mécanisme de régulation permettant l'inactivation de STAT1 grâce à la déphosphorylation de sa Y701 et par le biais d'autres modifications post-traductionnelles dont l'ubiquitinylation, la SUMOylation et l'acétylation (Kim and Lee, 2007) (tableau 2). Ces mécanismes touchant directement STAT1 sont complémentaires de ceux permettant de réguler les initiateurs des voies de signalisation conduisant à son activation, notamment au niveau des récepteurs membranaires par une inactivation de l'activité des JAKs qui leur sont associés.

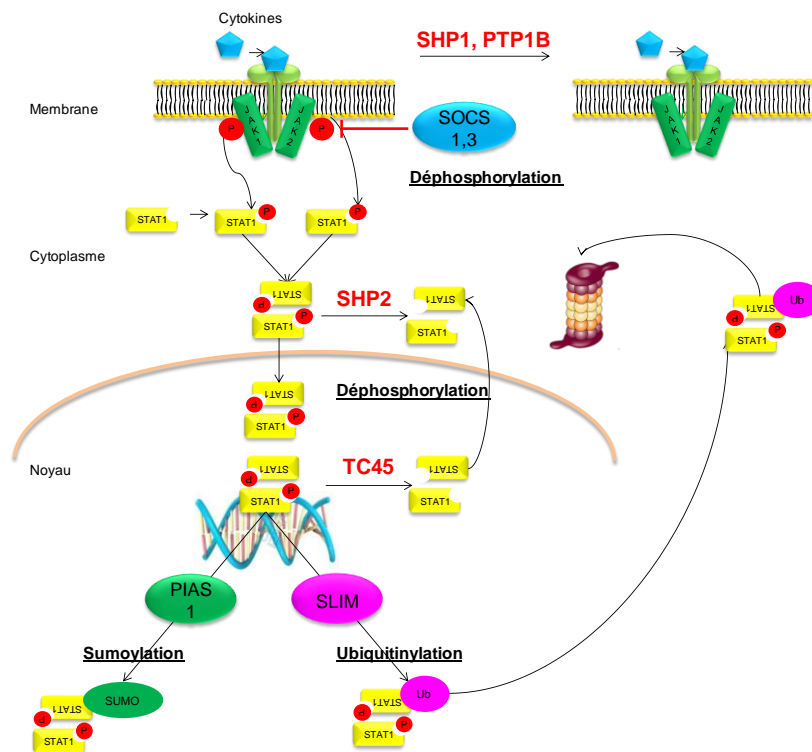
Modification inhibitrice	Site de modification	Stimulus activateur
Déphosphorylation	Tyrosine 701	IFN $\gamma$ IFN $\alpha/\beta$
	Sérine 727	TNF $\alpha$ ROS LPS IFN $\gamma$ IFN $\alpha/\beta$
Ubiquitinylation	non déterminé	IFN $\alpha$
Acétylation	Lysine 410 Lysine 413	IFN $\alpha$
SUMOylation	Lysine 703	IFN $\gamma$

**Tableau 2: Principales modifications post-traductionnelles inhibitrices de STAT1.**

## 1.5.1 MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DE STAT1

### 1.5.1.1 DEPHOSPHORYLATION

Il est considéré que l'inactivation de STAT1 correspond à la déphosphorylation de sa Y701 (Mertens et al., 2006). Celle-ci est effectuée par deux tyrosines phosphatases, *Src-Homology tyrosine Phosphatase 2* (SHP2) et TC45 qui appartiennent à la famille des *Protein Tyrosin Phosphatases* (PTPs). SHP2 intervient dans l'inactivation de STAT1 aussi bien au niveau nucléaire que cytoplasmique. Cette phosphatase permet également la déphosphorylation de sa S727 (Wu et al., 2002). TC45, qui agit majoritairement au niveau nucléaire, est considérée comme la principale phosphatase responsable de l'inactivation de STAT1 (Kim and Lee, 2007; Levy and Darnell, 2002; ten Hoeve et al., 2002). Son action implique une interaction directe avec le domaine N-terminal de STAT1 (Shuai et al., 1996). La déphosphorylation de la Y701 de STAT1 est un processus rapide intervenant dans les trente minutes suivant l'activation cellulaire et est requise pour l'export du noyau (Meyer et al., 2003) (figure 9).



**Figure 9: Régulation inhibitrice de la voie de signalisation JAK/STAT1.**

Les SOCS 1 et 3 (suppressors of cytokine signaling 1 and 3) sont des protéines qui régulent négativement STAT1 en agissant directement par leur domaine SH2 sur les tyrosines phosphorylées des JAKs. Les tyrosines phosphatases SHP1 et PTP1B agissent aussi sur les JAKs en les déphosphorylant. La TC45 et la SHP2 sont des PTPs (Protein Tyrosin Phosphatases) qui déphosphorylent les Y701 et S727 de STAT1. SHP2 agit aussi bien au niveau cytoplasmique que nucléaire. TC45 agit au niveau nucléaire. Les protéines PIAS (Protein Inhibitors of Activated STATs), dont PIAS1, bloquent l'interaction de STAT1 à l'ADN par SUMOylation. SLIM est une E3 ubiquitine ligase dont l'action favorise la dégradation protéasomale de STAT1. La CBP/p300 est une protéine à activité histone acétylase dont l'action inhibe l'activité transcriptionnelle de STAT1.

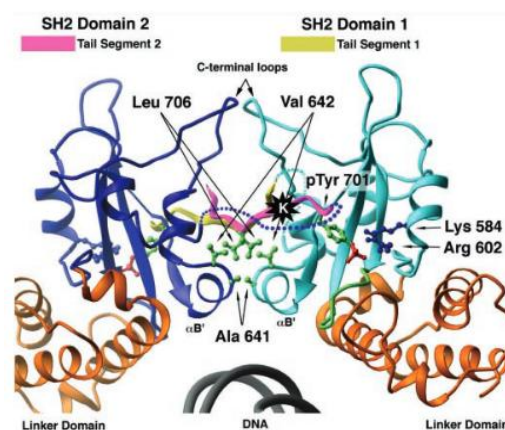
### 1.5.1.2 UBIQUITINYLATION

L'ubiquitinylation de STAT1 est effectuée par l'enzyme à activité E3 ligase *STAT-interacting LIM protein* (SLIM) dont l'action implique une interaction directe avec la tyrosine Y701 phosphorylée de STAT1. Ce processus est donc majoritairement nucléaire (Ungureanu et al., 2003). Cette modification post-traductionnelle de STAT1 favorise son export nucléaire puis sa dégradation par le protéasome. Bien qu'elle ne puisse être considérée comme une inactivation directe de STAT1, l'ubiquitinylation contribue donc à l'atténuation de ses effets biologiques, en diminuant le niveau global de son expression protéique. De plus, une inactivation de STAT1 peut accompagner le processus d'ubiquitinylation (Kim and Maniatis, 1996; Tanaka et al., 2005; Ungureanu and Silvennoinen, 2005) (figure 9).

En effet, SLIM favoriserait le recrutement de phosphatases nucléaires en jouant le rôle de protéine adaptatrice ou en induisant un changement conformationnel.

### 1.5.1.3 SUMOYLATION

La SUMOylation de STAT1 correspond à la fixation de SUMO sur la lysine 703 (K703) de son domaine TAD (figure 10). Cette modification post-traductionnelle est réalisée par l'intermédiaire des protéines à activité E3 ligase de la famille des *Protein Inhibitors of Activated STATs* (PIAS): PIAS1 et PIAS $\alpha$ . L'action de PIAS nécessite une interaction directe avec le domaine N-terminal de STAT1 (aa de 1 à 191) et requière la phosphorylation de sa Y701 (Liao et al., 2000). Ce processus est donc majoritairement nucléaire (Kim and Lee, 2007; Liu et al., 1998; Rogers et al., 2003; Stark and Darnell, 2012) (figure 9). Bien que les effets de la SUMOylation dépendent du gène cible considéré, cette modification post-traductionnelle tend à atténuer l'activité transcriptionnelle de STAT1 par l'intermédiaire de deux mécanismes (Begitt et al., 2011; Lim and Cao, 2006; Rogers et al., 2003; Song et al., 2006; Ungureanu et al., 2003). D'une part, la SUMOylation qui a lieu à l'interface des dimères de pSTAT1, entraîne un changement de leur conformation et leur déstabilisation (figure 10). D'autre part, ce processus est associé à un recrutement de la phosphatase TC45 qui inactive STAT1 (Rogers et al., 2003).



**Figure 10: Structure cristallographique des dimères STAT1 activés liant l'ADN et leurs sites de modifications post-traductionnelles.**

Les séquences consensus de SUMO sont en magenta et jaune. Les résidus leucine 706 (Leu 706) et tyrosine 701 phosphorylée (pTyr 701) sont des éléments critiques dans la stabilité de la formation des dimères. La lysine 703 (Lys 703) est indiquée par l'étoile noire. La structure est adaptée de Chen et al. (Rogers et al., 2003).

En outre, l'équipe de KA. Mowen a démontré que la méthylation de l'arginine 31 située dans le domaine N-terminal de STAT1 empêche la liaison des dimères de pSTAT1 avec PIAS1 et a donc un effet protecteur de STAT1 contre la SUMOylation. Cette méthylation de STAT1 augmente ainsi sa capacité de liaison à l'ADN et favorise sa rétention nucléaire (Mowen et al., 2001).

#### 1.5.1.4 ACETYLATION

---

Les protéines à activité *Histone AcetylTransferase* (HAT) telle que la CBP/p300 sont responsables de l'acétylation des K410 et K413 du DBD de STAT1 (Antunes et al., 2011; Zhuang, 2013). L'acétylation de STAT1 est classiquement associée à une inhibition de l'expression de ses gènes cibles et donc de ses effets biologiques (Ginter et al., 2012). L'équilibre entre les activités de la CBP/p300 et des histones désacétylases (HDACs) contribue donc à la régulation de l'activité de STAT1 (Kramer et al., 2009) (figure 9). Le mécanisme sous-jacent demeure discuté. Il pourrait faire intervenir un recrutement de la phosphatase TC45 responsable de l'inactivation de STAT1 (Ginter et al., 2012; Kramer et al., 2009). D'autre part, l'acétylation de STAT1 contribue à ses effets biologiques par d'autres mécanismes notamment dans l'apoptose cellulaire. Il a par exemple été démontré que l'acétylation de STAT1 le rend capable d'interagir avec NF- $\kappa$ B dont la fixation aux promoteurs de ses gènes cibles est alors inhibée. L'acétylation de STAT1 est donc associée à une inhibition de l'activité transcriptionnelle de NF- $\kappa$ B qui aboutit à l'apoptose cellulaire (Zhuang, 2013).

### 1.5.2 INHIBITION DU RECEPTEUR

#### 1.5.2.1 SOCS

---

Les *Suppressors Of Cytokine Signaling* (SOCS) interagissent *via* leur domaine SH2 avec les tyrosines phosphorylées des JAKs associées à des récepteurs membranaires et inhibent ainsi leur voie de signalisation. Cette interaction inhibe l'activité kinase des JAKs et empêche le recrutement des effecteurs des voies de signalisation concernées tels que les STATs, les MAP kinases ou la PI3 kinase.



La signalisation des IFNs aboutit en outre à l'activation de STAT1 qui régule lui-même l'expression de nombreux gènes cibles dont ceux de SOCS1 et de SOCS3 (Cooney, 2002; Lim and Cao, 2006). L'augmentation de l'expression de ces deux SOCS aboutit à l'arrêt de la signalisation à partir des récepteurs des IFNs (Cooney, 2002). En modulant la durée d'activation des voies de signalisation des IFNs, les SOCS contribuent donc à la régulation des effets biologiques de STAT1 (Kim and Lee, 2007) (figure 9).

#### **1.5.2.2 DEPHOSPHORYLATION DES JAKs**

---

Certaines SHPs et PTPs responsables de l'inactivation de STAT1 sont également impliquées dans l'arrêt de la signalisation à partir des récepteurs par une déphosphorylation des JAKs. Les phosphatases SHP1 et SHP2 interagissent directement sur les récepteurs et conduisent à la déphosphorylation de JAK1 et de JAK2 (David et al., 1995; Wu et al., 2002). La PTP1B inhibe JAK2 et TYK2 (Myers et al., 2001). Ces déphosphorylations des JAKs contribuent bien évidemment aussi à la régulation des effets biologiques de STAT1 (figure 9).

# CHAPITRE II. ROLES DE STAT1

## 2.1 DEFICIENCES EN STAT1

Les déficiences en STAT1 associées à une absence de signalisation en réponse aux IFNs, ont été à la fois décrites dans des modèles murins et identifiées chez l'homme. Les pathologies associées à cette déficience en STAT1 ont contribué à la mise en évidence de ses principales fonctions dans le cadre de l'immunité innée et d'une activité anti tumorale.

Le premier modèle de souris déficientes pour STAT1 a été obtenu en 1996 (Durbin et al., 1996; Meraz et al., 1996). Ces souris se développent normalement mais présentent un défaut de réponse immunitaire (Boisson-Dupuis et al., 2012; Meraz et al., 1996). En effet, malgré un nombre normal de leucocytes, elles présentent une susceptibilité accrue aux infections bactériennes et virales témoignant du rôle essentiel de STAT1 dans l'immunité innée (Boisson-Dupuis et al., 2012; Durbin et al., 1996).

De plus, après implantation sous cutanée de cellules issus de mélanomes, le développement de tumeurs est favorisé chez les souris déficientes pour STAT1 (Lesinski et al., 2003). Ces études sur le modèle murin ont mis en évidence le rôle anti-tumoral de STAT1.

Chez l'homme, de très rares cas de déficiences en STAT1 ont été décrits. Six cas de déficience complète et cinq cas de déficience partielle ont été identifiés chez des patients immunodéficients. Cette immunodéficience s'avère mortelle dans presque tous les cas de déficience complète en STAT1 comme l'illustre l'historique pathologique de deux d'entre eux:

Le premier patient atteint d'une forme complète de déficience en STAT1 (SD1) originaire d'Arabie Saoudite, a été décrit en 2003 par le Dr. S. Boisson-Dupuis (Boisson-Dupuis et al., 2012; Dupuis et al., 2003). Le gène *STAT1* présentait une substitution T → C dans l'exon 20. Cette mutation était associée à une altération de l'expression de l'ARNm de STAT1 (STAT1 $\alpha$  et STAT1 $\beta$ ) qui était diminuée de moitié. En outre, cette substitution dans la région codante du gène *STAT1* permettait de prédire le remplacement du résidu conservé de leucine en position 600 dans le domaine SH2 de la protéine STAT1 par une proline (L600P). Cependant, une absence complète d'expression de la protéine STAT1 a été observée.

Ce patient avait développé une infection au BCG (Bacille Calmette-Guérin) dès l'âge de trois mois et une première infection virale par HSV-1 à l'âge de douze mois qui s'est étendue au cerveau et à la peau. Après une courte période de rémission, une nouvelle infection par le HSV-1 a entraîné la mort du patient à l'âge de seize mois.

L'équipe de JL Casanova a également décrit le second patient présentant une déficience complète en STAT1 (SD2) (Chaggier et al., 2006). Ce patient, originaire du Pakistan, présentait une mutation homozygote 1928insA du gène *STAT1*. Cette insertion a engendré un décalage du cadre de lecture conduisant à l'introduction d'un codon Stop prématuré, à une absence complète de l'expression des ARNm et de la protéine STAT1. Ce patient a subi une transplantation de moelle osseuse à l'âge de huit mois sans effet sur l'amélioration de sa qualité de vie. Soixante-dix jours post-transplantation, il a développé une infection fulminante par l'EBV. Le patient est décédé à l'âge de onze mois suite à la susceptibilité accrue qu'il présentait aux différentes infections bactériennes et virales.

## 2.2 ROLE DE STAT1 DANS L'IMMUNITÉ

### 2.2.1 ROLE DE STAT1 DANS L'IMMUNITÉ INNÉE

Les déficiences en STAT1 observées aussi bien dans les modèles animaux que chez l'homme ont montré un rôle capital de STAT1 dans les réponses immunitaires. En effet, STAT1, qui est le principal effecteur des IFNs, joue un rôle essentiel dans l'immunité innée à plusieurs niveaux. En effet, il exerce une activité antivirale par un arrêt de la traduction et de la réplication virale et une activité antibactérienne en favorisant la phagocytose par les macrophages et la cytotoxicité par les LTs CD8. Il contribue également à la modulation de la présentation antigénique et de la différenciation des lymphocytes T. Ces différents mécanismes d'action de STAT1 dans l'immunité innée montre un large spectre de son importance dans ce système.

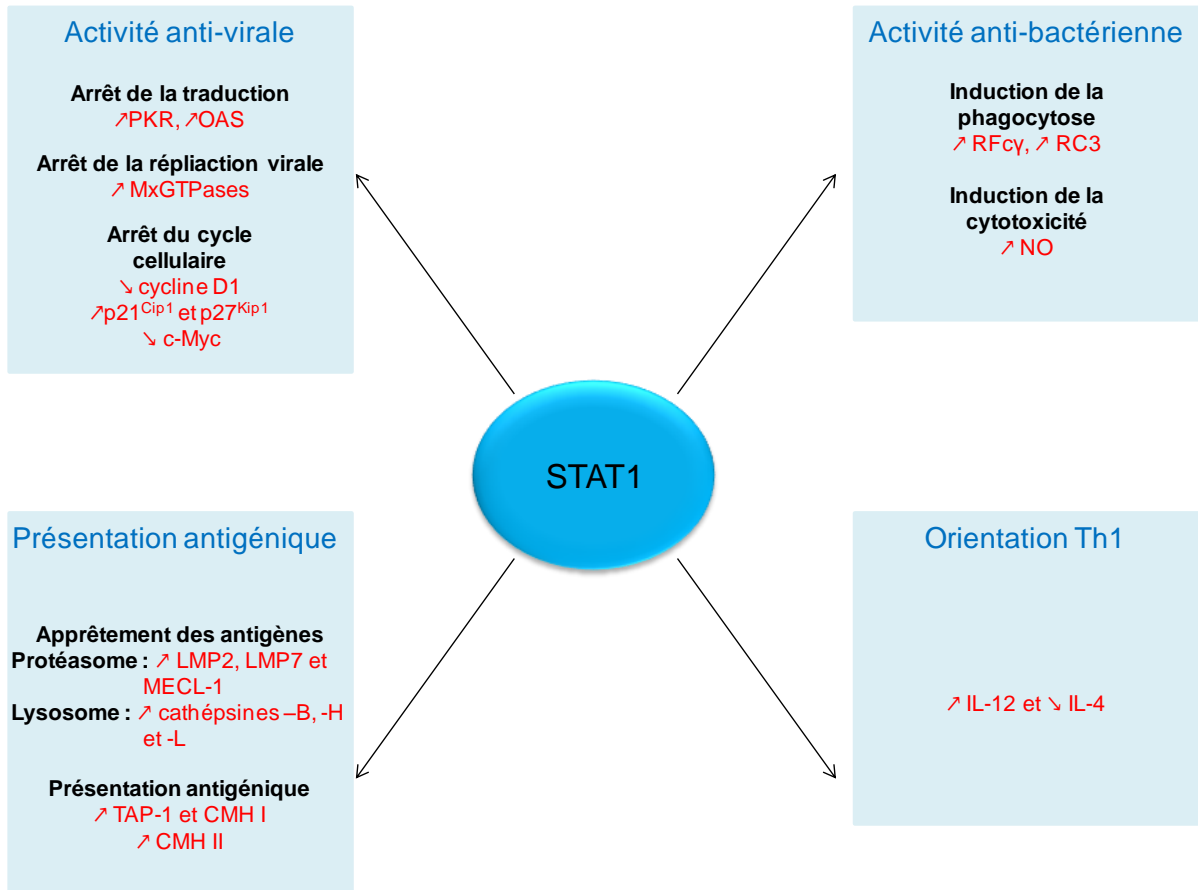
### 2.2.1.1 ACTIVITE ANTIVIRALE

---

L'activité antivirale de STAT1 se caractérise d'une part par un arrêt de la traduction des ARNm viraux en augmentant l'expression de la « *Protein Kinase R* » (PKR) et des « 2'5' *OligoAdenylate Synthetase* » (OAS) et par d'autres mécanismes favorisant un arrêt de la réplication virale (Chesler and Reiss, 2002; Goodbourn et al., 2000; Pulit-Penaloza et al., 2012; Schroder et al., 2004; Wong et al., 1997).

Lors de l'infection virale, la PKR, sérine/thréonine kinase sous forme inactive, est activée par les ARN doubles brins viraux (ARNdb) qui se fixent au domaine dRBD (domaine N-terminal) de la PKR, permettant ainsi un changement de conformation de celle-ci et son autophosphorylation, exposant ainsi son domaine kinase. La PKR exerce son activité antivirale en phosphorylant eIF2 $\alpha$ , facteur d'initiation de la traduction. La séquestration résultante du facteur eIF2B entraîne l'arrêt de la traduction virale (Chesler and Reiss, 2002; Goodbourn et al., 2000; Sadler and Williams, 2008). STAT1 augmente les effets de la PKR par deux types de mécanisme. D'une part, il a été démontré qu'après stimulation par l'IFN $\alpha$ , STAT1 augmente l'expression de la PKR par l'intermédiaire de la séquence ISRE située dans son promoteur (Khine and Lingwood, 2000).

D'autres études ont mis en évidence après stimulation par les IFNs, une interaction protéique directe entre STAT1 et la PKR qui accentue les effets de la PKR sur la traduction virale (Wong et al., 2001). Les domaines de STAT1 et de la PKR impliqués dans cette interaction demeurent aujourd'hui discutés (Garcia et al., 2006; Schroder et al., 2004; Wong et al., 2001; Wong et al., 1997) (tableau 1, figure 11).



***Figure 11: Rôles de STAT1 dans l'immunité innée.***

En participant à la formation d'un complexe ISGF3, STAT1 augmente aussi la transcription et donc l'expression des OAS (2'5'Oligoadenylate Synthetase) en se fixant sur la séquence ISRE de leur promoteur (Pulit-Penaloza et al., 2012) (tableau 1, figure11). La présence d'ARNs simples brins viraux (ARNsb) active les OAS qui synthétisent des oligomères d'ATP (extrémités 2'5' oligoadénylates). Ce processus entraîne l'activation par dimérisation de la RNase L qui dégrade à son tour les ARNsb modifiés menant à l'inhibition de la synthèse protéique. L'augmentation de l'expression des OAS par STAT1 contribue donc à son effet d'arrêt de la traduction virale (Chesler and Reiss, 2002; Goodbourn et al., 2000).

L'activité antivirale de STAT1 est également due à un arrêt de la réplication virale (figure 11). En effet, STAT1 augmente l'expression des MxGTPases (Myxovirus GTPases) (Stevenson et al., 2011). Ces protéines s'assemblent entre elles et se lient aux protéines de la nucléocapside virale. Elles piègent ainsi les composants viraux au niveau cytoplasmique, bloquent leur translocation nucléaire et leur transcription, favorisant la dégradation de la particule virale (Cheon and Stark, 2009; Sadler and Williams, 2008; Stevenson et al., 2011).

D'autre part, STAT1 inhibe la réplication virale par ses effets sur le cycle cellulaire qui seront décrits au chapitre 2.3 (Avalle et al., 2012; Chin et al., 1996; Dimco et al., 2010; Gough et al., 2008; Regis et al., 2008) (figure 11).

### 2.2.1.2 ACTIVITE ANTIBACTERIENNE

Par l'intermédiaire d'un complexe transcriptionnel avec le facteur PU1, STAT1 augmente l'expression du récepteur Fc $\gamma$  1 (RFc $\gamma$ 1) et du récepteur au Complément 3 (RC3) à la surface des phagocytes tels les macrophages. Ces récepteurs sont capables de reconnaître la partie constante des immunoglobulines ayant elles même reconnues les particules bactériennes. En augmentant l'expression de ces récepteurs, STAT1 favorise ainsi la phagocytose des particules bactériennes (Aittomaki et al., 2000; Dominici et al., 2012) (figure 11).

STAT1 exerce aussi son activité antibactérienne par l'augmentation de l'activité cytotoxique des macrophages en induisant leur production de monoxyde d'azote (NO). En effet, dans ces cellules, STAT1 se fixe sur le promoteur d'IRF1 et augmente son expression. IRF1 se fixe à son tour sur le promoteur de l'*inducible Nitric-Oxide Synthase* (iNOS) et induit son expression (tableau 1, figure 11). L'augmentation de l'expression de cette enzyme favorise la production et la libération de NO par les macrophages (tableau 1) (Lohoff and Mak, 2005; Macatonia et al., 1995).

### 2.2.1.3 MODULATION DE LA PRESENTATION ANTIGENIQUE

#### A) APPRETEMENT DES ANTIGENES

Concernant l'apprêtement antigénique, STAT1 joue à la fois un rôle au niveau du protéasome et des lysosomes.

Après activation par l'IFN $\gamma$ , STAT1 augmente l'expression des sous unités enzymatiques LMP2, LMP7 et MECL-1 constituant de l'immunoprotéasome (tableau 1 et 3). STAT1 favorise ainsi la diversification des peptides issus du protéasome qui seront présentés par le Complexe Majeur d'Histocompatibilité I (CMH I) (Schroder et al., 2004) (figure 11).

STAT1 augmente également l'expression des cathépsines -B, -H et -L qui dégradent les peptides au sein des lysosomes. STAT1 augmente ainsi l'activité du compartiment lysosomal et la production de peptides présentés par le CMH II (Schroder et al., 2004) (figure 11).

## B) LA PRESENTATION ANTIGENIQUE

---

Suite à son activation par l'IFN $\gamma$ , STAT1 augmente également l'expression de composants essentiels de la présentation antigénique comme le *Transporter in Ag processing-1* (TAP-1) (tableau 1), le CMH I et le CMH II par l'augmentation de l'expression de *Class II of MHC TransActivating protein* (CIITA).

L'expression de TAP-1 favorise la présentation antigénique par le CMH I. Ainsi, l'augmentation de l'expression de TAP-1 par STAT1 est essentielle pour la translocation des peptides antigéniques dans la lumière du réticulum endoplasmique. Ces peptides seront ensuite assemblés avec les molécules du CMH I avant d'être exposés à la membrane par les cellules immunitaires (Epperson et al., 1992; Schroder et al., 2004) (figure 11).

L'augmentation de l'expression du CMH II est régulée transcriptionnellement par STAT1 qui se fixe sur le promoteur de CIITA, régulateur transcriptionnel du CMH II, conduisant ainsi à son expression et à celle du CMH II (Muhlethaler-Mottet et al., 1998; Schroder et al., 2004) (figure 11).

### 2.2.1.4 MODULATION DE LA DIFFERENCIATION DES LYMPHOCYTES T

---

La différenciation des lymphocytes T auxiliaires (LTs) se trouve à l'interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Schématiquement, deux types de différenciation peuvent être distingués: les *LT helper 1* (Th1) qui favorisent l'immunité à médiation cellulaire et les *LT helper 2* (Th2) qui favorisent la production d'anticorps.

L'IFN $\gamma$  est la cytokine majeure de l'orientation Th1. L'IFN $\gamma$  induit la production d'IL-12 par les macrophages favorisant ainsi l'orientation Th1 des LTs. Parallèlement, l'IFN $\gamma$  inhibe la production d'IL-4 par les cellules mastocytaires, empêchant ainsi la différenciation des lymphocytes Th2 (Lohoff and Mak, 2005; Schroder et al., 2004) (figure 11). L'effet des deux cytokines se réprime l'un l'autre dans la différenciation des lymphocytes Th1 et Th2.

Dans les LTs, l'activation de STAT1 par l'IFN $\gamma$  permet sa fixation sur le promoteur de T-bet augmentant ainsi son expression. T-bet, facteur de transcription essentiel dans l'orientation Th1, induit l'expression de l'IFN $\gamma$  et celle de la sous unité  $\beta$ 2 du récepteur à l'IL-12 (IL-12 $\beta$ 2R) ce qui facilite ainsi la signalisation intra-lymphocytaire de l'IL-12. De plus, l'activation de STAT1 dans les LTs inhibe la transcription et la production d'IL-4 par ces cellules contribuant ainsi à l'orientation de leur différenciation Th1 (tableau 1) (Afkarian et al., 2002; Lohoff and Mak, 2005; Yang et al., 2007).

L'activation de STAT1 favorise l'orientation Th1 également aux dépens de l'orientation Th17 qui est impliquée dans les pathologies inflammatoires et auto-immunes (Batten et al., 2006; Hu and Ivashkiv, 2009; Villarino et al., 2010). Suite à une stimulation par l'IL-27 ou l'IFN $\gamma$ , deux mécanismes de STAT1 ont été décrits pour expliquer cette mise en défaut de l'orientation Th17. Le premier d'entre eux dépend de l'expression de T-bet qui est induite par STAT1. Classiquement, *Runt-related transcription factor 1* (Runx-1) et *RAR-related orphan receptor  $\gamma$ t* (ROR $\gamma$ t), qui sont deux facteurs de transcription essentiels à la différenciation Th17, forment un complexe transcriptionnel régulant l'expression du gène codant la protéine ROR $\gamma$ t. T-bet interrompt cette boucle amplificatrice qui favorise la différenciation Th17 *via* une interaction directe avec Runx-1 qui empêche la fixation du complexe Runx-1/ROR $\gamma$ t sur le gène codant ROR $\gamma$ t (Lazarevic et al., 2011). Le second mécanisme d'action de STAT1 inhibant la différenciation Th17 est indépendant de T-bet et implique une interférence sur les effets de STAT3. En effet, le gène codant l'IL-17, dont l'expression est caractéristique de l'orientation Th17, est une des cibles transcriptionnelles de STAT3 qui contribue donc à la différenciation Th17 (Chen et al., 2006).

### 2.2.2 ROLE DE STAT1 DANS L'IMMUNITE ADAPTATIVE

Contrairement à l'implication de STAT1 dans l'immunité innée, son rôle dans le cadre de l'immunité adaptative a été peu décrit.



Ce rôle s'applique notamment dans l'expression des immunoglobulines (Ig) par les lymphocytes B (LBs) et a constitué l'un des objectifs de mes travaux de thèse.

### 2.2.2.1 EXPRESSION DES IMMUNOGLOBULINES PAR LES LB MATURES

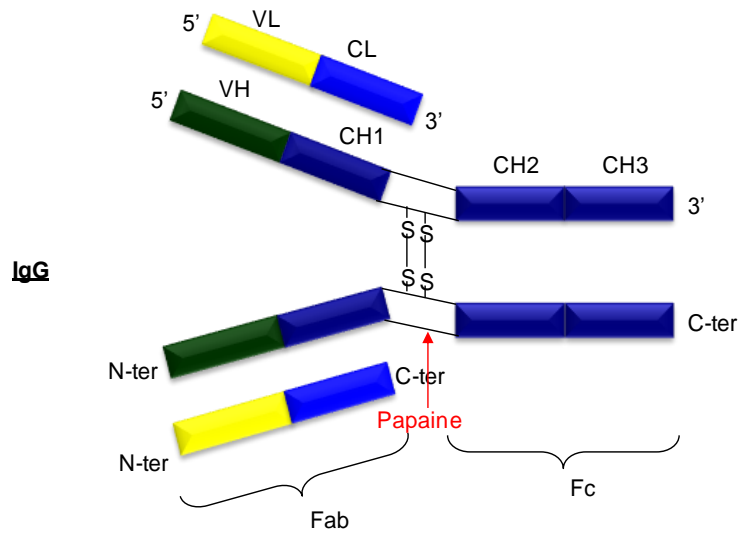
---

Les LBs matures issus de la moelle osseuse n'ont pas encore rencontré l'antigène et sont donc naïfs. Ils expriment à la fois des IgM et des IgD à leur surface. Suite à la rencontre antigénique dans les organes lymphoïdes secondaires tels la rate et les ganglions lymphatiques, les LBs alors activés, vont poursuivre leur maturation (LeBien and Tedder, 2008; Tobon et al., 2013). Au cours de ce processus, les gènes des Ig vont subir des remaniements dont la commutation de classe ou CSR (*Class Switch Recombination*) qui aboutit au changement de classe de l'Ig exprimée par les LBs dont par exemple l'expression d'une IgG. Au cours de la réponse immunitaire, ces LBs matures activés pourront devenir des LBs mémoires ou encore des plasmocytes producteurs d'Ig sécrétées.

#### A) STRUCTURE ET FONCTION DES IMMUNOGLOBULINES

---

Les Ig sont constituées de deux chaînes lourdes (*heavy* ou H) et de deux chaînes légères (*light* ou L) identiques deux à deux et reliées par des ponts disulfure (Schroeder and Cavacini, 2010). Chaque chaîne est formée d'un domaine N-terminal variable (V) qui contribue à la reconnaissance spécifique de l'antigène et d'un ou plusieurs domaines C-terminaux constants (C) (figure 12) (Schroeder and Cavacini, 2010). Les domaines constants de la chaîne lourde d'une Ig définissent son isotype ou sa classe et sa sous-classe. Chez l'homme, il existe cinq isotopes différents correspondants aux IgM, IgD, IgG, IgA et IgE, ainsi que quatre sous-classes d'IgG (IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4) et deux sous-classes d'IgA (IgA1 et IgA2). L'action de la papaine sur les Ig engendre la libération du fragment cristallisable Fc et de deux fragments Fab (*fragment antigen binding*). Le fragment Fc des Ig est reconnu par le système du complément qu'il active et par les récepteurs Fc exprimés à la surface des cellules effectrices de l'immunité telles les macrophages. Chaque récepteur Fc étant spécifique d'une classe et d'une sous-classe d'Ig, la réponse immunitaire dépend de l'isotype des Ig (Tobon et al., 2013).



**Figure 12: Structure schématique de la molécule IgG.**

*L: Light chain, H: Heavy chain, V: domaine variable, C: domaine constant, N-ter: extrémité N-terminale, C-ter: extrémité C-terminale, S-S: ponts disulfures, Fc: fragment constant, Fab: Fragment liant l'antigène. Papaine: enzyme dont l'action sur une Ig libre un fragment Fc et deux fragments Fab.*

## B) LA COMMUTATION DE CLASSE DES IMMUNOGLOBULINES

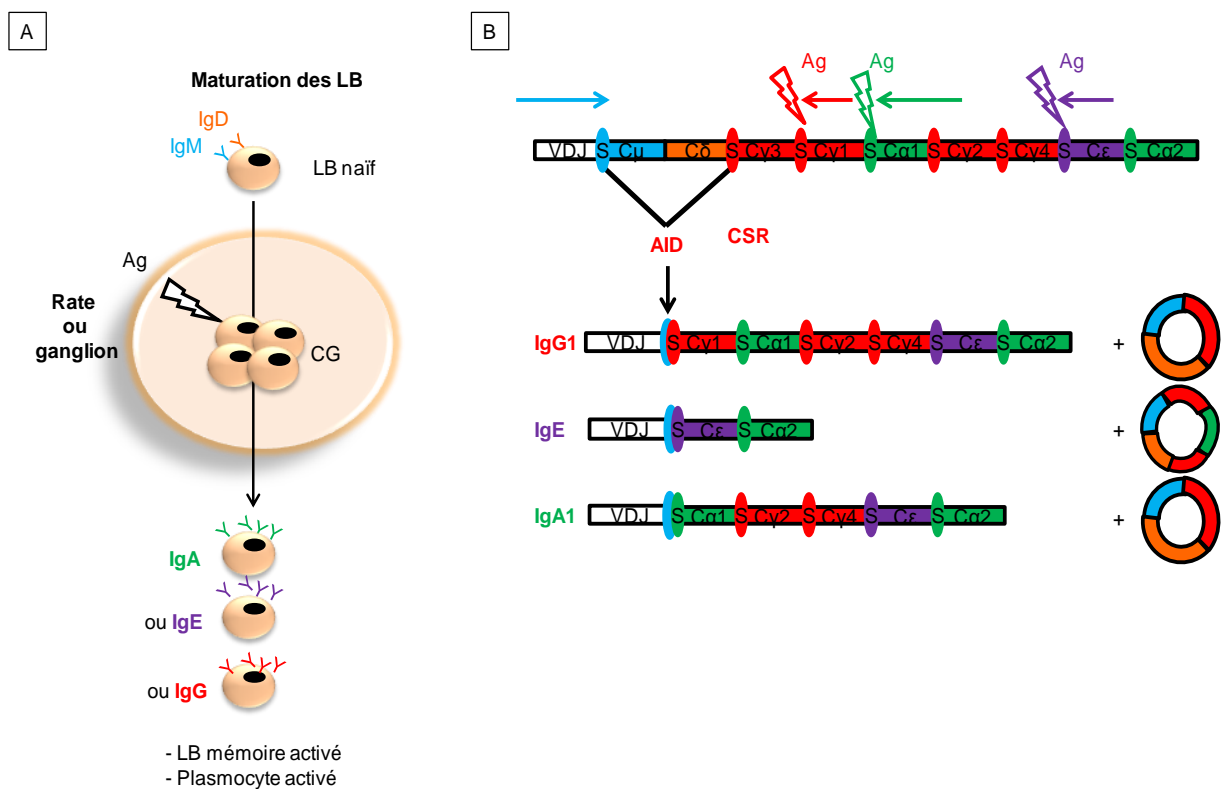
Les LBs matures naïfs expriment à leur surface deux types de récepteurs à l'antigène (*B cell receptor* ou BCR) dont la composition comprend soit une IgM soit une IgD qui diffèrent par la région constante de leur chaîne lourde (IgH) (LeBien and Tedder, 2008; Tobon et al., 2013). L'expression concomitante de ces deux immunoglobulines dans un même LB est due à l'épissage alternatif d'un transcrite primaire commun du gène codant IgH (Chaudhuri and Alt, 2004; Schroeder and Cavacini, 2010).

La région du chromosome 14 codant IgH (Tobon et al., 2013) comprend plusieurs régions distinctes:

- une région *Variable Diversity Joining* (VDJ) qui a été réarrangée lors des étapes précoces de la maturation des LBs dans la moelle osseuse et code pour la région variable d'IgH.
- neuf segments  $C_H$  fonctionnels codant la région constante spécifique de chaque classe et de sous-classe d'Ig parmi lesquels  $C_\mu$  et  $C_\delta$  codent pour les IgM et les IgD. Les gènes  $C_{\gamma 3}$ ,  $C_{\gamma 1}$ ,  $C_{\alpha 1}$ ,  $C_{\gamma 2}$ ,  $C_{\gamma 4}$ ,  $C_\epsilon$  et  $C_{\alpha 2}$  codant respectivement les régions constantes des IgG3, IgG1, IgA1, IgG2, IgG4, IgE et IgA2 (Chaudhuri and Alt, 2004; Schroeder and Cavacini, 2010) ne sont pas exprimés (figure 14).

La rencontre des LBs matures naïfs avec leur antigène au sein des organes lymphoïdes secondaires va permettre leur activation, leur prolifération et différentes étapes de maturation. Leur prolifération conduit à la formation des centres germinatifs où se produisent deux des étapes de leur maturation correspondant chacune à un remaniement du gène IgH: l'hypermutation somatique (SHM) qui correspond à l'introduction de mutations dans la région variable du gène IgH aboutissant à une augmentation de l'affinité de l'Ig pour son antigène (Chaudhuri and Alt, 2004; Schroeder and Cavacini, 2010; Tobon et al., 2013) et la commutation de classe (*Class Switch Recombination* ou CSR).

La CSR correspond à un remaniement du gène IgH au niveau des régions C<sub>H</sub> qui entraîne le changement isotypique de l'Ig exprimée par le LB (Klein and Dalla-Favera, 2008; LeBien and Tedder, 2008). Les LB matures activés exprimant une IgM et une IgD à l'entrée du centre germinatif, exprimeront une IgG, une IgE ou une IgA après avoir effectué la CSR (figure 13).



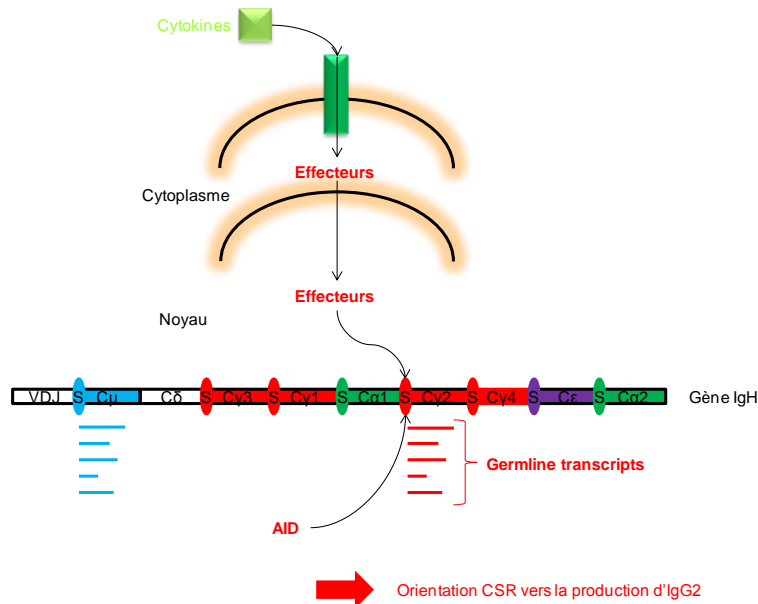
**Figure 13: Mécanisme de la CSR.**

*A: Vue d'ensemble de la CSR. B: Remaniement du locus IgH au cours de la CSR. Le LB naïf quittant la moelle osseuse, exprime à sa surface des IgM et des IgD. Son locus codant IgH contient les gènes de chacune des régions constantes (C<sub>H</sub>). Chaque gène C<sub>H</sub> est précédé d'un promoteur contrôlant sa transcription et d'une région switch (S) riche en guanine/cytosine. Il migre vers les organes lymphoïdes secondaires tels que la rate ou le ganglion où il va rencontrer l'antigène (Ag). Suite à la stimulation antigénique, l'AID agit sur les régions S. Une recombinaison entre la région S<sub>μ</sub> et une des autres régions S a lieu et s'accompagne de libération des switch circles excisés. A l'issue de la CSR, les LBs expriment des IgG, des IgA ou des IgE.*

Le mécanisme de la CSR fait intervenir des séquences d'ADN appelées régions switch (S) (Chaudhuri and Alt, 2004) qui sont situées en amont de chaque gène  $C_H$ , excepté  $C_\delta$ . Lors de l'activation par la liaison à l'antigène, le LB est soumis à plusieurs stimulations activatrices dont celles des cytokines du centre germinatif qui permettent l'induction de l'expression d'ARN appelés *germline transcripts* issus de la transcription spécifique de certains gènes  $C_H$ . Ce processus de transcription actif favorise l'accès à la région S du gène  $C_H$  concerné (Chaudhuri and Alt, 2004) (figure 13). Cette région S et la région  $S_\mu$  deviennent alors les cibles de l'*Activation-Induced cytidine Deaminase* (AID) dont l'expression a elle aussi été augmentée par différents stimuli. L'AID désamine les cytidines des régions S qui deviennent des résidus d'uracile. Ceux-ci sont pris en charge par l'*Uracil-DNA Glycosylase* (UNG) qui excise les résidus d'uridine du squelette pentose-phosphate (Chaudhuri and Alt, 2004). L'action de l'*Apurinique/ Apyrimidique Endonuclease 1* (APE1) aboutit alors à la cassure double brin de l'ADN (Chaudhuri et al., 2003; Pieper et al., 2013). Les stimuli associés au déclenchement de la CSR entraînent ainsi deux cassures doubles brin du gène IgH au niveau de la région  $S_\mu$  et au niveau d'une seconde région S comme la région  $S_{\gamma 1}$  par exemple. La poursuite de la CSR aboutit à la formation d'une molécule d'ADN circulaire appelée *switch circle* qui correspond à la région du gène IgH excisée entre les régions  $S_\mu$  et  $S_{\gamma 1}$ , et à la libération du gène IgH remanié dans lequel le gène  $C_{\gamma 1}$  est immédiatement en aval de la région VDJ (Chaudhuri et al., 2003; Shinkura et al., 2003). Le LB mature activé ayant subi la CSR n'exprime alors plus d'IgM ni d'IgD mais une IgG1 dans cet exemple. Chaque région constante étant reconnue par différents récepteurs, la CSR contribue ainsi à modifier le type de réponse immunitaire.

Certains mécanismes utilisés dans la CSR sont communs à ceux mis en œuvre au cours de la réparation des cassures double brin de l'ADN faisant notamment intervenir des complexes protéiques dont le système MMR (Chaudhuri and Alt, 2004; Grigera et al., 2013; Schrader et al., 2002). Au cours de ma thèse, nous avons mis en évidence l'implication à la fois de STAT1 dans ces complexes de réparation et dans l'expression des immunoglobulines.

L'orientation de la CSR qui aboutit à l'expression d'une classe d'Ig donnée par le LB, est dépendante du type de stimuli déclencheur du processus. Par exemple, il a été démontré chez la souris qu'une stimulation des LBs par des lipopolysaccharides et l'IL4 orientait la CSR vers  $C_{\gamma 1}$  et  $C_\epsilon$  alors qu'une stimulation par le LPS et l'IFN $\gamma$  orientaient la CSR vers  $C_{\gamma 2a}$  (Chaudhuri and Alt, 2004; Xu et al., 2012) (figure 14).



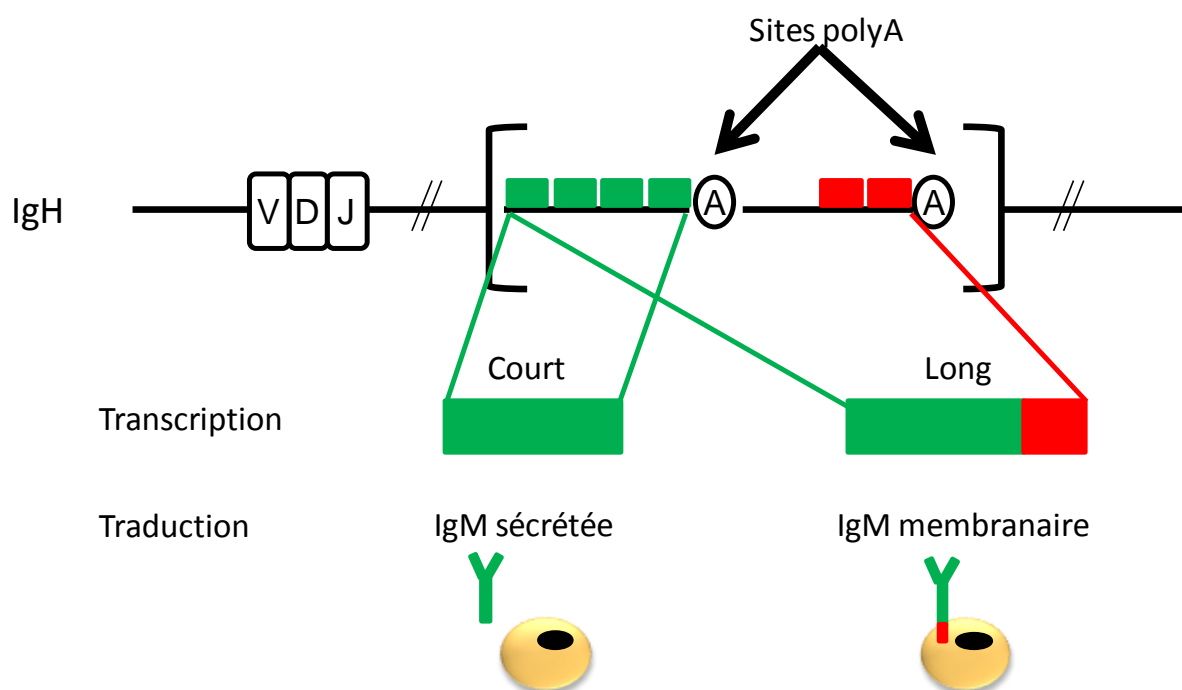
**Figure 14: Orientation de la CSR.**

La régulation et le déclenchement de la CSR sont sous le contrôle de facteurs de transcription dont ceux régulant l'expression des enzymes effectrices de ce processus. Il a ainsi été démontré que *PAired-box Protein 5* (Pax5) et IRF8, encore appelé *Interferon Consensus Sequence Binding Protein* (ICSBP), induisent directement la transcription de l'AID (Klein and Dalla-Favera, 2008; Lee et al., 2006). De plus, le facteur de transcription répresseur *B cell lymphoma 6* (BCL6) qui est nécessaire à la formation des centres germinatifs, est également impliqué dans la régulation de l'expression de l'AID et l'UNG (Alinikula et al., 2011). Il a ainsi été récemment démontré que BCL6 induit indirectement l'expression de l'AID en réprimant l'expression de miR-155 (Basso et al., 2012). Enfin, IRF8 et STAT5B qui induisent la transcription de BCL6, contribuent donc également par son intermédiaire au déclenchement de la CSR (Lee et al., 2006; Scheeren et al., 2005) (figure 16).

Suite aux différentes étapes de maturation déclenchées par la rencontre avec leur antigène, les LBs matures activés n'expriment plus qu'une classe d'Ig à leur surface correspondant à une IgG, une IgA ou une IgE. Au cours de la réponse immunitaire, ces LBs deviennent soit des LBs mémoires, soit des plasmocytes (Pieper et al., 2013) (figure 13).

### C) LA DIFFERENCIATION PLASMOCYTAIRE

Les LBs ayant subi la différenciation plasmocytaire ont pour principale fonction de sécréter des Ig qui permettent l'opsonisation des agents pathogènes. C'est pourquoi, contrairement à la situation observée dans les LBs mémoires, la grande majorité des Ig exprimées par les plasmocytes ne présentent pas de domaine d'ancrage à la membrane et sont sécrétées. L'obtention d'une Ig sous forme membranaire ou sécrétée dépend du choix entre deux sites de polyadénylation lors de la transcription du gène  $C_H$  de l'IgH (Phillips et al., 2004) (figure 15). Plusieurs exons de la région  $C_H$  codant le domaine d'ancrage membranaire de l'Ig sont transcrits uniquement lorsque le site de polyadénylation membranaire est choisi.

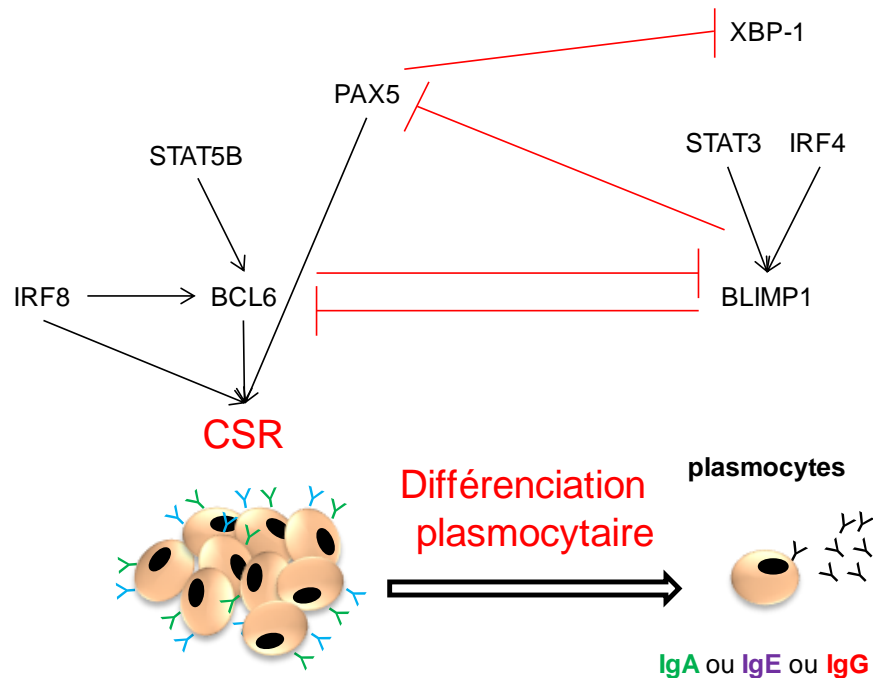


***Figure 15: Modèle schématique de l'épissage par polyadénylation d'une Immunoglobuline (ici IgM).***

La régulation de la différenciation plasmocytaire dépend principalement du facteur de transcription répresseur *B lymphocyte Induced Maturation Protein 1* (BLIMP1) dont l'expression est directement induite par STAT3 et IRF4 (De Silva et al., 2012; Diehl et al., 2008; Kwon et al., 2009; Nutt et al., 2011). BLIMP1 réprime la transcription de nombreux gènes dont Pax5 et BCL6 qui sont impliqués dans la régulation de la CSR (Cimmino et al.,

2008; Lin et al., 2002). BCL6 réprimant directement la transcription de BLIMP1 (Tunyaplin et al., 2004), il existe donc une inhibition réciproque de BLIMP1 et BCL6 (figure 16).

De plus, par l'intermédiaire de la répression de Pax5, BLIMP1 induit l'expression de *X-box binding Protein 1* (XBP1) qui contribue à la différenciation plasmocytaire (Reimold et al., 1996).



**Figure 16: Régulation croisée de la CSR et de la différenciation plasmocytaire.**

Les flèches «  $\rightarrow$  » représentent un effet activateur, les flèches «  $\dashv$  » représentent un effet inhibiteur. IRF4: Interferon Regulatory Factor 4, STAT3: Signal Transducer and Activator of Transcription 3, BLIMP1: B Lymphocyte- Induced Maturation protein 1, PAX5: PAired-box Protein 5, BCL6: B-Cell Lymphoma 6, XBP1: X-box binding Protein 1, CSR: Class Switch Recombination.

### 2.2.2.2 ROLE DE STAT1 DANS L'IMMUNITÉ ADAPTATIVE

Contrairement aux nombreux rôles de STAT1 décrits dans l'immunité innée et ceux décrits à l'interface des deux immunités tels que favoriser l'orientation Th1 et l'inhibition Th2 et Th17 ou favoriser la présentation antigénique par le CMH II, peu de rôles sont décrits pour STAT1 dans les cellules B au cours de l'immunité adaptative. Cependant, des études faites chez la souris ont montré que STAT1 avait un rôle dans l'orientation de la CSR vers la production d'IgG2a.

En effet, il a été démontré dans des lymphocytes B murins après différents types de stimulations, que STAT1 forme un complexe transcriptionnel avec le facteur de transcription « *E26 transformation-specific 1* » (Ets-1) qui induit la transcription de T-bet. T-bet qui induit directement l'expression des *germline transcripts* du gène CH $\gamma$ 2a, oriente ainsi la CSR vers la production d'IgG2a (Nguyen et al., 2012; Xu and Zhang, 2005; Yoshimoto et al., 2004).

D'autre part, il a également été démontré chez la souris que STAT1 interfère sur l'orientation de la CSR vers la production d'IgE par l'IL-4 (Venkataraman et al., 1999). En effet, l'IL-4 induit l'activation de STAT6 qui se fixe sur le promoteur du gène CH $\epsilon$ , induit l'expression des *germline transcripts* correspondants et oriente ainsi la CSR vers la production d'IgE. En induisant l'expression de SOCS1, STAT1 favorise la déphosphorylation de STAT6 et inhibe ainsi les effets de l'IL-4 sur l'orientation de la CSR.

## 2.3 RÔLE PRO APOPTOTIQUE

Le rôle pro-apoptotique de STAT1 résulte de son implication à la fois dans la voie intrinsèque de l'apoptose via les récepteurs de «mort», et dans la voie mitochondriale. Dans ce cadre, STAT1 met en œuvre à la fois des mécanismes d'actions transcriptionnels et non transcriptionnels.

### 2.3.1 ACTIVITE TRANSCRIPTIONNELLE PRO-APOPTOTIQUE

#### 2.3.1.1 LIGANDS ET RECEPTEURS DE MORT: FAS/FASL, TRAIL/TRAILR

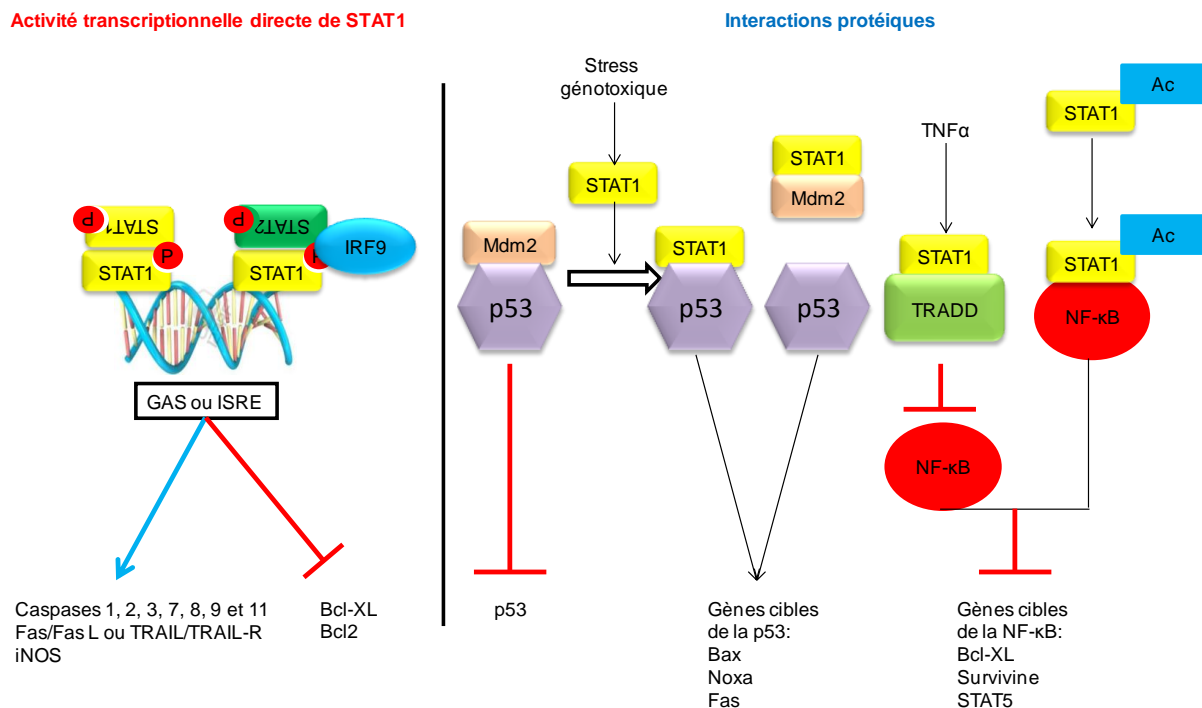
---

L'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose est initiée par la fixation d'un ligand sur les récepteurs de mort dont Fas.

La fixation du ligand FasL, qui appartient à la famille du TNF, à son récepteur Fas permet la formation d'un trimère du récepteur qui, *via* son domaine de mort, s'associe à l'adaptateur FADD. L'association de ce complexe à la pro-caspase 8 entraîne le clivage de la pro-caspase 8 qui est alors activée. Cette dernière initie la cascade d'activation des autres caspases effectrices aboutissant finalement à l'apoptose (Nagata, 1997; Xu et al., 1998).



Une des fonctions pro-apoptotiques de STAT1 résulte de son rôle dans la régulation de l'expression à la fois des récepteurs et des ligands de mort cellulaire tels Fas/FasL (tableau 1 et 3) ou encore « *Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand/Receptor* » (TRAIL/TRAIL-R). STAT1 activé par l'IFN $\gamma$  induit l'expression de Fas et FasL dans certains types cellulaires tels que les fibroblastes (Xu et al., 1998) ou les cellules microgliales (Kim and Lee, 2007; Lee et al., 2000) mais aussi celle de TRAIL et TRAIL-R notamment dans des lignées cellulaires d'hépatome humain (Kim and Lee, 2007) (figure 17).



**Figure 17: Régulation de l'apoptose par STAT1 (d'après (Kim and Lee, 2007)).**

STAT1, 2 et 5: Signal Transducer and Activator of Transcription 1, 2 and 5, TRAIL: tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand, iNOS: Inducible Nitric Oxide Synthase, Bcl-XL: B-cell lymphoma-extra large, Bcl2: B-cell leukemia protein-2, Bax: Bcl2-associated X protein, FasL: Fas Ligand, Mdm2: Mouse double minute 2 homolog, TNF $\alpha$ : tumor necrosis factor alpha, TRADD: Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein, NF- $\kappa$ B: nuclear factor-kappa B, Ac: Acétylation.

### 2.3.1.2 LES CASPASES

STAT1 exerce également un rôle apoptotique en augmentant l'expression des pro-caspases (figure 17). Il a ainsi été démontré que STAT1 est nécessaire à l'expression constitutive des pro-caspases 1 et 11 dans les lymphocytes murins (Lee et al., 2000) et des pro-caspases 1, 2 et 3 dans les fibroblastes humains (Kumar et al., 1997).

De plus, STAT1 est capable d'induire l'expression des pro-caspases 1, 2, 3, 7, 8, 9 et/ou 11 en fonction des stimulations appliquées et des types cellulaires considérés (Fulda and Debatin, 2002; Huang et al., 2000; Ossina et al., 1997; Refaeli et al., 2002; Sironi and Ouchi, 2004; Stephanou et al., 2000).

Enfin, si STAT1 favorise l'action de caspases en induisant leur expression, il constitue également une de leurs cibles (King and Goodbourn, 1998).

### 2.3.1.3 iNOS

---

L'induction de l'expression de l'iNOS par STAT1 qui est impliquée dans ses rôles antibactériens (cf chapitre 2.1.1.2) contribue également à son action pro-apoptotique. En effet, l'augmentation de la production de NO qui en résulte favorise l'induction de la mort cellulaire à la fois *via* la voie mitochondriale de l'apoptose et la p53 (Brown, 2001; Brown and Borutaite, 2001; Brune, 2003; Dimmeler and Zeiher, 1997; Kamijo et al., 1994; Kim and Lee, 2007; Schneiderhan et al., 2003) (figure 17).

### 2.3.1.4 BCL-XL, BCL2

---

En plus de moduler les gènes induisant la mort cellulaire, STAT1 peut aussi inhiber l'expression de gènes de la survie cellulaire tels Bcl-XL et Bcl2 dont l'action protège l'intégrité mitochondriale (Regis et al., 2008; Stephanou et al., 2000). STAT1 réprime la transcription de Bcl-XL par l'intermédiaire d'un site GAS présent dans son promoteur (Fujio et al., 1997) et celle de Bcl2 en association avec IRF1 *via* les séquences ISRE de son promoteur (Heckman et al., 2000; Ning et al., 2010) (tableau 1, figure 17).

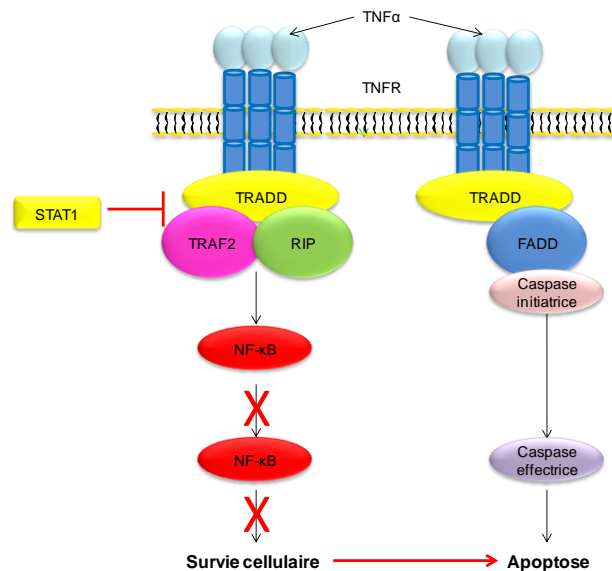
## 2.3.2 AUTRES ACTIVITES PRO-APOPTOTIQUES

Certains mécanismes pro-apoptotiques de STAT1 sont indépendants de son activité transcriptionnelle. Ils mettent en œuvre certaines interactions protéiques telles que celles impliquant l'adaptateur TRADD du récepteur de mort au TNF $\alpha$ , la protéine p53 et le NF- $\kappa$ B.

### 2.3.2.1 INTERACTION AVEC TRADD

La voie de signalisation du TNF $\alpha$  est m $\acute{e}$ di $\acute{e}$ e par l'activation du r $\acute{e}$ cepteur de mort cellulaire *Tumor Necrosis Factor alpha Receptor 1* (TNFR1). Suite  $\grave{a}$  la fixation du TNF $\alpha$  sur son r $\acute{e}$ cepteur, la prot $\acute{e}$ ine *TNFR1-Associated Death Domain protein* (TRADD) est recrut $\acute{e}$ e sur ce r $\acute{e}$ cepteur et active deux voies de signalisation ayant des effets oppos $\acute{e}$ s. La premi $\grave{e}$ re m $\acute{e}$ ne  $\grave{a}$  l'activation de NF- $\kappa$ B et est en faveur de la survie cellulaire par l'interm $\acute{e}$ diaire du complexe associant TRADD, le facteur *TNF receptor-associated factor 2* (TRAF2) et la s $\acute{e}$ rine/thr $\acute{e}$ onine kinase *Receptor-Interacting Protein* (RIP). La seconde voie de signalisation activ $\acute{e}$ e correspond  $\grave{a}$  celle des caspases dont la caspase 8 et conduit  $\grave{a}$  l'apoptose. Cette derni $\grave{e}$ re implique quant  $\grave{a}$  elle la formation d'un complexe entre TRADD et FADD que nous avons d $\acute{e}$ crit pr $\acute{e}$ c $\acute{e}$ demment (Wang et al., 2000) (figures 17 et 18).

STAT1 oriente la signalisation du TNF $\alpha$  vers la voie apoptotique. En effet, par sa fixation directe sur TRADD *via* sa tyrosine 701, STAT1 emp $\acute{e}$ che la fixation du complexe compos $\acute{e}$  de RIP et de TRAF2. L'inhibition de la formation de ce complexe conduit  $\grave{a}$  l'inhibition de la voie d'activation de NF- $\kappa$ B et de la survie cellulaire (Suk et al., 2001; Wang et al., 2000; Wesemann et al., 2004) (figure 17) (Kumar et al., 1997; Wang et al., 2000) (figures 17 et 18).



**Figure 18: Action de STAT1 sur les voies de signalisation induites par le TNF $\alpha$ .**

*TNF $\alpha$* : Tumor Necrosis Factor alpha, *TNFR*: Tumor Necrosis Factor alpha Receptor, *TRADD*: TNFR1-Associated Death Domain protein, *TRAF2*: TNF receptor-associated factor 2, *RIP*: Receptor-Interacting Protein, *FADD*: Fas Associated Death Domain, *NF- $\kappa$ B*: nuclear factor-kappa B.

### 2.3.2.2 LA p53

---

STAT1 interagit aussi avec la p53, facteur de transcription et régulateur majeur de l'apoptose et du cycle cellulaire (tableaux 1 et 3). En absence d'activation, la p53 est associée à l'ubiquitine ligase *Mouse double minute 2* (Mdm2) ce qui favorise sa dégradation protéasomale et aboutit à un faible niveau d'expression basal de la p53 (Haupt et al., 1997). Différents stress cellulaires dont les lésions de l'ADN vont entraîner l'activation de la kinase ATM qui est elle-même responsable de l'activation des kinases *Checkpoint kinase 1 et 2* (Chk1 et 2) qui phosphorylent Mdm2. Cette phosphorylation de Mdm2 aboutit à la dissociation du complexe formé avec la p53 et ainsi à l'augmentation du niveau d'expression de la p53. Celle-ci est alors activée par phosphorylation et active la transcription de ses gènes cibles pro-apoptotiques (Ak and Levine, 2010).

STAT1 favorise l'action de la p53 par deux mécanismes distincts. D'une part, il inhibe l'expression transcriptionnelle et protéique de Mdm2 et augmente ainsi la stabilité et le niveau d'expression de la p53 (Townsend et al., 2004). De plus, STAT1 interagit directement *via* son domaine TAD avec le DBD de la p53 dont il augmente ainsi l'activité transcriptionnelle (Townsend et al., 2004; Youlyouz-Marfak et al., 2008). Indirectement, STAT1 augmente donc le niveau d'expression de plusieurs autres gènes pro-apoptotiques dont ceux codant *Bcl2-associated X protein* (Bax), Noxa et Fas (Townsend et al., 2004) (figure 17).

### 2.3.2.3 NF-κB

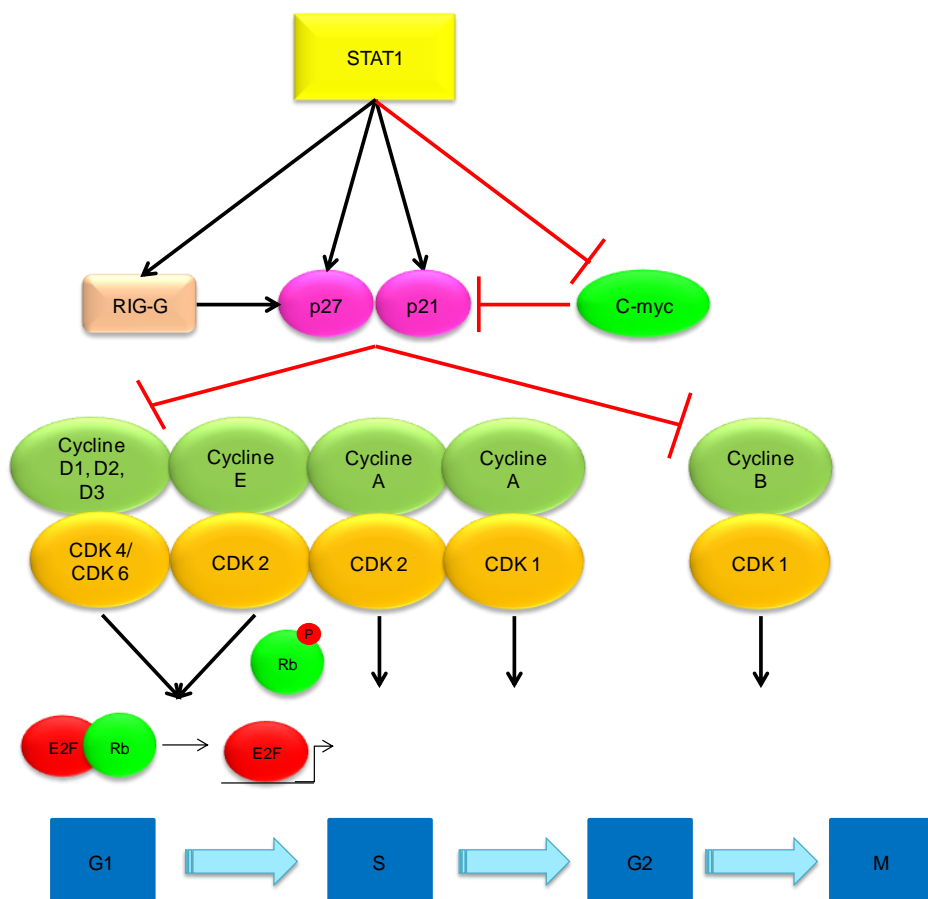
---

Au-delà de son interaction avec les complexes récepteurs de mort, STAT1 inhibe également la signalisation de NF-κB *via* une interaction directe protéine-protéine. En effet, des études ont révélé que l'acétylation de STAT1 sur ses lysines K410 et K413 (cf chapitre 1.5.1.4) favorise son interaction avec NF-κB (p65). STAT1 acétylé contribue ainsi à la séquestration de NF-κB dans le cytoplasme inhibant l'expression de ses gènes cibles anti-apoptotiques tels que Bcl-XL, la survivine ou STAT5 (Kramer et al., 2006). Cette forme acétylée de STAT1 participe donc aussi à la mort cellulaire par un mécanisme non transcriptionnel direct (Kim and Lee, 2007) (figure17).

## 2.4 RÔLE ANTI-PROLIFÉRATIF DE STAT1

STAT1 exerce principalement son rôle antiprolifératif par un arrêt du cycle cellulaire.

Le cycle cellulaire est régulé par des complexes protéiques formés de cyclines et de kinases correspondant aux *Cyclins-Dependent Kinases* (CDKs). L'activité des CDKs est dépendante de leur association avec certaines cyclines dont les expressions varient au cours du cycle cellulaire. Ainsi, les complexes cycline A/ CDK1 et cycline A/ CDK2 régulent la phase S et la transition S/ G2, le complexe cycline B/ CDK1 régule la transition G2/ M, les complexes cycline D/CDK4 et cycline D/ CDK6 sont exprimés pendant la phase G1, et le complexe cycline E/ CDK2 régule la transition G1/ S (Lim and Kaldis, 2013). Au cours de la phase G1 et de la transition G1/S, les complexes cycline/CDK exprimés phosphorylent la protéine « *Retinoblastoma tumor suppressor protein* » (Rb) ce qui entraîne la dissociation du complexe que Rb formait avec le facteur de transcription E2F qui active alors la transcription de ses gènes cibles et favorise la progression du cycle cellulaire (figure 19).



**Figure 19: STAT1 et l'arrêt du cycle cellulaire.**

—| : inhibition, → : activation.

Le cycle cellulaire est régulé par de nombreux mécanismes dont ceux faisant intervenir des inhibiteurs des CDKs (CKI) tels la p21 et la p27. Les mécanismes d'inhibition de ces deux CKIs impliquent une interaction protéique avec les CDKs qui inhibe leur activité kinase dans le cas de la p21 et qui empêche les phosphorylations activatrices des CDKs pour la p27. L'action de la p21 ou de la p27 induit préférentiellement un arrêt du cycle au cours des points de contrôle « *checkpoints* » G1/S et G2/M. Le facteur de transcription c-Myc qui inhibe la transcription du gène codant la p21 et accentue la dégradation de la protéine p27, favorise donc la progression du cycle cellulaire en diminuant l'expression de ces deux CKIs (Gough et al., 2008; Rundhaug, 2005) (figure 19). De plus, le gène RIG-G dont l'expression est induite dans des cellules de leucémie promyélocytaire aigue traitées par l'acide transrétinoïque, inhibe l'expression de c-Myc et son action est donc associée à un arrêt du cycle cellulaire en G1/S (Gough et al., 2008; Rundhaug, 2005).

STAT1 interfère à plusieurs niveaux de la régulation du cycle cellulaire. Dans les cellules myéloïdes, suite à son activation par l'acide rétinoïque, STAT1 favorise un arrêt du cycle cellulaire en inhibant l'expression des cyclines A, B, D2, D3 et E (Avalle et al., 2012) (tableau 3). Il agit également au niveau des complexes cycline/CDK. Par exemple, il a été démontré que STAT1 activé sur sa S727 se fixe au complexe cycline D1/CDK4 favorisant sa dissociation et ainsi un arrêt du cycle (Dimco et al., 2010) (figure 19).

Au-delà de son action sur les effecteurs du cycle cellulaire, STAT1 favorise également son arrêt en modulant l'expression de ses régulateurs. Ainsi, il a été démontré que STAT1 arrête le cycle cellulaire dans de nombreux cancers et dans les cellules myéloïdes en induisant l'expression de la p21 et/ou de la p27 (tableaux 1 et 3, figure 19) (Avalle et al., 2012; Bromberg, 2002; Chin et al., 1996; Dimberg et al., 2003; Dimco et al., 2010; Gough et al., 2008; Lim and Kaldis, 2013). Enfin, STAT1 contribue également à l'arrêt du cycle cellulaire en inhibant l'expression de la protéine c-Myc (Gartel et al., 2001; Ramana et al., 2000; Schlee et al., 2007) ou en induisant l'expression de RIG-G (Gough et al., 2008; Rundhaug, 2005).

## 2.5 ROLE ANTI-TUMORAL

STAT1 est considéré comme un suppresseur de tumeur car impliqué dans l'inhibition de la tumorigénèse, l'angiogénèse et la formation de métastases (Bromberg, 2002; Huang et al., 2002; Koromilas and Sexl, 2013).

### 2.5.1 ACTION ANTI-TUMORALE DE STAT1

Les propriétés anti-tumorales de STAT1 passent tout d'abord par son action pro-apoptotique sur la voie des récepteurs de mort cellulaire et la voie mitochondriale (chapitre 2.2), par son action antiproliférative sur le cycle cellulaire (chapitre 2.3) mais aussi par son rôle dans la surveillance immunitaire anti-tumorale en agissant sur la présentation antigénique (chapitre 2.1). En effet, chez la souris, une étude a montré qu'une déficience en STAT1, associée à un défaut de la p53, favorise la formation de tumeurs transplantées (Kaplan et al., 1998).

De plus, les rôles de STAT1 et STAT3 sont décrits comme opposés dans la tumorigénèse. En effet, l'action de STAT3 favorise la survie et la prolifération cellulaire et il est surexprimé dans la plupart des cancers, alors que STAT1, comme nous l'avons décrit ci-dessus, présente des rôles antiprolifératifs et pro-apoptotiques (Avalle et al., 2012; Kim and Lee, 2007; Regis et al., 2008). Pourtant, une surexpression et une activation de STAT1 sont retrouvées dans de nombreux cancers tels le cancer du sein, de la tête et du cou, des mélanomes, de leucémies et de lymphomes (Adamkova et al., 2007; Bowman et al., 2000; Gouilleux-Gruart et al., 1996; Koromilas and Sexl, 2013). Une des hypothèses proposées par N. N. Khodarev (Khodarev et al., 2012) pour expliquer cette observation est que l'activation de STAT1 entraîne une résistance des cellules cancéreuses aux agents génotoxiques favorisant ainsi l'enrichissement et le développement de clones de survie dans lesquels il est surexprimé (chapitre 2.4.3.3.B).

### 2.5.2 ACTIONS ANTI-ANGIOGENIQUE ET D'INHIBITION DES METASTASES

Plusieurs rôles de STAT1 contribuent à son action anti-tumorale parmi lesquels son action anti-antigénique est prépondérante. Les souris déficientes en STAT1 présentent une augmentation de l'angiogénèse démontrant le rôle clé de STAT1 dans l'inhibition de ce mécanisme (Battle et al., 2006).

En effet, l'activation de STAT1 est associée à l'induction de l'expression de chimiokines anti-angiogéniques (Avalle et al., 2012; Cheon et al., 2011) (tableau 3). Il a ainsi été démontré dans les cellules microgliales stimulées par l'IFN $\gamma$ , que STAT1 induit l'expression de CXCL9 et de CXCL10 par l'intermédiaire d'un complexe avec PU.1 (Hiroi and Ohmori, 2003). Dans les cellules rénales embryonnaires de souris, c'est un complexe formé de STAT1, CREB, NF- $\kappa$ B qui induit l'expression de CXCL9 (Hiroi and Ohmori, 2003).

Enfin, dans les kératinocytes, STAT1 forme un complexe avec IRF1 et NF- $\kappa$ B qui induit l'expression de CXCL9, 10 et 11 (Weichselbaum et al., 2008).

STAT1 inhibe également l'action de deux facteurs de croissance pro-angiogéniques majeurs que sont le *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF) et le *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF). Ainsi, STAT1 exerce un effet anti-tumoral en inhibant l'expression du bFGF dans les cellules de sarcomes. D'autre part, STAT1 inhibe l'activité du VEGF en réprimant l'expression de ses gènes cibles pro-angiogéniques dont la grande majorité favorise la dégradation de la matrice extracellulaire. Ainsi, l'activation de STAT1 est associée à une diminution de l'expression de l'angiopoïétine 2, de l'urokinase activatrice du plasminogène (uPA), de la *Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1* (TIMP-1), de la cyclo-oxygénase 2 qui initie la synthèse des prostaglandines et du récepteur au VEGF 2 (VEGF-R 2) (tableau 3) (Battle et al., 2006; Rundhaug, 2005). Enfin, STAT1 inhibe également l'expression de métalloprotéinases matricielles dont MMP2 et MMP9, qui contribuent au remodelage de la matrice extracellulaire nécessaire à la formation de vaisseaux (Rundhaug, 2005).

Fonction de STAT1	Molécules modulées par STAT1
Arrêt du cycle cellulaire	↗ p21, p27
Induction de l'apoptose	↗ Fas, FasL, TRAIL ↗ caspases 1,3,7,8 ↗ NO
Inhibition de la croissance cellulaire	↘ c-Myc ↘ Cyclines A, B, D2, D3 et E
Inhibition de l'angiogénèse	↘ bFGF, MMP2, MMP9 ↘ CXCL9, CXCL10 et CXCL11 ↘ VEGF
Induction de la surveillance Immunitaire	↗ LMP2, LMP7 ↗ CMH I ↗ CIITA, ↗ CMH II

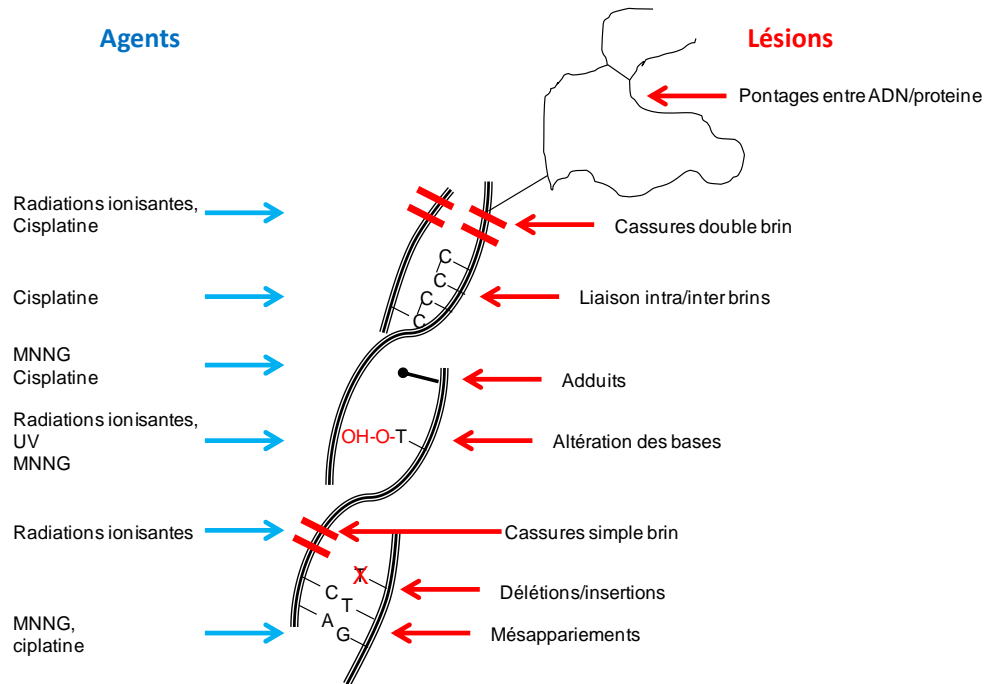
**Tableau 3: Rôles de STAT1 dans la tumorigénèse.**

### 2.5.3 ROLE DE STAT1 DANS LA REPONSE AUX AGENTS GENOTOXIQUES

Le génome humain est exposé quotidiennement à des évènements génotoxiques tels que les radiations ultraviolettes (UV) ou le stress oxydatif (radicaux libres).



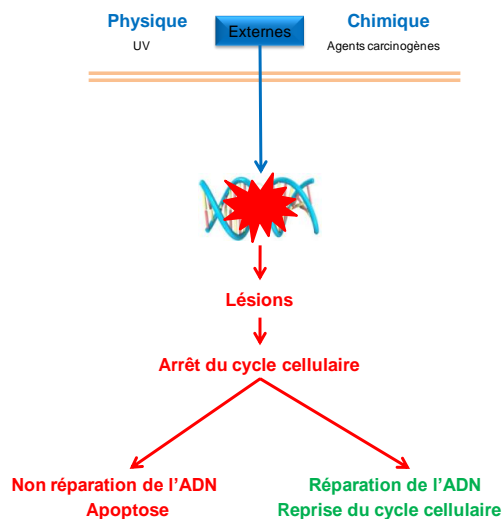
L'exposition des cellules aux agents génotoxiques mène à des lésions de l'ADN dont font parties les mutations, la formation d'adduits, les mésappariements ou le pontage intra- ou inter-brins, ou encore les cassures simples ou double brin (figure 20).



**Figure 20: Type de lésions d'ADN.**

A: adénine, C: cytosine, T: thymine, G: guanine. O: oxygène, H: hydrogène. MNNG: N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoGuanidine.

Ces lésions sont prises en charge par les systèmes de réparation de l'ADN. Toutefois, lorsque les lésions sont trop importantes, ces systèmes de réparation ne sont plus assez efficaces et des mécanismes de signalisation conduisant à l'apoptose cellulaire sont déclenchés (figure 21).



**Figure 21: Origines des lésions à l'ADN et conséquences.**

UV: UltraViolets.

Dans cette optique, des agents génotoxiques sont utilisés comme chimiothérapies anticancéreuses. Par exemple, la doxorubicine, qui est un agent intercalant de l'ADN ou la fludarabine qui est un analogue de l'adénine, sont utilisées pour leurs propriétés cytotoxiques empêchant les mécanismes de la réplication. Nos travaux ayant utilisé deux agents génotoxiques alkylants, une description brève de leur mécanisme d'action et des systèmes de réparation de l'ADN qu'ils activent est présentée ci-dessous. Les implications connues de STAT1 dans la réponse aux agents génotoxiques sont ensuite présentées.

### 2.5.3.1 LES AGENTS ALKYLANTS GENOTOXIQUES

---

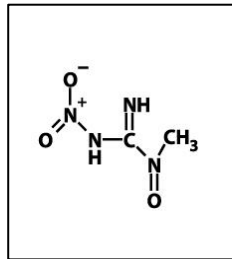
Les agents alkylants ou méthylants sont des agents génotoxiques d'origine chimique qui peuvent être divisés en deux catégories: les agents alkylants monofonctionnels  $S_N1$  dont l'action modifie une seule base azotée de l'ADN et les agents alkylants bifonctionnels  $S_N2$  qui modifient deux sites réactionnels et les lient en formant des pontages entre un brin d'ADN et une protéine, entre deux brins d'ADN, ou entre deux bases d'un même brin d'ADN (Helleday et al., 2008; Karran, 2001; Stojic et al., 2004). Les mécanismes d'action d'un agent  $S_N1$ , le MNNG et d'un agent  $S_N2$ , le cisplatine sont décrits ci-dessous.

#### Le MNNG

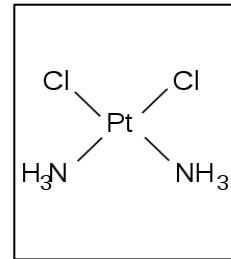
Le MNNG (*N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoGuanidine*) est un agent de type  $S_N1$  considéré comme cent fois plus toxique que les agents  $S_N2$  (Bignami et al., 2000) et n'est pas utilisé en chimiothérapie anticancéreuse. Il ajoute des groupements alkyles en position  $O^6$  de la guanine ou en position  $O^4$  de la thymine. Ces modifications chimiques changent le nombre ou la position des groupements capables de former des liaisons hydrogènes avec leur base complémentaire. Lors de la réplication, l'ADN polymérase incorpore alors une thymine comme complémentaire de la  $O^6$ -méthylguanine ( $O^6$ -MeG) et une guanine face à la  $O^4$ -méthylthymine ( $O^4$ -MeT), ce qui équivaut à l'introduction de mésappariements. Ces derniers sont reconnus et pris en charge par le système MMR (*MisMatch Repair*) préférentiellement mais aussi le système BER (*Base Excision Repair*) (Stojic et al., 2004) (figures 22 et 23).

## Le Cisplatine

Le cisplatine (*Cis-diaminedichloroplatinum*) est l'un des agents chimiothérapeutiques les plus utilisés dans de nombreux cancers dont celui des testicules et des ovaires (Stojic et al., 2004). Cette substance modifie principalement la position N<sup>7</sup> des bases puriques (Adénine ou Guanine) et génère des liens intra- et inter-brins entre les bases modifiées. Ces pontages provoquent un changement de conformation locale du double brin d'ADN qui active les systèmes NER (*Nucleotide Excision Repair*) et MMR (Stojic et al., 2004) (figures 22 et 23).



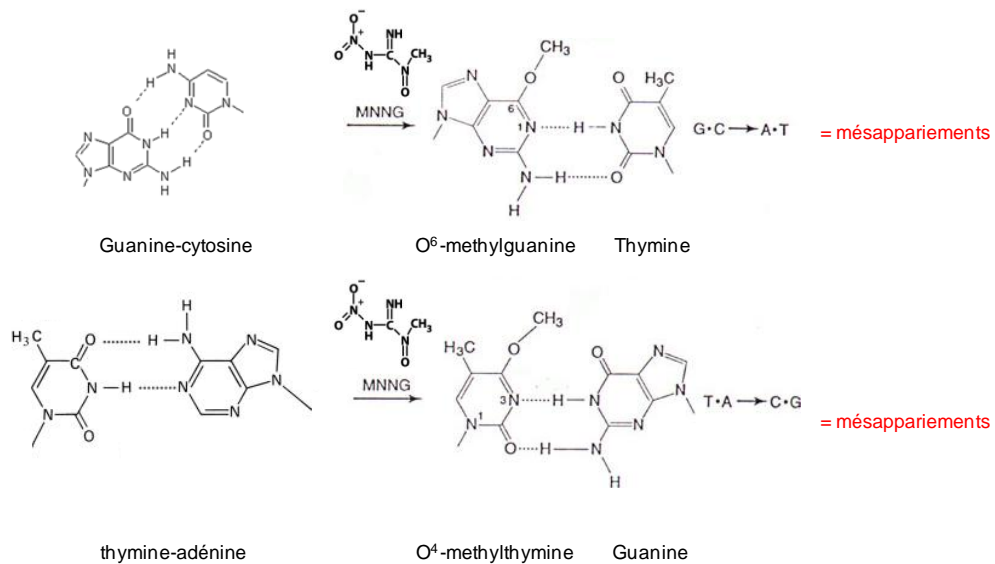
**N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine**  
**(MNNG)**



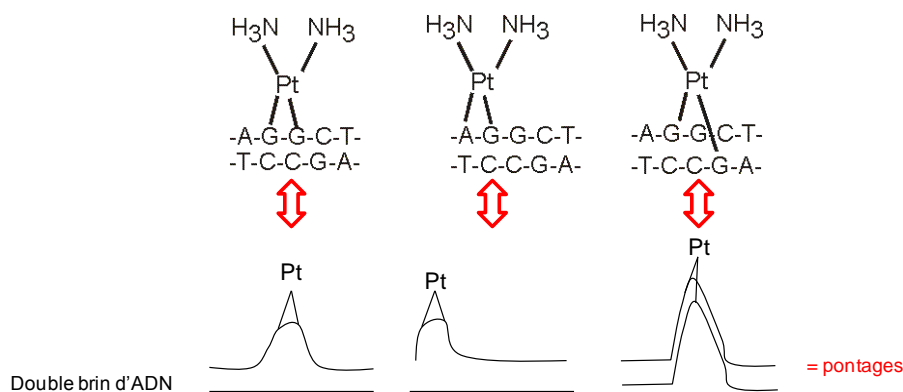
**Cisplatine**

**Figure 22: Structures chimiques du N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) et du cisplatine.**

### MNNG



### Cisplatine



**Figure 23: Représentation moléculaire de l'action du MNNG sur la guanine impliquant des mésappariements et du cisplatine sur les bases puriques (A ou G) impliquant des pontages de l'ADN.**

MNNG: N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, G: guanine, C: Cytosine, A: Adénine, T: Thymine.  
Pt = platine. A, G, C, T = bases de l'ADN (Adénine, Guanine, Cytosine, Thymine).

### 2.5.3.2 LES SYSTEMES DE REPARATION DE L'ADN

Les altérations créées par les agents génotoxiques alkylants activent différents systèmes de réparation de l'ADN: les mésappariements générés par le MNNG lors de la réplication activent préférentiellement le MMR. Le BER, qui est lui aussi activé, prend seulement en charge la réparation au niveau de la paire de base altérée. Les pontages générés par le cisplatine créent des distorsions de plus grande taille de la double hélice d'ADN. Dans ce cas, le NER sera préférentiellement activé bien que le MMR puisse éventuellement prendre en charge ces lésions.

Lorsque les lésions de l'ADN sont importantes, leur prise en charge par le MMR, le BER ou le NER peut aboutir à la formation de cassures double-brin de l'ADN qui activent à leur tour d'autres systèmes de réparation.

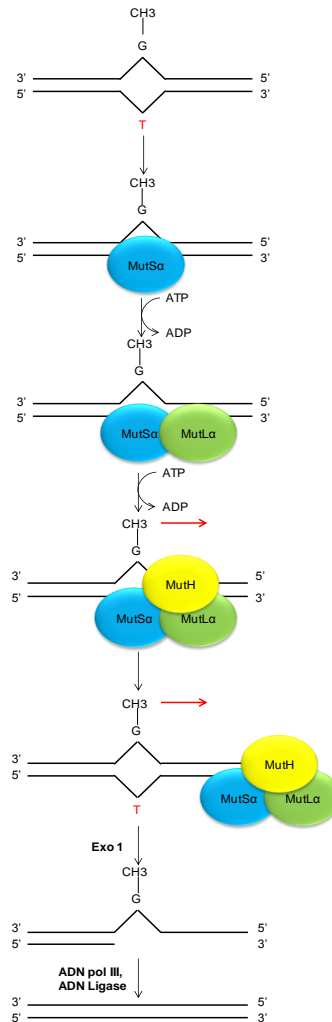
#### A) SYSTEME DE REPARATION DES MESAPPARIEMENTS OU MMR (MISMATCH REPAIR)

---

Le MMR (*MisMatch Repair*) reconnaît et corrige les mésappariements (Stojic et al., 2004). Contrairement aux systèmes BER et NER qui excisent et remplacent une base ou quelques nucléotides, le mécanisme utilisé par le MMR correspond à l'excision puis à la resynthèse de la portion du brin d'ADN porteur du mésappariement lors de la phase de réplication.

Le système MMR a été principalement étudié chez les procaryotes. Ce mécanisme comprend les étapes suivantes (Karran, 2001; Stojic et al., 2004) (figure 24): Les mésappariements sont reconnus par la protéine MutS $\alpha$  (*Mutator Sa*) qui se lie à la base incorrecte afin d'initier la cascade du système MMR. En présence d'ATP, MutS $\alpha$  recrute MutL $\alpha$  (*Mutator La*) qui assure la stabilisation de l'association de MutS $\alpha$  à l'ADN. Le complexe MutS $\alpha$ / MutL $\alpha$  va à son tour recruter de l'endonucléase MutH. Après déplacement et positionnement du complexe sur une séquence voisine GATC, MutH clive le brin d'ADN nouvellement synthétisé non méthylé et l'exonucléase EXO 1 élimine la région d'ADN mésappariée. La séquence incorrecte est ensuite remplacée par une copie fidèle par resynthèse du brin fille par l'ADN polymérase III (DNA pol III) suivie d'une ligature par l'ADN ligase (Weichselbaum et al., 2008).

Chez les eucaryotes, l'équivalent de MutS $\alpha$  correspond au complexe MSH2/6 (*MutS protein homolog 2/6*) et celui de MutL $\alpha$  à MLH1/ PMS2 (*MutL homolog 1/ Postmeiotic segregation increased 2*) (Karran, 2001; Stojic et al., 2004). Il n'y a pas d'équivalent chez les eucaryotes de MutH car l'activité endonucléase est directement assurée par les hétéro-complexes MSH2/MSH6/MLH1/PMS2 (Jiricny, 1998; Li, 2008; Schofield and Hsieh, 2003; Weichselbaum et al., 2008) (figure 24).



**Figure 24: Représentation schématique de la réparation post-répliquative du MMR dans les cellules procaryotes.**

L'incorporation erronée de la thymidine (rouge) opposée à la guanine durant la réplication de l'ADN donne des mésappariements G/T la translocation du complexe MutSa/MutLa sur l'ADN est symbolisée par la flèche rouge et clive le brin d'ADN non méthylé, nouvellement synthétisé à partir d'une séquence voisine GATC, aidé de l'exonucléase EXO 1. L'exonucléase se dissocie du complexe avant d'emporter le mésappariement. La resynthèse du brin est assurée par l'ADN polymérase III (ADN pol III) et est scellé par une ADN ligase.

## B) SYSTEME DE REPARATION PAR EXCISION DE BASES OU BER (BASE EXCISION REPAIR)

---

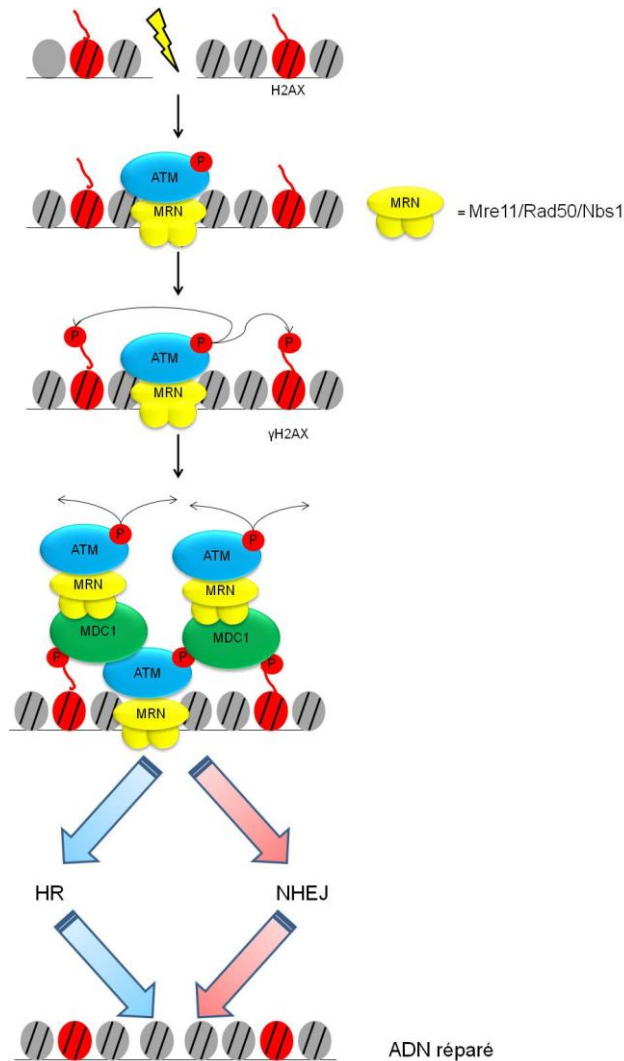
Le système BER (*Base Excision Repair*) est activé par différents types de modifications des bases de l'ADN. Ce système de réparation concerne une seule base de l'endommagement d'ADN qui peut être une base oxydée, une base alkylée ou éventuellement des sites abasiques.

Dans la version simple (*short-patch*), un seul nucléotide est remplacé. Ce mécanisme peut être résumé ainsi: il débute par une action de l'ADN glycosylase. Le résidu abasique est ensuite lui-même excisé avec rupture du squelette pentose-phosphate par l'APE 1 (*apurinic/apyrimidic endonuclease 1*). Le remplacement du nucléotide manquant est alors effectué par l'ADN polymérase  $\beta$  suivie de celle de l'ADN ligase 3 (Sancar et al., 2004; Saribasak and Gearhart, 2012).

### C) REPARATION DES CASSURES DOUBLE-BRIN

---

Les cassures double-brin de l'ADN provoquées par les agents génotoxiques sont reconnues par le complexe MRN (Mre11/Rad50/Nbs1) qui recrute ATM (*Ataxia-telangiectasia Mutated*), un des membres de la famille des protéines *Phosphatidylinositol 3-Kinase-like-Kinase* dont font aussi partie ATR (*Ataxia-telangiectasia and Rad3-related*) ou la DNA-PK (*DNA-dependent Protein kinase*) (Bakkenist and Kastan, 2003). ATM est activée par autophosphorylation et phosphoryle les protéines histones H2AX (*Histone 2AX*) alors appelées  $\gamma$ H2AX (Burma et al., 2001). Les histones recrutent d'autres médiateurs tels que MDC1 (*Mediator of DNA damage Checkpoint protein 1*) qui favorise le recrutement de nouveaux complexes MRN/ATM amplifiant ainsi le signal (figure 25). Les voies de signalisation engagées après reconnaissance des cassures double-brin d'ADN aboutissent à l'activation de systèmes de réparation dont les mécanismes impliquant la recombinaison homologue (*HR ou Homologous Recombination*) ou le NHEJ (*Non Homologous End-Joining*). Le complexe NHEJ va directement joindre les extrémités à bouts francs de l'ADN lésé. L'hétérodimère des protéines KU70 et KU80 est recruté à la cassure et recrute à son tour la DNA-PK. Enfin la ligase IV termine la fermeture. Le complexe HR en revanche a besoin de s'appuyer sur la reconnaissance d'un brin homologue. Il y a donc tout d'abord un mécanisme de résection grâce à l'activité exonucléase de la protéine CtIP. Les extrémités homologues créées sont recouvertes des protéines RPA qui sont ensuite remplacées par les protéines RAD51, les protéines BRCA1, BRCA2 et PALB2 facilitent ce transfert. Il se met alors en place une resynthèse de l'ADN par différentes polymérases (PolN, Polv et POL $\delta$ ) avec la formation intermédiaire d'un triplex d'ADN (boucle D).



**Figure 25: la formation de  $\gamma$ H2AX mène à l'amplification du signal suite aux dommages à l'ADN par cassures double brin.**

*H2AX: Histone 2AX, MRN: complexe formé de Mre11/Rad50/Nbs1, ATM: Ataxia-telangiectasia Mutated,  $\gamma$ H2AX: forme phosphorylée de H2AX, MDC1: Mediator of DNA damage Checkpoint protein 1, HR: Homologous Recombination, NHEJ: Non Homologous End-Joining.*

### 2.5.3.3 IMPLICATIONS DE STAT1 DANS LA SENSIBILITE AUX AGENTS GENOTOXIQUES

Diverses études suggèrent un rôle modulateur de STAT1 dans la réponse aux agents génotoxiques. Ce rôle de STAT1 semble dépendre à la fois de l'agent génotoxique utilisé mais également du type cellulaire dans lequel il est analysé.



Plusieurs études montrent que STAT1 est capable d'induire la mort cellulaire mettant pour cela en jeu ses fonctions antiprolifératives et pro-apoptotiques. D'autres études montrent au contraire un rôle protecteur de STAT1 vis-à-vis de la mort cellulaire induite par les agents génotoxiques.

#### A) STAT1 SENSIBILISE AUX AGENTS GENOTOXIQUES

---

Plusieurs travaux ont mis en évidence un rôle pour STAT1 dans la sensibilisation à différents agents génotoxiques. Les mécanismes impliqués sont ceux contribuant aux fonctions pro-apoptotiques de STAT1 (chapitre 2.3).

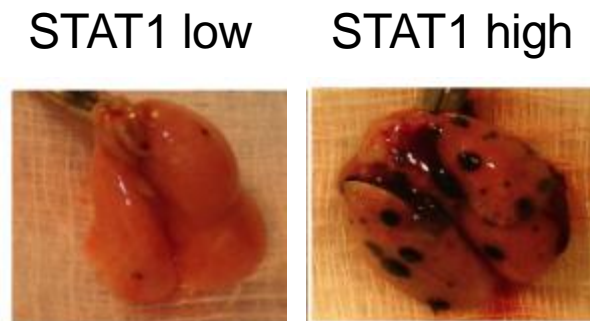
Il a ainsi été démontré que STAT1 sensibilise les lignées humaines de fibrosarcomes au traitement par le cisplatine ou la doxorubicine (Townsend et al., 2004) et les lignées humaines de lymphome de Burkitt au traitement par le cisplatine, la doxorubicine ou la fludarabine (Youlyouz-Marfak et al., 2008) par un mécanisme impliquant une augmentation de l'expression et de l'activité transcriptionnelle de la p53. D'autres travaux ont montré que STAT1 sensibilise les lignées cellulaires du cancer du sein au traitement par la doxorubicine *via* un mécanisme impliquant une régulation du niveau d'expression de la caspase 3 (Thomas et al., 2004). Townsend *et al.* ont démontré que STAT1 sensibilise les fibroblastes embryonnaires murins aux radiations ionisantes en modulant les processus de repérage des cassures double-brin. En effet, STAT1 favoriserait l'activation d'ATM et contribuerait à l'augmentation de l'expression de MDC1 et de 53BP1. De plus, les auteurs ont mis en évidence un autre mécanisme impliquant une augmentation de l'activation de régulateurs de la phase G1/S et G2/M du cycle cellulaire tels que Chk2 et la Cdc25A, ainsi que du suppresseur de tumeur p53 (Townsend et al., 2005).

#### B) STAT1 ET LA RESISTANCE AUX AGENTS GENOTOXIQUES

---

D'autres études montrent, au contraire, un rôle de STAT1 dans la résistance des cellules aux agents cytotoxiques tels que les radiations ionisantes ou la doxorubicine. Les mécanismes impliqués dans cette résistance sont encore inconnus et suscitent un intérêt important dans le cadre de l'étude des chimiothérapies anticancéreuses.

Il a ainsi été observé que l'expression de STAT1 favorise une résistance des lignées murines issues de tumeurs pulmonaires aux traitements par les radiations ionisantes et par la doxorubicine (figure 24) (Khodarev et al., 2007; Khodarev et al., 2009; Khodarev et al., 2012). De même, une autre étude a montré que l'expression de STAT1 est associée à une résistance cellulaire aux traitements par la doxorubicine et les inhibiteurs de la topoisomérase 2 dans le cadre de myélomes, de leucémies, de lymphomes, de carcinomes pulmonaires à petites cellules et d'adénocarcinomes rénaux (Rickardson et al., 2005).



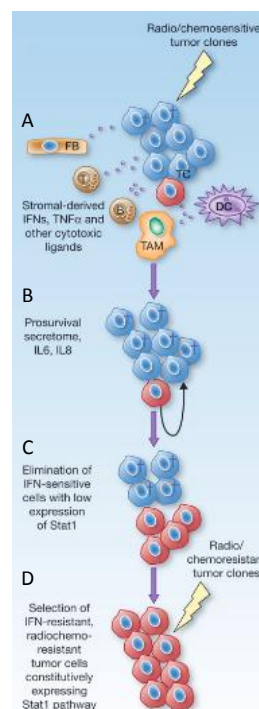
**Figure 26: L'expression de STAT1 est associée à une augmentation de la croissance tumorale.**

*D'après (Kamijo et al., 1994). Images représentatives de poumons de souris après injection de cellules de mélanome exprimant soit un faible, soit un fort niveau d'expression de STAT1 (STAT1 low ou STAT1 high respectivement). Un fort niveau d'expression de STAT1 est associé au développement d'un nombre important de colonies tumorales au niveau pulmonaire.*

D'autre part, l'analyse du transcriptome qui a été menée dans des lignées de carcinomes squameux a mis en évidence une association entre la résistance aux radiations ionisantes et la surexpression de certains gènes de réponse aux IFNs dont STAT1 (Weichselbaum et al., 2008). L'ensemble de ces gènes a permis de définir une signature de la résistance aux dommages de l'ADN appelée IRDS (*Interferon Related DNA Damage resistance Signature*). D'autres études ont révélé que cette IRDS est présente dans différents types de tumeurs humaines tels que les gliomes, les cancers du sein et les tumeurs de la prostate (John-Aryankalayil et al., 2010; Tsai et al., 2007). Parmi les gènes composant cette IRDS, celui codant STAT1 est le plus fortement surexprimé (Khodarev et al., 2012; Weichselbaum et al., 2008). D'autres études de l'IRDS ont mis en évidence une surexpression du complexe ISGF3 non phosphorylé (npISGF3) dans le cadre de la résistance des lignées de carcinomes pulmonaires à petites cellules à la doxorubicine, l'étoposide ou aux radiations ionisantes (Cheon et al., 2013) ou celui de la résistance des lignées cellulaires de cancer ovarien au cisplatine et à l'AMD473 qui est autre dérivé du platine (Roberts et al., 2005).

Khodarev *et al* ont proposé un mécanisme pour expliquer l'association entre la résistance aux chimiothérapies et l'expression de STAT1 (figure 27) (Khodarev et al., 2012). Dans ce

modèle hypothétique, les chimio- ou radio-thérapies activent différentes voies de signalisation dont celle des interférons et entraînent la constitution par le microenvironnement d'un sécrétome favorisant la survie cellulaire grâce à la production d'IL-6 et d'IL-8. L'activation de la voie de signalisation des interférons aboutit à l'expression des gènes cibles pro-apoptotiques de STAT1 et à celle de l'IRDS dont certains membres tels que MCL1 (*induced myeloid leukemia cell differentiation protein 1*) (Craig, 2002), ont des propriétés anti-apoptotiques et favorisent la survie cellulaire. Les cellules exprimant les effecteurs pro-apoptotiques des interférons vont donc être sensibles aux traitements et être éliminées alors que les cellules exprimant l'IRDS vont d'avantage résister aux traitements. Ce modèle hypothétique propose donc la sélection des cellules tumorales exprimant l'IRDS pour expliquer la résistance aux chimio- ou radiothérapies associée à l'expression de STAT1.



**Figure 27 : Modèle hypothétique impliquant STAT1 du mécanisme de résistance des clones tumoraux aux radio et/ou chimiothérapies.**

D'après (Khodarev et al., 2012). TC : cellules tumorales, T: lymphocytes T, B: lymphocytes B, TAM: Tumor-Associated Macrophages, FB: fibroblasts, DC: Dendritic Cells.

## CHAPITRE III PROBLEMATIQUE DE LA THESE

Comme nous l'avons décrit dans le chapitre introductif, STAT1 exerce de nombreux rôles souvent liés à l'immunité innée, l'apoptose et la prolifération. STAT1 est aussi considéré comme un suppresseur de tumeur bien que, dans certains cas, comme dans le cancer du sein, son activation ait été retrouvée dans la tumeur (Adamkova et al., 2007; Bowman et al., 2000; Gouilleux-Gruart et al., 1996; Koromilas and Sexl, 2013). Cependant, peu d'éléments nous renseignent quant aux implications de STAT1 dans l'immunité adaptative. Afin d'étendre les connaissances sur le rôle anti-tumoral de STAT1, nous avons développé deux stratégies d'étude concernant d'une part, le rôle de STAT1 dans l'expression des immunoglobulines par les lymphocytes B qui pourrait contribuer à la réponse immunitaire anti-tumorale et d'autre part, le rôle de STAT1 dans la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN induits par des agents alkylants.

Concernant l'étude du rôle de STAT1 dans la réponse immunitaire potentiellement anti-tumorale, les études menées initialement ont porté sur les mécanismes de l'immunité à médiation cellulaire responsables de l'immunodéficience mortelle associée aux très rares cas de patients ayant une déficience complète en STAT1. Peu de travaux se sont, à ce jour, rapportés au rôle de STAT1 dans l'immunité adaptative bien que la protéine puisse également être impliquée dans ces mécanismes. Notre laboratoire a récemment développé cette étude du lien entre STAT1 et l'immunité adaptative en montrant son rôle dans l'expression des immunoglobulines G (IgG) et du BCR fonctionnel dans une lignée cellulaire B issue d'un patient ayant une déficience complète en STAT1 (Najjar et al., 2010). Afin d'approfondir les mécanismes sous-jacents, nous avons utilisé une autre de ces rares lignées cellulaires humaines naturellement déficientes en STAT1. Nos objectifs ont donc été:

- 1) d'analyser les effets de l'expression *de novo* de STAT1 sur l'expression des immunoglobulines dans cette lignée en étudiant plus précisément l'implication de STAT1 dans la modulation de l'expression de la forme membranaire ou sécrétée des immunoglobulines.
- 2) d'étudier le mécanisme impliqué pour ces effets. D'une part, nous avons évalué l'implication transcriptionnelle directe ou indirecte de STAT1 en utilisant l'isoforme  $\beta$  de STAT1 dont le TAD est tronqué.

D'autre part, nous avons étudié l'impact de l'expression de STAT1 sur les principaux régulateurs de la différenciation plasmocytaire qui contribuent à l'orientation de l'expression des immunoglobulines vers leur forme membranaire ou sécrétée.

Concernant l'étude du rôle de STAT1 dans la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN induits par les traitements génotoxiques, des résultats contradictoires en terme de survie ont été rapportés en fonction des types cellulaires et des agents génotoxiques utilisés. STAT1 peut sensibiliser ou au contraire engendrer une résistance des cellules tumorales aux traitements génotoxiques. Ces rôles apparemment opposés de STAT1 sont un problème majeur car ils pourraient mettre en défaut l'efficacité de certaines combinaisons de chimiothérapies. Ils peuvent être expliqués par l'activation de différents mécanismes de réparation de l'ADN par les agents génotoxiques dont l'ensemble des signalisations peut aboutir à une réponse variable de survie. Parmi les différents systèmes de réparation de l'ADN, nous nous sommes intéressés au système du *mismatch repair* (MMR) qui est activé par les agents alkylants utilisés en chimiothérapie. En utilisant le MNNG, un agent alkylant qui active spécifiquement le système MMR, nous avons eu pour objectifs:

- 3) d'évaluer la modulation par STAT1 des voies de signalisation induites par ce système et ses conséquences sur la réponse cellulaire au MNNG.
- 4) d'explorer le mécanisme impliqué, en particulier l'impact de STAT1 sur la régulation de deux des principaux effecteurs de la signalisation du système MMR que sont la p53 et c-Abl.

# CHAPITRE IV RESULTATS

## 4.1 ROLE DE STAT1 DANS L'IMMUNITÉ ADAPTATIVE: MODULATION DE L'EXPRESSION DE BLIMP1 ET DES IMMUNOGLOBULINES

### 4.1.1 INTRODUCTION

Les déficiences complètes en STAT1 sont peu présentes à l'âge adulte car elles engendrent une immunodéficience très précocement mortelle chez les patients (Chapgier et al., 2006; Dupuis et al., 2003). Bien que la littérature fournisse peu d'éléments concernant les effets de STAT1 dans l'immunité adaptative, ils pourraient contribuer à cette immunodéficience. Concernant la maturation des lymphocytes B, il a été démontré que STAT1 oriente la commutation de classe des immunoglobulines vers la production d'IgG2a (Nguyen et al., 2012; Xu and Zhang, 2005) bien qu'il ne soit pas nécessaire à la réalisation de ce processus (Avery et al., 2010). Récemment, Deenick *et al* ont décrit un impact limité de la déficience partielle en STAT1 sur une autre étape de la maturation des lymphocytes B, la différenciation plasmocytaire. Ils ont mis en évidence une diminution à long terme des immunoglobulines sécrétées par les lymphocytes B différenciés en plasmocytes (Deenick et al., 2013). Les travaux antérieurs de notre laboratoire utilisant une lignée lymphoblastoïde issue d'un patient présentant une déficience complète en STAT1 (lignée SD1), ont cependant démontré que l'établissement de l'expression de STAT1 augmente l'expression des immunoglobulines membranaires à la surface des lymphocytes B matures activés (Najjar et al., 2010). Dans le travail présent, nous avons approfondi l'étude du rôle de STAT1 sur l'expression des immunoglobulines en utilisant une nouvelle lignée lymphoblastoïde issue d'un second patient déficient en STAT1 (lignée SD2). En outre, nous avons exploré le mécanisme sous-jacent en nous intéressant en particulier à la modulation par STAT1 de l'expression de STAT3 et de BLIMP1 qui régulent la différenciation plasmocytaire.

#### 4.1.2 RESULTATS

Afin d'étudier les effets de STAT1 sur l'expression des immunoglobulines, nous avons transfecté la lignée lymphoblastoïde SD2 par un plasmide inducible par la doxycycline pour l'expression de STAT1 $\alpha$ . La lignée SD2- $\alpha$  ainsi obtenue, exprime des IgG comme la lignée lymphoblastoïde contrôle Ct1 non-déficiente en STAT1.

L'analyse par western blot de l'expression de STAT1 a mis en évidence son expression dans les cellules SD2- $\alpha$  dès 6h de traitement par la doxycycline et montré que la protéine STAT1 exprimée est phosphorylée sur son résidu de tyrosine Y701 dans un délai identique. Si l'induction de l'expression de STAT1 $\alpha$  dans les SD2- $\alpha$  a été associée à une stabilité de l'expression protéique des IgG totales (western blot), elle s'est accompagnée d'une augmentation de l'expression des IgG membranaires analysée par cytométrie en flux. L'analyse transcriptionnelle par RT-QPCR a montré des résultats en accord avec l'expression protéique de STAT1 et des IgG. Nous avons observé une forte expression des ARNm de STAT1 dès 3h de traitement par la doxycycline et une forte augmentation des ARNm codant les IgG membranaires ( $\times 5$ ) qui diminuent après 6h d'induction. Nous avons aussi noté une augmentation plus faible des ARNm des IgG totales jusqu'à 6h après l'induction. L'expression de STAT1 semble donc favoriser l'expression des IgG membranaires aux dépens des IgG sécrétées.

L'orientation de l'expression des immunoglobulines vers leur forme sécrétée ou membranaire est régulée en faveur de l'expression des immunoglobulines sécrétées au cours de la différenciation plasmocytaire. Afin d'explorer le mécanisme par lequel STAT1 augmente l'expression des IgG membranaires, nous avons effectué une analyse de l'expression du principal régulateur de la différenciation plasmocytaire, BLIMP1, et de STAT3 qui régule l'expression du gène codant BLIMP1 (*PRDMI*). Nous avons observé que l'augmentation de l'expression et de la phosphorylation de STAT1 après 6h d'induction s'accompagne d'une très forte diminution transitoire de la phosphorylation de STAT3 qui est associée à une diminution de l'expression de BLIMP1 dans les mêmes délais. Nos résultats suggèrent donc que STAT1 pourrait réguler négativement les effets de BLIMP1 sur l'expression des immunoglobulines.



Ce rôle de STAT1 $\alpha$  est renforcé par nos expériences avec l'isoforme STAT1 $\beta$  dont une partie du domaine TAD est tronquée. En effet, l'induction par la doxycycline de l'expression de STAT1 $\beta$  dans les cellules SD2- $\beta$  obtenues par transfection de la lignée SD2, a conduit à une modulation de la phosphorylation de STAT3 et de l'expression de BLIMP1 identique à celle associée à l'expression de STAT1 $\alpha$ . De plus, ces résultats démontrent un rôle fonctionnel propre à STAT1 $\beta$  en dehors de celui de dominant négatif de STAT1 $\alpha$ .

STAT3 régule l'expression de *PRDM1* par l'intermédiaire de sites GAS qui ont été peu étudié chez l'homme. L'analyse de ce gène (*genome browser, University of California – Santa Cruz*) permet de mettre en évidence deux sites GAS canoniques dans ses régions régulatrices actives localisées dans son premier (I1) et son troisième intron (I3). Afin de poursuivre notre étude du mécanisme d'action de STAT1, nous avons analysé par oligo pull down sa fixation à ces deux sites GAS. Nous avons montré dans les lignées SD2- $\alpha$  et Ct1 que STAT1 comme STAT3, étaient capables de se fixer sur chacun de ces sites GAS de *PRDM1*. Ces résultats suggèrent que STAT1 pourrait réguler négativement l'expression de BLIMP1 *via* une compétition pour la fixation sur les sites GAS de son gène avec STAT3.

L'ensemble de ces résultats a permis de confirmer dans une nouvelle lignée lymphoblastoïde issue d'un patient présentant une déficience complète en STAT1, que STAT1 favorise l'expression membranaire des immunoglobulines dans les lymphocytes B mature activés. De plus, ils suggèrent que le mécanisme sous-jacent implique une régulation négative de l'activation de STAT3 qui aboutit à une régulation négative de l'expression de BLIMP1. Enfin, une compétition entre STAT1 et STAT3 pour la fixation sur les sites GAS de *PRDM1* pourrait également contribuer à ce mécanisme.

Ces travaux sont exposés en détail dans le manuscrit présenté ci-dessous (paragraphe 4.1.3).

#### 4.1.3 ARTICLE 1: STAT1 INTERFERENCE ON STAT3 REGULATION OF BLIMP1 AND PLASMA CELL DIFFRENCIATION.

E. Lemadre, D.Lesage, P-O Schischmanoff, R. Fagard, N. Varin Blank, E. Fabre.

#### 4.1.4 RESULTATS COMPLEMENTAIRES

Dans le but d'approfondir l'étude du rôle de STAT1 sur l'expression des immunoglobulines, nous avons employé une nouvelle lignée lymphoblastoïde issue d'un des rares patients présentant une déficience complète en STAT1. Dans un premier temps, cette lignée SD2 a été caractérisée puis les effets de la transfection effectuée pour l'obtention de la lignée SD2- $\alpha$  ont été analysés.

##### 4.1.4.1 CARACTERISATION DE LA LIGNEE SD2

---

Afin de caractériser la lignée SD2, nous avons étudié les marqueurs de surface exprimés par ces cellules et les avons comparé à ceux exprimés par la lignée lymphoblastoïde contrôle Ct1, non-déficiente en STAT1. Les résultats de cette étude par cytométrie en flux montrent que les lignées SD2 et Ct1 sont CD5<sup>-</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup> et CD22<sup>+</sup> (tableau 4). Ces cellules expriment donc à leur surface les marqueurs des lymphocytes B matures. Les lignées SD2 et Ct1 expriment également des marqueurs d'activation des lymphocytes B tels que le CD23 et le CD38, ce qui peut être expliqué par le caractère lymphoblastoïde de ces cellules (tableau 4) (Ling et al., 1989; Siemer et al., 2008).

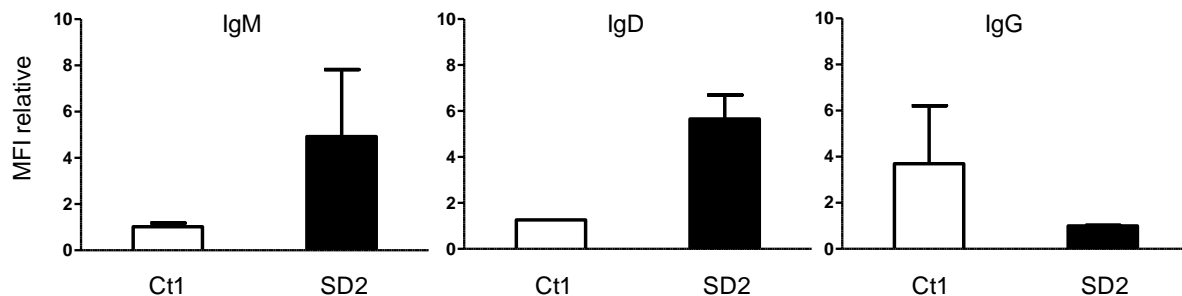
	SD2	Ct1
CD5	-	-
CD19	+	+
CD20	+	+
CD22	+	+
CD23	+	+
CD38	+	+

**Tableau 4: Marqueurs de surface des lignées SD2 et Ct1.**

*L'expression des marqueurs de surface a été analysée par cytométrie en flux (BD FACS Canto II, BD FACS Diva software V6.1.3, BD Biosciences™) après un marquage des cellules avec des anticorps anti -CD5/PE-Cy7, -CD19/PercP Cyan, -CD20/APC-Cy7, -CD22/PE, -CD23/PE, -CD38/APC humains (BD Biosciences™).*

Nous avons poursuivi la caractérisation des cellules en étudiant par cytométrie en flux l'expression membranaire des immunoglobulines. Nos résultats montrent que les cellules SD2 expriment à la fois des IgM et des IgD alors que les cellules Ct1 expriment des IgG (figure 28).

Ces résultats permettent de conclure que les cellules Ct1 sont des lymphocytes B matures activés ayant subi la commutation de classe (CSR) alors que les cellules SD2 semblent correspondre à des lymphocytes B matures naïfs n'ayant pas encore subi la CSR.



**Figure 28: Immunoglobulines membranaires exprimées par les lignées Ct1 et SD2.**

*L'expression membranaire des immunoglobulines a été analysée par cytométrie en flux (BD FACS Canto II, BD FACS Diva software V6.1.3, BD Biosciences™) après marquage membranaire des cellules avec des anticorps anti- IgG/FITC, IgM/FITC ou IgD/FITC polyclonales humaines (Dakocytomation™). La moyenne des moyennes des intensités de fluorescence (MFI) a été analysée sur 3 échantillons et rapportée à celle de l'isotype. Les barres d'erreur correspondent aux écarts types.*

Enfin, l'expression de STAT1 dans les cellules Ct1 et son absence d'expression dans les cellules SD2 ont été confirmées aux niveaux protéique (Western Blot, figure 29A) et transcriptionnel (RT-QPCR, figure 30).

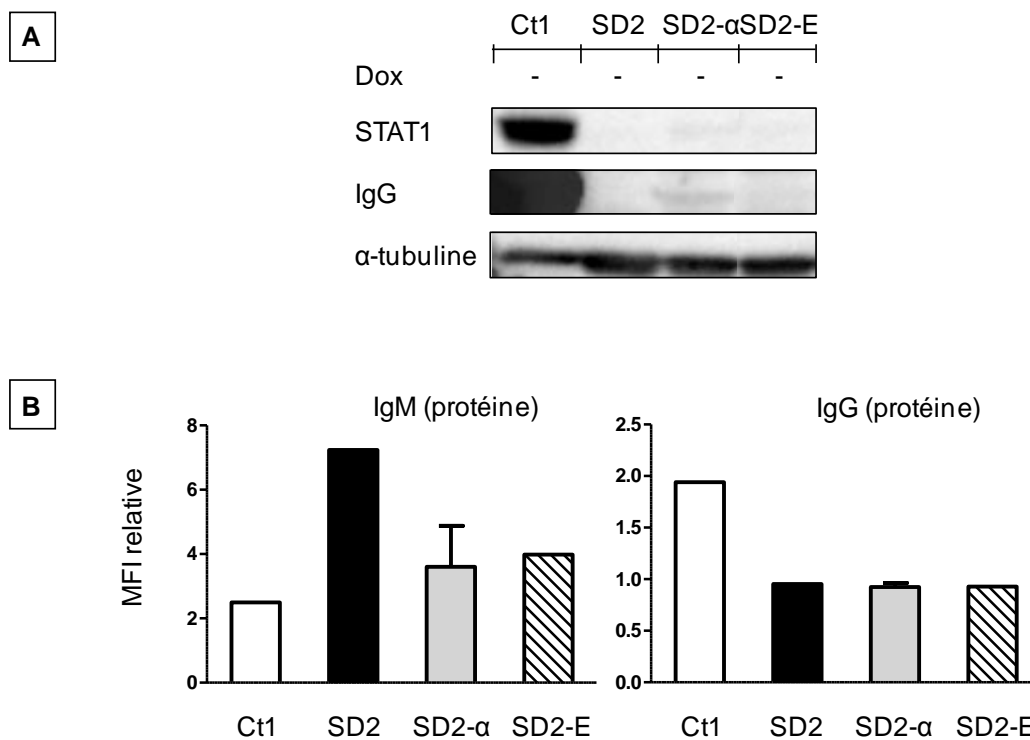
#### **4.1.4.2 DECLENCHEMENT DE LA COMMUTATION DE CLASSE DES CELLULES SD2 PAR LA TRANSFECTION INDEPENDAMMENT DE STAT1**

---

Afin d'étudier les effets de STAT1 sur l'expression des immunoglobulines dans les cellules SD2, ces dernières ont été transfectées en utilisant l'électroporation (Amaxa® Cell Line Nucleofector® Kit V, programme X001, Nucleofector® 2b Device, Lonza™).

Le plasmide utilisé pour induire l'expression de STAT1 $\alpha$  dans les cellules SD2- $\alpha$  est le pNGFR-STAT1 $\alpha$  (Baran-Marszak et al., 2004).

Ce dernier induit l'expression continue d'un gène de résistance à l'hygromycine et contient un promoteur bidirectionnel inducible par la doxycycline qui contrôle l'expression de STAT1 $\alpha$  et du récepteur tronqué du facteur de croissance neuronal (*Nerve Growth Factor Receptor*, *NGFR*) utilisé comme rapporteur de l'induction. Dans le but d'obtenir un contrôle négatif pour l'expression de STAT1 $\alpha$ , les cellules SD2 ont été transfectées par le pNGFR-vide (obtention des cellules SD2-Empty ou SD2-E) ne contenant pas la cassette d'expression de STAT1 $\alpha$ .



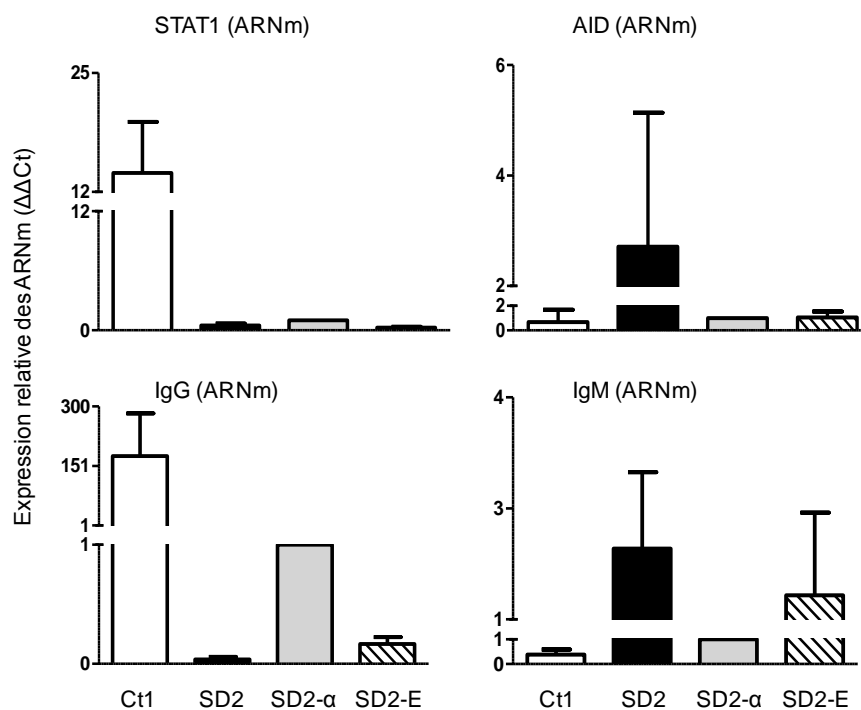
**Figure 29: Expression protéique de STAT1 et des immunoglobulines par les cellules SD2- $\alpha$  et SD2-E après sélection des cellules transfectées.**

L'expression protéique de STAT1, des IgG et des IgM a été étudiée dans les lignées Ct1, SD2 ainsi que dans les cellules SD2- $\alpha$  et SD2-E après 30 jours de sélection par l'hygromycine post-transfection. A: Etude par Western Blot de l'expression de STAT1, des IgG et de l' $\alpha$ -tubuline utilisée comme référence. B: Analyse par cytométrie en flux de l'expression des IgM et des IgG (polyclonal anti human IgM/FITC ou IgG/FITC, Dakocytomation™ ; BD FACS Canto II, BD FACS Diva software V6.1.3, BD Biosciences™). La moyenne des intensités de fluorescence (MFI) a été analysée sur un ou trois échantillons et rapportée à l'isotype. Les barres d'erreur correspondent aux écarts types.

Au terme de 30 jours de sélection par l'hygromycine après la transfection, l'expression de STAT1 et des immunoglobulines dans les SD2- $\alpha$  et les SD2-E a été étudiée avant l'induction par la doxycycline de l'expression de STAT1 $\alpha$  dans les SD2- $\alpha$ .

Nous avons confirmé l'absence d'expression de STAT1 dans les cellules SD2-E aux niveaux protéique et transcriptionnel (figures 29A et 30). Par contre, un très faible niveau d'expression de STAT1 $\alpha$  a été observé dans les cellules SD2- $\alpha$  aussi bien au niveau protéique qu'au niveau transcriptionnel sans traitement par la doxycycline. Ce résultat met en évidence une discrète fuite du système inductible que comporte le plasmide pNGFR-STAT1 $\alpha$ . L'étude transcriptionnelle et protéique de l'expression des IgG a mis en évidence son apparition dans les cellules SD2- $\alpha$  ainsi que dans les cellules SD2-E à un très faible niveau d'expression (figures 29A et 30).

Ces résultats traduisent le déclenchement et la réalisation de la commutation de classe des immunoglobulines (CSR) dans les cellules SD2- $\alpha$  et SD2-E pendant les 30 jours de sélection post-transfection.



**Figure 30: Etude transcriptionnelle de l'expression de STAT1, des immunoglobulines et de l'AID dans les cellules SD2- $\alpha$  et SD2 après sélection des cellules transfectées.**

L'étude transcriptionnelle a été menée dans les lignées Ct1, SD2 ainsi que dans les cellules SD2- $\alpha$  et SD2-E après 30 jours de sélection par l'hygromycine post-transfection. L'expression de STAT1, des IgG membranaires, des IgM, de l'AID et de la cyclophiline utilisée comme référence, a été analysée par RT-QPCR avec des sondes Taqman spécifiques (STAT1, Hs 01014007-m1 ; Mb IgG, Hs 00179866\_m1 ; AICDA, Hs 00757808\_m1 ; Cyclophilin A, Hs 99999904\_m1 ; Applied

*Biosystems™) en utilisant l'Abiprism 7000 (Applied Biosystems™). Les niveaux d'expression relatifs de chaque gène ont été calculés selon la méthode des  $\Delta\Delta Ct$  en effectuant une première normalisation par rapport à la cyclophiline ( $\Delta Ct$ ) puis par rapport au  $\Delta Ct$  des cellules SD2- $\alpha$  après 30 jours de sélection par l'hygromycine. Chaque expression relative correspond à une expérience ou à la moyenne de quatre expériences indépendantes, chacune des expériences ayant été effectuées en duplicate. Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard à la moyenne (SEM).*

Comme attendu, la réalisation de la CSR dans les populations cellulaires SD2- $\alpha$  et SD2-E s'est accompagnée d'une forte diminution du niveau d'expression des IgM (figures 29B et 30). Nous pouvons supposer qu'à plus long terme l'ensemble des cellules aient achevé la CSR, renouvelé leur BCR et n'expriment plus que des IgG. De plus, notre étude transcriptionnelle de l'expression de l'AID, enzyme clé de la CSR, a mis en évidence une forte diminution de son niveau d'expression dans les cellules SD2- $\alpha$  et SD2-E après 30 jours de sélection comparativement au niveau d'expression de l'AID dans la lignée SD2 (figure 30). Ce résultat semble confirmer la réalisation de la CSR dans nos cellules puisqu'il est en accord avec les travaux de Xu *et al* qui ont démontré que le niveau d'expression de l'AID augmente avant la CSR et diminue une fois ce mécanisme achevé (Xu et al., 2007).

L'ensemble de ces résultats démontre que la CSR a été déclenchée et effectuée dans les cellules SD2 suite à leur transfection et indépendamment de l'expression de STAT1 (cellules SD2-E). L'étude du rôle de STAT1 dans l'expression des immunoglobulines a donc été réalisée dans des lymphocytes B matures activés ayant achevé la CSR et exprimant des IgG (cellules SD2- $\alpha$ ).

## 4.2 STAT1 INDUIT UNE REponse VERS LA SURVIE CELLULAIRE VIA C-ABL ET P53

### 4.2.1 INTRODUCTION

La seconde orientation de mon projet de thèse a porté sur la mise en évidence des implications de STAT1 dans les mécanismes de réparation de l'ADN au cours de traitements génotoxiques et de son rôle dans la survenue de résistances. Pour cela, nous avons utilisé des agents alkylants qui mobilisent, dans la cellule, les systèmes de réparation de type MMR. Comme nous l'avons décrit dans l'introduction le système MMR est formé d'un complexe multi protéique composé de MSH2/MSH6 (hMuS $\alpha$ ) et MLH1/PMS2 (hMutL $\alpha$ ). Les lésions faisant intervenir le complexe hMuS $\alpha$ /hMutL $\alpha$  ont généré des mésappariements. Le mécanisme de réparation, pour être efficace, nécessite un arrêt transitoire du cycle cellulaire et fait intervenir, au niveau de la transition G2/M, les facteurs ATR/Chk1 et/ou ATM/Chk2. Lorsque les lésions de l'ADN deviennent trop importantes le système de réparation n'est plus suffisant et la cellule reçoit alors des signaux conduisant à la mort cellulaire. De nombreuses études s'intéressant aux mécanismes régulateurs du cycle cellulaire ont proposé des candidats pouvant influencer cette orientation vers la réparation de l'ADN ou l'apoptose cellulaire. Parmi ces facteurs régulant l'avancée du cycle cellulaire et l'apoptose, les protéines p53 ou c-Abl apparaissent par exemple des acteurs potentiels de cette orientation.

STAT1, en dehors de son rôle dans l'immunité décrit précédemment, peut également jouer un rôle antiprolifératif et pro-apoptotique. Nous avons décrit dans l'introduction qu'il est impliqué dans la progression du cycle cellulaire par son rôle transcriptionnel dans l'expression de plusieurs facteurs importants pour cette régulation. En effet, STAT1 régule l'expression de la p21 et de la p27, deux inhibiteurs des CDKs, régulant ainsi la progression G1/S. STAT1 inhibe aussi l'expression de c-Myc et facilite l'arrêt en G2/M en induisant l'expression de la kinase Chk2 par ATM. Par ailleurs, STAT1 régule l'expression à la fois de gènes pro- et anti-apoptotiques: il régule l'expression de la p53 de manière directe mais aussi en inhibant l'expression de Mdm2 qui la régule négativement. Ceci favorise l'expression des gènes cibles de la p53 tels Bax, Noxa et Fas.



Il est donc apparu intéressant d'analyser les cibles de STAT1 dans la modulation de la réponse cellulaire induite par le MMR et d'évaluer comment STAT1 pourrait participer à cette orientation de la réponse entre réparation de l'ADN et apoptose cellulaire après exposition aux agents génotoxiques tels que le MNNG (*N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoGuanidine*).

#### 4.2.2 RESULTATS

Nous avons utilisé deux lignées cellulaires de fibrosarcome, l'une exprimant STAT1 (STAT1+/+) et l'autre n'exprimant pas STAT1 (STAT1-/-). L'utilisation de cette seconde lignée a également permis l'analyse de la réexpression de STAT1 sur les mécanismes de réparation et de survie. Ces lignées ont été exposées au MNNG.

Nous avons montré que la survie à court terme de ces cellules exposées au MNNG est indépendante de l'expression de STAT1. En revanche, l'expression ou la réintroduction de STAT1 est impliquée dans la survie à long terme de ces cellules suggérant que STAT1 favorise l'établissement de résistance au MNNG.

Nos mesures de l'efficacité de réparation de l'ADN après exposition au MNNG ont montré une différence importante entre les cellules exprimant ou non STAT1. En présence de STAT1, le nombre de cassures double brin de l'ADN, visualisées par la protéine H2AX phosphorylée ( $\gamma$ H2AX), reste limité alors qu'il augmente graduellement et de manière significative dans les cellules déficientes en STAT1. Ces résultats montrent que STAT1 est nécessaire à la réparation rapide et efficace des lésions de l'ADN causées par le MNNG.

Nous avons également analysé la progression dans le cycle cellulaire de ces cellules après exposition au MNNG et avons observé que STAT1 est nécessaire à une progression normale évitant l'accumulation des cellules en G2/M.

Nous avons alors analysé le complexe protéique interagissant physiquement avec les complexes MMR suite à un stress causé par les agents génotoxiques et formé autour de la protéine p53. Par une technique de précipitation d'oligonucléotide nous avons mis en évidence, après traitement au MNNG, un nouveau complexe p53/MLH1 pas encore décrit dans les cellules déficientes en STAT1, montrant ainsi une implication de MLH1 dans un complexe protéique différent de celui du système MMR. Nous avons montré que STAT1 et c-Abl participaient à ce complexe, c-Abl étant alors recruté grâce à la présence de STAT1.

L'utilisation d'un inhibiteur de c-Abl (STI 571 ou Gleevec ou Imatinib) a montré que la formation de ce complexe ne requiert pas son activité de kinase.

En revanche, notre analyse dans ce contexte de l'activité métabolique ou de la mort cellulaire a montré que la présence ou non de STAT1 va orienter les mécanismes de mort cellulaire mis en jeu faisant alors intervenir ou non l'activité kinase de c-Abl.

Conclusion:

Nous avons montré, dans ces modèles cellulaires, que STAT1, suite aux lésions de l'ADN causées par les agents alkylants génotoxiques, participait à la survie cellulaire et était nécessaire à une réparation rapide et efficace des lésions de l'ADN. Il favorisait un arrêt transitoire et une reprise de la progression du cycle cellulaire. De plus, STAT1 permet la formation d'un complexe STAT1/p53/c-Abl/MLH1 indépendant de l'activité kinase de c-Abl. Ces données appuient des travaux récents sur l'utilisation d'inhibiteurs de c-Abl en association avec des agents alkylants où la réponse fonctionnelle du système MMR semble importante pour augmenter leur efficacité. STAT1 semble donc être une cible possible pour augmenter l'efficacité des agents alkylants.

#### 4.2.3 ARTICLE 2: STAT1 ORIENTATES CELLULAR RESPONSE TO ALKYLATING AGENT MNNG.

L. Ah-Koon\*, E. Lemadre\*, D. Lesage, I.Souissi, B. Dondi, R. Fagard, N. Varin Blank, E. Fabre, O. Schischmanoff.

\*co-first authors.

# DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Afin de déterminer de nouveaux rôles anti-tumoraux de STAT1 nous nous sommes intéressés à son implication dans l'immunité adaptative et dans la réponse à un stress causé par les agents génotoxiques. Nous avons tout d'abord poursuivi l'étude des mécanismes régulés par STAT1 dans l'expression des immunoglobulines en utilisant des cellules B matures déficientes en STAT1. Nous avons montré que même si STAT1 a la capacité de se fixer sur des éléments promoteurs de gènes cibles il va plutôt, dans ce cadre, moduler l'activation d'un autre membre de la famille, STAT3, lui-même impliqué dans la différenciation plasmocytaire. Nous avons également dans un deuxième temps évalué l'implication possible de STAT1 dans l'orientation de la signalisation déclenchée par les complexes de réparation vers une survie voire une résistance cellulaire. Là encore nous avons montré qu'il participe à ces complexes apportant des facteurs essentiels à une réparation efficace.

## **Rôle de STAT1 dans l'immunité adaptative et l'expression des immunoglobulines**

En tant que principal effecteur des interférons, un rôle majeur de STAT1 a été décrit dans l'immunité innée responsable de l'immunodéficience mortelle observée chez les rares patients présentant une déficience complète en STAT1. Ses effets dans l'immunité adaptative ont été moins étudiés bien qu'ils puissent contribuer à l'établissement de l'immunodéficience. Notre équipe a récemment démontré que STAT1 rétablit l'expression d'un BCR fonctionnel dans les lymphocytes B matures activés en utilisant une lignée lymphoblastoïde issue d'un patient déficient en STAT1 (lignée SD1). Dans le travail présent, nous avons confirmé ces effets de STAT1 dans une autre lignée lymphoblastoïde issue d'un second patient ayant une déficience complète en STAT1 (lignée SD2) et mis en évidence que le mécanisme sous-jacent implique une modulation de STAT3 et de l'expression de BLIMP1.

## **STAT1 n'est pas nécessaire à la commutation de classe des immunoglobulines**

Dans un premier temps, nous avons caractérisé la nouvelle lignée SD2 et établi qu'elle correspond à des lymphocytes B matures exprimant à la fois des IgM et des IgD. Bien que ce résultat soit en faveur d'un caractère naïf, le degré d'activation de ces cellules reste à déterminer.

En effet, conformément à leur contexte lymphoblastoïde, elles expriment certains marqueurs d'activation tels que le CD23 ou le CD38 (Ling et al., 1989; Ling and Lowe, 1989; Siemer et al., 2008).

Afin d'étudier les effets de STAT1 sur l'expression des immunoglobulines, les cellules SD2 ont été transfectées par un plasmide contrôlant l'expression inductible par la doxycycline de STAT1 $\alpha$  (cellules SD2- $\alpha$ ) ou par un plasmide vide (cellules SD2-E). Après 30 jours de sélection par l'hygromycine des cellules transfectées, et avant tout traitement par la doxycycline, l'analyse des immunoglobulines présentes a révélé l'expression d'IgG associée à une forte diminution de l'expression des IgM et de l'AID dans chacune des populations cellulaires. Ces résultats mettent en évidence le déclenchement et la poursuite de la commutation de classe des immunoglobulines (CSR) dans les cellules SD2- $\alpha$  et SD2-E au cours des 30 jours de sélection. Les événements déclenchant la CSR restent à approfondir mais il est probable que leur caractère lymphoblastoïde y contribue. En effet, il a été démontré que l'infection par l'EBV et la production de la protéine virale LMP1 favorisent le déclenchement de la CSR (Gutzeit et al., 2014; He et al., 2003; Rastelli et al., 2008)

Dans ce projet, et conformément aux résultats d'Avery *et al.* (Avery *et al.*, 2010), nos résultats permettent de conclure que le déclenchement et la réalisation de la CSR restent indépendants de l'expression de STAT1 dans notre modèle cellulaire.

### **STAT1 augmente l'expression membranaire des immunoglobulines**

Notre présente étude de la modulation de l'expression des immunoglobulines par STAT1 a ainsi été réalisée dans des lymphocytes B matures activés exprimant un faible niveau d'IgG (lignée SD2- $\alpha$ ). Nos résultats ont montré, comme précédemment dans la lignée SD1- $\alpha$  (Najjar et al., 2010), que STAT1 augmente l'expression transcriptionnelle et protéique des IgG membranaires. L'expression de la forme membranaire ou sécrétée des immunoglobulines à partir du gène codant leur chaîne lourde (*IgH*) dépend du site de polyadénylation utilisé lors de la transcription de ce gène (Peterson, 2007). La relative stabilité du niveau d'expression de l'ensemble des IgG membranaires et sécrétées que nous avons observée suite à l'induction de l'expression de STAT1, suggère donc que l'augmentation de l'expression de la forme membranaire des IgG s'est effectuée aux dépens de l'expression de leur forme sécrétée.

## **L'équilibre STAT1: STAT3 interfère sur l'expression de BLIMP1**

L'utilisation du premier ou du second site de polyadénylation lors de la transcription du gène *IgH* est régulée en faveur de l'expression de la forme sécrétée des immunoglobulines au cours de la différenciation plasmocytaire. C'est pourquoi, afin d'explorer le mécanisme d'action de STAT1 impliqué dans la modulation de l'expression des immunoglobulines membranaires, nous avons étudié et analysé à la fois l'expression du principal régulateur de ce processus, BLIMP1, et l'activation de STAT3, un partenaire possible de STAT1, mais aussi un régulateur essentiel de *PRDM1* le gène codant BLIMP1.

## **Détournement des voies de signalisation activatrices de STAT3 au profit de STAT1**

L'ensemble de notre étude cinétique après induction de l'expression de STAT1 $\alpha$  dans les cellules SD2- $\alpha$ , suggère que STAT1 augmente l'expression membranaire des IgG par une altération de l'activation de STAT3 qui conduit à une régulation négative de l'expression de BLIMP1. L'induction de l'expression de l'isoforme STAT1 $\beta$ , dont la majeure partie du TAD est tronquée, conduit à une modulation identique de l'expression de phospho-STAT3 et de BLIMP1. Bien que l'isoforme STAT1 $\beta$  soit considérée comme un dominant négatif de l'isoforme STAT1 $\alpha$ , ce résultat met en évidence un nouveau rôle commun aux deux isoformes dans la modulation de l'expression des immunoglobulines et un rôle individuel supplémentaire pour STAT1 $\beta$ .

L'augmentation de l'expression des immunoglobulines membranaires par STAT1 que nous avons observée semble contradictoire avec la diminution de l'expression des immunoglobulines sécrétées qui a été décrite par Deenick *et al* après stimulation par le ligand du CD40 et l'IL-21 de lymphocytes B présentant une déficience partielle en STAT1 (Deenick et al., 2013). Cette divergence apparente peut être expliquée par l'utilisation de deux stratégies dans deux modèles cellulaires différents. Deenick *et al* ont étudié les effets de STAT1 sur la différenciation plasmocytaire en stimulant des lymphocytes B matures partiellement déficients en STAT1. Nous avons, de notre côté, induit l'expression de STAT1 dans des lymphocytes B matures présentant une déficience complète en STAT1 dans un contexte de stimulation constante par LMP1. Dans le contexte lymphoblastoïde de notre modèle cellulaire, LMP1 mime la signalisation du CD40 et permet une stimulation constante des cellules par l'IFN $\gamma$  et l' IL-6 *via* des boucles autocrines (Gires et al., 1999; Hatzivassiliou and Mosialos, 2002; Najjar et al., 2005; Nepomuceno et al., 2002; Weber-Nordt et al., 1996). Ceci conduit à une activation constitutive de STAT1 et de STAT3.

Ainsi, il est possible de considérer que notre travail correspond à une étude dynamique de l'effet de STAT1 sur l'expression des immunoglobulines utilisant une modulation de l'équilibre STAT1:STAT3.

Plusieurs interrelations entre les signalisations de STAT1 et de STAT3 ont été décrites à la fois dans les contextes de déficience complète en STAT1 ou en STAT3. Ainsi, la déficience en l'un des deux facteurs peut être compensée par une régulation transcriptionnelle exercée en remplacement par l'autre facteur (Costa-Pereira et al., 2002; Qing and Stark, 2004; Schiavone et al., 2011). Nous pouvons donc supposer que dans l'état initial de déficience en STAT1 des cellules SD2- $\alpha$ , STAT3 soit fortement activé par LMP1 et remplace STAT1 pour certaines de ses fonctions. Lorsque l'expression de STAT1 est induite dans ce contexte, les voies de signalisation de LMP1 activant les STATs pourraient être détournées au profit de STAT1 pendant une période transitoire jusqu'à ce qu'un nouvel état d'équilibre STAT1:STAT3 soit atteint dans la cellule. Cette période transitoire pourrait refléter un nouvel exemple d'interaction STAT1:STAT3 dans le contexte de la régulation de l'expression des immunoglobulines. Cette interaction avec la diminution des formes phosphorylées de STAT3 pourrait d'ailleurs empêcher sa translocation nucléaire et donc inhiber sa régulation de *PRDM1*.

### **Compétition STAT1:STAT3 pour la régulation transcriptionnelle de PRDM1?**

STAT3 régule l'expression de *PRDM1* par l'intermédiaire de sites GAS qui ont été en partie décrits chez la souris mais pas chez l'homme (Horvath et al., 1995; Kwon et al., 2009; Seidel et al., 1995). Nos résultats démontrent que STAT3, STAT1 $\alpha$  ainsi que STAT1 $\beta$  sont capables de se fixer aux sites GAS I1 et I3 de *PRDM1* dans nos modèles cellulaires. Nous pouvons donc aussi supposer que STAT1 entre en compétition avec STAT3 pour la fixation à ces sites GAS. Cette compétition pourrait correspondre à un mécanisme de régulation négative de l'expression de BLIMP1 par STAT1 autre que le détournement des voies de signalisation de LMP1.

### **Perspectives**

Afin de confirmer les hypothèses de mécanismes d'actions de STAT1 pour la modulation de l'expression des immunoglobulines, plusieurs études complémentaires devraient être menées.

Tout d'abord, l'utilisation d'un mutant de STAT1 pour son domaine de liaison à l'ADN permettrait de déterminer si STAT1 régule négativement l'expression de BLIMP1 indépendamment de son activité transcriptionnelle directe. Si cette indépendance était avérée, nous pourrions alors confirmer que l'expression *de novo* de STAT1 entraîne une régulation négative de l'activation de STAT3 par détournement de ses voies de signalisation activatrices. Concernant la compétition STAT1:STAT3 pour la fixation aux sites GAS de *PRDMI*, une étude transcriptionnelle de l'expression du gène en fonction des quantités variables de phospho-STAT1 et phospho-STAT3 permettrait d'évaluer à la fois leurs affinités pour chacun des sites GAS et de déterminer si la fixation de STAT1 induit ou non la transcription de *PRDMI*. Enfin, des analyses en ChIP-seq (UCSC) sont en faveur de la fixation de STAT3 et de STAT1 à un troisième site GAS qui est situé dans le quatrième intron de *PRDMI* (I4). Bien que la séquence de I4 ne corresponde pas à une séquence GAS canonique et que cet élément soit situé dans une région régulatrice moins active que I1 ou I3, son implication dans le mécanisme d'action de STAT1 devrait également être évaluée.

### **STAT1 participe à la résistance cellulaire au cours d'un traitement par un agent alkylant**

#### **STAT1 participe à des complexes de réparation de l'ADN**

La réponse cellulaire aux agents alkylants fait appel à différents systèmes de réparation. Le MNNG est un agent alkylant de type  $S_N1$  très génotoxique et de courte durée de vie donc inapproprié à une utilisation clinique. Il lui est préféré le témozolomide moins toxique et souvent utilisé en thérapeutique en combinaison avec d'autres chimiothérapies notamment pour les tumeurs du système nerveux central. Le MNNG est un agent qui induit des méthylations de l'ADN  $O^6$ -MeG provoquant la formation de mésappariements au cours de la réplication de l'ADN. Ces mésappariements sont reconnus par les protéines du système MMR avec notamment les protéines MSH2, MSH6, MLH1 et PMS2. Le système MMR peut également être sollicité au cours de la commutation de classe (Grigera et al., 2013; Schrader et al., 2002). Les protéines du système MMR provoquent des cassures double-brin de l'ADN, détectées rapidement par le complexe MRN (Mre11/Rad50/NSB1), ATM et H2AX. Cette détection sert d'amplification du signal et fait appel à des effecteurs tels que la p53, c-Abl, Chk2, provoquant ainsi un arrêt du cycle cellulaire le temps de la réparation de l'ADN.



Des systèmes de réparation de l'ADN tels que le BER ou la HR se mettent en place et orientent la réponse cellulaire vers la survie lors d'une réparation efficace ou vers l'apoptose lorsque celle-ci n'a pas pu être réalisée. Cependant, les facteurs impliqués dans cette orientation ne sont pas encore totalement élucidés.

Dans le cadre de ce travail, en cherchant à approfondir les mécanismes par lesquels STAT1 peut exercer un rôle suppresseur de tumeur nous avons recherché son implication dans cette réponse aux agents génotoxiques. Compte tenu de ses rôles pro-apoptotiques et antiprolifératifs déjà décrits, nous avons recherché son implication dans la formation des complexes de réparation. Nous avons décrit dans la première partie de mes résultats son implication dans la balance des fonctions médiées par STAT3, nous avons donc recherché dans le contexte de la réparation si STAT1 pouvait là encore orienter le choix des partenaires impliqués. STAT1 a déjà été associé à la résistance aux dommages par irradiation ou par la doxorubicine (Khodarev et al., 2007; Weichselbaum et al., 2008). Des études effectuées au laboratoire ont montré que suite à un traitement de cellules lymphoprolifératives par des agents intercalants dont la fludarabine et la doxorubicine, on retrouve des associations deux à deux entre p53/STAT1, STAT1/ATM et p53/c-Abl, STAT1/c-Abl. Ces résultats ont conduit à proposer un modèle où STAT1 entrerait dans la formation d'un complexe composé de ATM/p53/c-Abl (Baran-Marszak et al., 2004; Youlyouz-Marfak et al., 2008). ATM servirait alors de plateforme permettant l'activation coordonnée de STAT1, de la p53 et de c-Abl.

Nos résultats montrent que, suite à un traitement par le MNNG, STAT1 a un rôle clé en entrant dans la composition d'un complexe basé sur la séquence cible de la p53 et qui fait le lien entre les protéines de la réparation et les régulateurs transcriptionnels de la réponse cellulaire de survie. En effet, en absence de STAT1, nous avons observé la formation d'un complexe composé uniquement de MLH1/p53 orientant la réponse cellulaire vers l'apoptose. La présence de STAT1 dans ces mêmes cellules, permet le recrutement de c-Abl pour former un complexe différent composé de STAT1/c-Abl/MLH1/p53. La présence à la fois de STAT1 et de c-Abl, tous deux modulateurs de p53, dans le complexe devrait permettre de réguler à la fois qualitativement et quantitativement les cibles transcriptionnelles de p53 modulant ses effets pro-apoptotiques et sur le cycle cellulaire. D'autres études similaires à la notre ont montré que dans des lignées cellulaires humaines du cancer du colon traitées par le MNNG, STAT1 interagit directement avec p53 et permet la transcription de gènes cibles pro-apoptotiques de p53 dont Mdm2 (Townsend et al., 2004).

## **La présence de STAT1 sensibilise les cellules à la toxicité du MNNG *via* l'activité kinase de c-Abl mais favorise aussi une résistance à plus long terme**

Alors que la présence de STAT1 n'est pas nécessaire à la réparation de l'ADN dans un contexte physiologique, nos résultats ont montré que la présence de STAT1 était essentielle lors d'un besoin massif de réparation dû à l'exposition aux agents alkylants.

De plus, l'utilisation de STI571, inhibiteur spécifique de l'activité kinase de c-Abl, a démontré que la toxicité cellulaire du MNNG était, en présence de STAT1, dépendante de cette activité. Il semble donc que cette activité kinase de c-Abl favorise à la fois une progression du cycle cellulaire avec seulement un arrêt transitoire en phase G2/M, et une réparation efficace avec une activation limitée des histones H2AX. Ces résultats sont en accord avec des travaux montrant une implication de l'activité kinase de c-Abl dans la régulation transcriptionnelle de GADD45 $\alpha$  et dans la stabilisation des formes phosphorylées de RAD51 et RAD52 (Kitao and Yuan, 2002; Shimizu et al., 2009; Wagner et al., 2008) menant tous deux à une réparation efficace de l'ADN.

Certaines études cliniques utilisant des thérapies anticancéreuses associant le STI571 (Imatinib) à des agents alkylants tels que le bisulfan et le treosulfan ont montré une résistance accrue des cellules tumorales à l'action des agents. Nos résultats indiquent que STAT1 semble être impliquée dans cette résistance à long terme permettant une survie clonogénique.

Plusieurs études ont alimenté une controverse sur le rôle de STAT1 dans la sensibilité (Thomas et al., 2004; Townsend et al., 2005; Townsend et al., 2004; Youlyouz-Marfak et al., 2008) ou à l'opposé la résistance (Efimova et al., 2009; Khodarev et al., 2007; Khodarev et al., 2009; Khodarev et al., 2012; Rickardson et al., 2005; Roberts et al., 2005; Weichselbaum et al., 2008) des cellules en fonction de l'agent génotoxique et du modèle cellulaire employés. Il semble, là encore, que la capacité de STAT1 à interagir avec différents facteurs dont la p53, ATM et c-Abl soit essentielle à la régulation du cycle cellulaire, la réparation des lésions de l'ADN et/ou l'apoptose cellulaire. Nos résultats ont également mis en évidence une implication possible à la fois de STAT1 $\alpha$  et STAT1 $\beta$  dans ces mécanismes puisque la réexpression à de hauts niveaux de STAT1 $\alpha$  seul n'a pas permis de reconstituer totalement la réponse cellulaire aux génotoxiques.

## **Perspectives**

Il resterait intéressant de vérifier si STAT1 peut servir de lien entre l'orientation d'autres complexes de réparation faisant par exemple appel à ATM et les cibles transcriptionnelles de p53 menant à la réponse apoptotique des cellules. Là encore, STAT1, dans ce complexe avec ATM, pourrait permettre le recrutement et l'activation de c-Abl orientant ainsi en fonction de sa présence la réponse cellulaire vers la réparation de l'ADN par le système HR ou vers l'apoptose par la p53.

## **Conclusion**

Notre étude dynamique de l'induction de l'expression de STAT1 dans un contexte de déficience complète en STAT1 a mis en évidence un nouvel impact de l'équilibre STAT1:STAT3 dans le cadre de l'expression des immunoglobulines. STAT1 interfère dans la régulation de l'expression de BLIMP1 par STAT3 et rétablit l'expression d'un BCR fonctionnel aux dépens de la sécrétion d'immunoglobulines par les lymphocytes B matures activés. Ainsi, le très faible niveau d'expression du BCR qui est observé dans les lignées de lymphocytes B matures activés issues des patients présentant une déficience complète en STAT1, pourrait contribuer au développement de leur profil d'immunodéficiência. D'un point de vue physiologique, STAT1 semble donc être impliqué de façon indirecte dans la régulation de la différenciation plasmocytaire. L'équilibre des stimulations activatrices de STAT1 et STAT3 pourrait par conséquent moduler la réponse immunitaire adaptative et contribuer ainsi à l'obtention d'une réponse immunitaire anti-tumorale efficace.

De même, la participation de STAT1 aux complexes de réparation de l'ADN au cours de traitements génotoxiques qui modifie le recrutement des effecteurs de ces systèmes contribue à la bonne prise en charge des lésions de l'ADN et à une réponse cellulaire en faveur de la survie. L'apparition de résistances à plus long terme lors de traitements aux agents alkylants étant sensible à la présence de STAT1 ainsi qu'à l'activité de c-Abl, il semble important au niveau thérapeutique de ne pas combiner ces traitements avec l'utilisation d'inhibiteurs de l'activité de la kinase. Au contraire, cette dépendance de la résistance à l'apoptose vis à vis de la présence de STAT1 pourrait être utilisée comme une stratégie thérapeutique pour augmenter l'efficacité des traitements alkylants en ciblant son expression.

Enfin, compte tenu des fortes similarités entre les séquences régulatrices reconnues par différents membres de la famille STAT il semble intéressant de trouver de nouveaux inhibiteurs spécifiques qui permettraient un ciblage précis des différentes protéines.

# BIBLIOGRAPHIE

- Aaronson, D.S., and C.M. Horvath. 2002. A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science*. 296:1653-1655.
- Adamkova, L., K. Souckova, and J. Kovarik. 2007. Transcription protein STAT1: biology and relation to cancer. *Folia Biol (Praha)*. 53:1-6.
- Afkarian, M., J.R. Sedy, J. Yang, N.G. Jacobson, N. Cereb, S.Y. Yang, T.L. Murphy, and K.M. Murphy. 2002. T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells. *Nat Immunol*. 3:549-557.
- Aittomaki, S., M. Pesu, B. Groner, O.A. Janne, J.J. Palvimo, and O. Silvennoinen. 2000. Cooperation among Stat1, glucocorticoid receptor, and PU.1 in transcriptional activation of the high-affinity Fc gamma receptor I in monocytes. *J Immunol*. 164:5689-5697.
- Aittomaki, S., J. Yang, E.W. Scott, M.C. Simon, and O. Silvennoinen. 2002. Distinct functions for signal transducer and activator of transcription 1 and PU.1 in transcriptional activation of Fc gamma receptor I promoter. *Blood*. 100:1078-1080.
- Ak, P., and A.J. Levine. 2010. p53 and NF-kappaB: different strategies for responding to stress lead to a functional antagonism. *FASEB J*. 24:3643-3652.
- Alinikula, J., K.P. Nera, S. Junttila, and O. Lassila. 2011. Alternate pathways for Bcl6-mediated regulation of B cell to plasma cell differentiation. *Eur J Immunol*. 41:2404-2413.
- Antunes, F., A. Marg, and U. Vinkemeier. 2011. STAT1 signaling is not regulated by a phosphorylation-acetylation switch. *Mol Cell Biol*. 31:3029-3037.
- Avalle, L., S. Pensa, G. Regis, F. Novelli, and V. Poli. 2012. STAT1 and STAT3 in tumorigenesis: A matter of balance. *JAKSTAT*. 1:65-72.
- Avery, D.T., E.K. Deenick, C.S. Ma, S. Suryani, N. Simpson, G.Y. Chew, T.D. Chan, U. Palendira, J. Bustamante, S. Boisson-Dupuis, S. Choo, K.E. Bleasel, J. Peake, C. King, M.A. French, D. Engelhard, S. Al-Hajjar, S. Al-Muhsen, K. Magdorf, J. Roesler, P.D. Arkwright, P. Hissaria, D.S. Riminton, M. Wong, R. Brink, D.A. Fulcher, J.L. Casanova, M.C. Cook, and S.G. Tangye. 2010. B cell-intrinsic signaling through IL-21 receptor and STAT3 is required for establishing long-lived antibody responses in humans. *J Exp Med*. 207:155-171.
- Bakkenist, C.J., and M.B. Kastan. 2003. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*. 421:499-506.
- Baran-Marszak, F., J. Feuillard, I. Najjar, C. Le Clorenec, J.M. Bechet, I. Dusanter-Fourt, G.W. Bornkamm, M. Raphael, and R. Fagard. 2004. Differential roles of STAT1alpha and STAT1beta in fludarabine-induced cell cycle arrest and apoptosis in human B cells. *Blood*. 104:2475-2483.
- Basso, K., C. Schneider, Q. Shen, A.B. Holmes, M. Setty, C. Leslie, and R. Dalla-Favera. 2012. BCL6 positively regulates AID and germinal center gene expression via repression of miR-155. *J Exp Med*. 209:2455-2465.
- Batten, M., J. Li, S. Yi, N.M. Kljavin, D.M. Danilenko, S. Lucas, J. Lee, F.J. de Sauvage, and N. Ghilardi. 2006. Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. *Nat Immunol*. 7:929-936.
- Battle, T.E., R.A. Lynch, and D.A. Frank. 2006. Signal transducer and activator of transcription 1 activation in endothelial cells is a negative regulator of angiogenesis. *Cancer Res*. 66:3649-3657.
- Begitt, A., M. Droscher, K.P. Knobloch, and U. Vinkemeier. 2011. SUMO conjugation of STAT1 protects cells from hyperresponsiveness to IFNgamma. *Blood*. 118:1002-1007.
- Begitt, A., T. Meyer, M. van Rossum, and U. Vinkemeier. 2000. Nucleocytoplasmic translocation of Stat1 is regulated by a leucine-rich export signal in the coiled-coil domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:10418-10423.
- Bignami, M., M. O'Driscoll, G. Aquilina, and P. Karran. 2000. Unmasking a killer: DNA O(6)-methylguanine and the cytotoxicity of methylating agents. *Mutation research*. 462:71-82.
- Blyussen, H.A., and D.E. Levy. 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.
- Boisson-Dupuis, S., X.F. Kong, S. Okada, S. Cypowyj, A. Puel, L. Abel, and J.L. Casanova. 2012. Inborn errors of human STAT1: allelic heterogeneity governs the diversity of immunological and infectious phenotypes. *Curr Opin Immunol*. 24:364-378.
- Bowman, T., R. Garcia, J. Turkson, and R. Jove. 2000. STATs in oncogenesis. *Oncogene*. 19:2474-2488.
- Bromberg, J. 2002. Stat proteins and oncogenesis. *J Clin Invest*. 109:1139-1142.

- Bromberg, J., and J.E. Darnell, Jr. 2000. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene*. 19:2468-2473.
- Brown, G.C. 2001. Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta*. 1504:46-57.
- Brown, G.C., and V. Borutaite. 2001. Nitric oxide, mitochondria, and cell death. *IUBMB life*. 52:189-195.
- Brune, B. 2003. Nitric oxide: NO apoptosis or turning it ON? *Cell Death Differ*. 10:864-869.
- Burma, S., B.P. Chen, M. Murphy, A. Kurimasa, and D.J. Chen. 2001. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem*. 276:42462-42467.
- Chaggier, A., R.F. Wynn, E. Jouanguy, O. Filipe-Santos, S. Zhang, J. Feinberg, K. Hawkins, J.L. Casanova, and P.D. Arkwright. 2006. Human complete Stat-1 deficiency is associated with defective type I and II IFN responses in vitro but immunity to some low virulence viruses in vivo. *Journal of immunology*. 176:5078-5083.
- Chatterjee-Kishore, M., F. van den Akker, and G.R. Stark. 2000a. Association of STATs with relatives and friends. *Trends Cell Biol*. 10:106-111.
- Chatterjee-Kishore, M., K.L. Wright, J.P. Ting, and G.R. Stark. 2000b. How Stat1 mediates constitutive gene expression: a complex of unphosphorylated Stat1 and IRF1 supports transcription of the LMP2 gene. *EMBO J*. 19:4111-4122.
- Chaudhuri, J., and F.W. Alt. 2004. Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair. *Nat Rev Immunol*. 4:541-552.
- Chaudhuri, J., M. Tian, C. Khuong, K. Chua, E. Pinaud, and F.W. Alt. 2003. Transcription-targeted DNA deamination by the AID antibody diversification enzyme. *Nature*. 422:726-730.
- Chen, F.F., G. Jiang, K. Xu, and J.N. Zheng. 2013. Function and mechanism by which interferon regulatory factor-1 inhibits oncogenesis. *Oncology letters*. 5:417-423.
- Chen, X., U. Vinkemeier, Y. Zhao, D. Jeruzalmi, J.E. Darnell, Jr., and J. Kuriyan. 1998. Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA. *Cell*. 93:827-839.
- Chen, Z., A. Laurence, Y. Kanno, M. Pacher-Zavisin, B.M. Zhu, C. Tato, A. Yoshimura, L. Hennighausen, and J.J. O'Shea. 2006. Selective regulatory function of Socs3 in the formation of IL-17-secreting T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:8137-8142.
- Cheon, H., E.G. Holvey-Bates, J.W. Schoggins, S. Forster, P. Hertzog, N. Imanaka, C.M. Rice, M.W. Jackson, D.J. Junk, and G.R. Stark. 2013. IFNbeta-dependent increases in STAT1, STAT2, and IRF9 mediate resistance to viruses and DNA damage. *EMBO J*. 32:2751-2763.
- Cheon, H., and G.R. Stark. 2009. Unphosphorylated STAT1 prolongs the expression of interferon-induced immune regulatory genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:9373-9378.
- Cheon, H., J. Yang, and G.R. Stark. 2011. The functions of signal transducers and activators of transcriptions 1 and 3 as cytokine-inducible proteins. *J Interferon Cytokine Res*. 31:33-40.
- Chesler, D.A., and C.S. Reiss. 2002. The role of IFN-gamma in immune responses to viral infections of the central nervous system. *Cytokine Growth Factor Rev*. 13:441-454.
- Chin, Y.E., M. Kitagawa, W.C. Su, Z.H. You, Y. Iwamoto, and X.Y. Fu. 1996. Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 WAF1/CIP1 mediated by STAT1. *Science*. 272:719-722.
- Cimmino, L., G.A. Martins, J. Liao, E. Magnusdottir, G. Grunig, R.K. Perez, and K.L. Calame. 2008. Blimp-1 attenuates Th1 differentiation by repression of ifng, tbx21, and bcl6 gene expression. *J Immunol*. 181:2338-2347.
- Cooney, R.N. 2002. Suppressors of cytokine signaling (SOCS): inhibitors of the JAK/STAT pathway. *Shock*. 17:83-90.
- Costa-Pereira, A.P., S. Tininini, B. Strobl, T. Alonzi, J.F. Schlaak, H. Is'harc, I. Gesualdo, S.J. Newman, I.M. Kerr, and V. Poli. 2002. Mutational switch of an IL-6 response to an interferon-gamma-like response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:8043-8047.
- Craig, R.W. 2002. MCL1 provides a window on the role of the BCL2 family in cell proliferation, differentiation and tumorigenesis. *Leukemia*. 16:444-454.
- Darnell, J.E., Jr. 1997. STATs and gene regulation. *Science*. 277:1630-1635.
- Darnell, J.E., Jr., I.M. Kerr, and G.R. Stark. 1994. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*. 264:1415-1421.
- David, M., H.E. Chen, S. Goelz, A.C. Larner, and B.G. Neel. 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.
- De Silva, N.S., G. Simonetti, N. Heise, and U. Klein. 2012. The diverse roles of IRF4 in late germinal center B-cell differentiation. *Immunological reviews*. 247:73-92.
- Deenick, E.K., D.T. Avery, A. Chan, L.J. Berglund, M.L. Ives, L. Moens, J.L. Stoddard, J. Bustamante, S. Boisson-Dupuis, M. Tsumura, M. Kobayashi, P.D. Arkwright, D. Averbuch, D. Engelhard, J. Roesler, J. Peake, M. Wong, S. Adelstein, S. Choo, J.M. Smart, M.A. French, D.A. Fulcher, M.C. Cook, C. Picard, A. Durandy, C.

- Klein, S.M. Holland, G. Uzel, J.L. Casanova, C.S. Ma, and S.G. Tangye. 2013. Naive and memory human B cells have distinct requirements for STAT3 activation to differentiate into antibody-secreting plasma cells. *J Exp Med*.
- Diehl, S.A., H. Schmidlin, M. Nagasawa, S.D. van Haren, M.J. Kwakkenbos, E. Yasuda, T. Beaumont, F.A. Scheeren, and H. Spits. 2008. STAT3-mediated up-regulation of BLIMP1 is coordinated with BCL6 down-regulation to control human plasma cell differentiation. *J Immunol*. 180:4805-4815.
- Dimberg, A., I. Karlberg, K. Nilsson, and F. Oberg. 2003. Ser727/Tyr701-phosphorylated Stat1 is required for the regulation of c-Myc, cyclins, and p27Kip1 associated with ATRA-induced G0/G1 arrest of U-937 cells. *Blood*. 102:254-261.
- Dimco, G., R.A. Knight, D.S. Latchman, and A. Stephanou. 2010. STAT1 interacts directly with cyclin D1/Cdk4 and mediates cell cycle arrest. *Cell Cycle*. 9:4638-4649.
- Dimmeler, S., and A.M. Zeiher. 1997. Nitric oxide and apoptosis: another paradigm for the double-edged role of nitric oxide. *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society*. 1:275-281.
- Dominici, S., G.F. Schiavano, M. Magnani, C. Buondelmonte, A.G. Celeste, and G. Brandi. 2012. Involvement of Stat1 in the phagocytosis of *M. avium*. *Clinical & developmental immunology*. 2012:652683.
- Dupuis, S., E. Jouanguy, S. Al-Hajjar, C. Fieschi, I.Z. Al-Mohsen, S. Al-Jumaah, K. Yang, A. Chappier, C. Eidenschenk, P. Eid, A. Al Ghonaium, H. Tufenkeji, H. Frayha, S. Al-Gazlan, H. Al-Rayes, R.D. Schreiber, I. Gresser, and J.L. Casanova. 2003. Impaired response to interferon-alpha/beta and lethal viral disease in human STAT1 deficiency. *Nature genetics*. 33:388-391.
- Durbin, J.E., R. Hackenmiller, M.C. Simon, and D.E. Levy. 1996. Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. *Cell*. 84:443-450.
- Efimova, E.V., H. Liang, S.P. Pitroda, E. Labay, T.E. Darga, V. Levina, A. Lokshin, B. Roizman, R.R. Weichselbaum, and N.N. Khodarev. 2009. Radioresistance of Stat1 over-expressing tumour cells is associated with suppressed apoptotic response to cytotoxic agents and increased IL6-IL8 signalling. *International journal of radiation biology*. 85:421-431.
- Epperson, D.E., D. Arnold, T. Spies, P. Cresswell, J.S. Pober, and D.R. Johnson. 1992. Cytokines increase transporter in antigen processing-1 expression more rapidly than HLA class I expression in endothelial cells. *J Immunol*. 149:3297-3301.
- Fujio, Y., K. Kunisada, H. Hirota, K. Yamauchi-Takahara, and T. Kishimoto. 1997. Signals through gp130 upregulate bcl-x gene expression via STAT1-binding cis-element in cardiac myocytes. *J Clin Invest*. 99:2898-2905.
- Fulda, S., and K.M. Debatin. 2002. IFNgamma sensitizes for apoptosis by upregulating caspase-8 expression through the Stat1 pathway. *Oncogene*. 21:2295-2308.
- Garcia, M.A., J. Gil, I. Ventoso, S. Guerra, E. Domingo, C. Rivas, and M. Esteban. 2006. Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. 70:1032-1060.
- Gartel, A.L., X. Ye, E. Goufman, P. Shianov, N. Hay, F. Najmabadi, and A.L. Tyner. 2001. Myc represses the p21(WAF1/CIP1) promoter and interacts with Sp1/Sp3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:4510-4515.
- Ginter, T., C. Bier, S.K. Knauer, K. Sughra, D. Hildebrand, T. Munz, T. Liebe, R. Heller, A. Henke, R.H. Stauber, W. Reichardt, J.A. Schmid, K.F. Kubatzky, T. Heinzel, and O.H. Kramer. 2012. Histone deacetylase inhibitors block IFNgamma-induced STAT1 phosphorylation. *Cell Signal*. 24:1453-1460.
- Gires, O., F. Kohlhuber, E. Kilger, M. Baumann, A. Kieser, C. Kaiser, R. Zeidler, B. Scheffer, M. Ueffing, and W. Hammerschmidt. 1999. Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins. *EMBO J*. 18:3064-3073.
- Goodbourn, S., L. Didcock, and R.E. Randall. 2000. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *J Gen Virol*. 81:2341-2364.
- Gough, D.J., D.E. Levy, R.W. Johnstone, and C.J. Clarke. 2008. IFNgamma signaling-does it mean JAK-STAT? *Cytokine Growth Factor Rev*. 19:383-394.
- Gouilleux-Gruart, V., F. Gouilleux, C. Desaint, J.F. Claisse, J.C. Capiod, J. Delobel, R. Weber-Nordt, I. Dusanter-Fourt, F. Dreyfus, B. Groner, and L. Prin. 1996. STAT-related transcription factors are constitutively activated in peripheral blood cells from acute leukemia patients. *Blood*. 87:1692-1697.
- Grigera, F., A. Bellacosa, and A.L. Kenter. 2013. Complex relationship between mismatch repair proteins and MBD4 during immunoglobulin class switch recombination. *PLoS One*. 8:e78370.
- Gutzeit, C., N. Nagy, M. Gentile, K. Lyberg, J. Gumz, H. Vallhov, I. Puga, E. Klein, S. Gabriellsson, A. Cerutti, and A. Scheynius. 2014. Exosomes Derived from Burkitt's Lymphoma Cell Lines Induce Proliferation, Differentiation, and Class-Switch Recombination in B Cells. *J Immunol*.
- Haque, S.J., and B.R. Williams. 1994. Identification and characterization of an interferon (IFN)-stimulated response element-IFN-stimulated gene factor 3-independent signaling pathway for IFN-alpha. *J Biol Chem*. 269:19523-19529.

- Hatzivassiliou, E., and G. Mosialos. 2002. Cellular signaling pathways engaged by the Epstein-Barr virus transforming protein LMP1. *Front Biosci.* 7:d319-329.
- Haupt, Y., R. Maya, A. Kazaz, and M. Oren. 1997. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature.* 387:296-299.
- He, B., N. Raab-Traub, P. Casali, and A. Cerutti. 2003. EBV-encoded latent membrane protein 1 cooperates with BAFF/BLyS and APRIL to induce T cell-independent Ig heavy chain class switching. *J Immunol.* 171:5215-5224.
- Heckman, C.A., J.W. Mehew, G.G. Ying, M. Introna, J. Golay, and L.M. Boxer. 2000. A-Myb up-regulates Bcl-2 through a Cdx binding site in t(14;18) lymphoma cells. *J Biol Chem.* 275:6499-6508.
- Helleday, T., E. Petermann, C. Lundin, B. Hodgson, and R.A. Sharma. 2008. DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nature reviews. Cancer.* 8:193-204.
- Hiroi, M., and Y. Ohmori. 2003. The transcriptional coactivator CREB-binding protein cooperates with STAT1 and NF-kappa B for synergistic transcriptional activation of the CXC ligand 9/monokine induced by interferon-gamma gene. *J Biol Chem.* 278:651-660.
- Horvath, C.M. 2000. STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals. *Trends Biochem Sci.* 25:496-502.
- Horvath, C.M., Z. Wen, and J.E. Darnell, Jr. 1995. A STAT protein domain that determines DNA sequence recognition suggests a novel DNA-binding domain. *Genes Dev.* 9:984-994.
- Hu, X., and L.B. Ivashkiv. 2009. Cross-regulation of signaling pathways by interferon-gamma: implications for immune responses and autoimmune diseases. *Immunity.* 31:539-550.
- Huang, S., C.D. Bucana, M. Van Arsdall, and I.J. Fidler. 2002. Stat1 negatively regulates angiogenesis, tumorigenicity and metastasis of tumor cells. *Oncogene.* 21:2504-2512.
- Huang, Y.Q., J.J. Li, and S. Karparkin. 2000. Thrombin inhibits tumor cell growth in association with up-regulation of p21(waf/cip1) and caspases via a p53-independent, STAT-1-dependent pathway. *J Biol Chem.* 275:6462-6468.
- Icardi, L., K. De Bosscher, and J. Tavernier. 2012. The HAT/HDAC interplay: multilevel control of STAT signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 23:283-291.
- Ikushima, H., H. Negishi, and T. Taniguchi. 2013. The IRF Family Transcription Factors at the Interface of Innate and Adaptive Immune Responses. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*
- Jiricny, J. 1998. Eukaryotic mismatch repair: an update. *Mutation research.* 409:107-121.
- John-Aryankalayil, M., S.T. Palayoor, D. Cerna, C.B. Simone, 2nd, M.T. Falduto, S.R. Magnuson, and C.N. Coleman. 2010. Fractionated radiation therapy can induce a molecular profile for therapeutic targeting. *Radiation research.* 174:446-458.
- Kamijo, R., H. Harada, T. Matsuyama, M. Bosland, J. Gerecitano, D. Shapiro, J. Le, S.I. Koh, T. Kimura, S.J. Green, and et al. 1994. Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages. *Science.* 263:1612-1615.
- Kaplan, D.H., V. Shankaran, A.S. Dighe, E. Stockert, M. Aguet, L.J. Old, and R.D. Schreiber. 1998. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:7556-7561.
- Karran, P. 2001. Mechanisms of tolerance to DNA damaging therapeutic drugs. *Carcinogenesis.* 22:1931-1937.
- Khine, A.A., and C.A. Lingwood. 2000. Functional significance of globotriaosyl ceramide in interferon-alpha(2)/type 1 interferon receptor-mediated antiviral activity. *Journal of cellular physiology.* 182:97-108.
- Khodarev, N.N., A.J. Minn, E.V. Efimova, T.E. Darga, E. Labay, M. Beckett, H.J. Mauceri, B. Roizman, and R.R. Weichselbaum. 2007. Signal transducer and activator of transcription 1 regulates both cytotoxic and prosurvival functions in tumor cells. *Cancer Res.* 67:9214-9220.
- Khodarev, N.N., P. Roach, S.P. Pitroda, D.W. Golden, M. Bhayani, M.Y. Shao, T.E. Darga, M.G. Beveridge, R.F. Sood, H.G. Sutton, M.A. Beckett, H.J. Mauceri, M.C. Posner, and R.R. Weichselbaum. 2009. STAT1 pathway mediates amplification of metastatic potential and resistance to therapy. *PLoS One.* 4:e5821.
- Khodarev, N.N., B. Roizman, and R.R. Weichselbaum. 2012. Molecular pathways: interferon/stat1 pathway: role in the tumor resistance to genotoxic stress and aggressive growth. *Clin Cancer Res.* 18:3015-3021.
- Kim, H.S., and M.S. Lee. 2007. STAT1 as a key modulator of cell death. *Cell Signal.* 19:454-465.
- Kim, T.K., and T. Maniatis. 1996. Regulation of interferon-gamma-activated STAT1 by the ubiquitin-proteasome pathway. *Science.* 273:1717-1719.
- King, P., and S. Goodbourn. 1998. STAT1 is inactivated by a caspase. *J Biol Chem.* 273:8699-8704.
- Kitao, H., and Z.M. Yuan. 2002. Regulation of ionizing radiation-induced Rad52 nuclear foci formation by c-Abl-mediated phosphorylation. *J Biol Chem.* 277:48944-48948.
- Kiu, H., and S.E. Nicholson. 2012. Biology and significance of the JAK/STAT signalling pathways. *Growth Factors.* 30:88-106.

- Klein, U., and R. Dalla-Favera. 2008. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol.* 8:22-33.
- Koromilas, A.E., and V. Sexl. 2013. The tumor suppressor function of STAT1 in breast cancer. *JAKSTAT.* 2:e23353.
- Kramer, O.H., D. Baus, S.K. Knauer, S. Stein, E. Jager, R.H. Stauber, M. Grez, E. Pfitzner, and T. Heinzel. 2006. Acetylation of Stat1 modulates NF-kappaB activity. *Genes Dev.* 20:473-485.
- Kramer, O.H., S.K. Knauer, G. Greiner, E. Jandt, S. Reichardt, K.H. Guhrs, R.H. Stauber, F.D. Bohmer, and T. Heinzel. 2009. A phosphorylation-acetylation switch regulates STAT1 signaling. *Genes Dev.* 23:223-235.
- Krishnan, K., H. Yan, J.T. Lim, and J.J. Krolewski. 1996. Dimerization of a chimeric CD4-interferon-alpha receptor reconstitutes the signaling events preceding STAT phosphorylation. *Oncogene.* 13:125-133.
- Kumar, A., M. Commane, T.W. Flickinger, C.M. Horvath, and G.R. Stark. 1997. Defective TNF-alpha-induced apoptosis in STAT1-null cells due to low constitutive levels of caspases. *Science.* 278:1630-1632.
- Kwon, H., D. Thierry-Mieg, J. Thierry-Mieg, H.P. Kim, J. Oh, C. Tunyaplin, S. Carotta, C.E. Donovan, M.L. Goldman, P. Taylor, K. Ozato, D.E. Levy, S.L. Nutt, K. Calame, and W.J. Leonard. 2009. Analysis of interleukin-21-induced Prdm1 gene regulation reveals functional cooperation of STAT3 and IRF4 transcription factors. *Immunity.* 31:941-952.
- Lazarevic, V., X. Chen, J.H. Shim, E.S. Hwang, E. Jang, A.N. Bolm, M. Oukka, V.K. Kuchroo, and L.H. Glimcher. 2011. T-bet represses T(H)17 differentiation by preventing Runx1-mediated activation of the gene encoding RORgammat. *Nat Immunol.* 12:96-104.
- LeBien, T.W., and T.F. Tedder. 2008. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood.* 112:1570-1580.
- Lee, C.H., M. Melchers, H. Wang, T.A. Torrey, R. Slota, C.F. Qi, J.Y. Kim, P. Lugar, H.J. Kong, L. Farrington, B. van der Zouwen, J.X. Zhou, V. Lougaris, P.E. Lipsky, A.C. Grammer, and H.C. Morse, 3rd. 2006. Regulation of the germinal center gene program by interferon (IFN) regulatory factor 8/IFN consensus sequence-binding protein. *J Exp Med.* 203:63-72.
- Lee, C.K., E. Smith, R. Gimeno, R. Gertner, and D.E. Levy. 2000. STAT1 affects lymphocyte survival and proliferation partially independent of its role downstream of IFN-gamma. *J Immunol.* 164:1286-1292.
- Leonard, W.J., and J.J. O'Shea. 1998. Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol.* 16:293-322.
- Lesinski, G.B., M. Anghelina, J. Zimmerer, T. Bakalakos, B. Badgwell, R. Parihar, Y. Hu, B. Becknell, G. Abood, A.R. Chaudhury, C. Magro, J. Durbin, and W.E. Carson, 3rd. 2003. The antitumor effects of IFN-alpha are abrogated in a STAT1-deficient mouse. *J Clin Invest.* 112:170-180.
- Levy, D.E., and J.E. Darnell, Jr. 2002. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3:651-662.
- Li, G.M. 2008. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res.* 18:85-98.
- Liao, J., Y. Fu, and K. Shuai. 2000. Distinct roles of the NH2- and COOH-terminal domains of the protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 (PIAS1) in cytokine-induced PIAS1-Stat1 interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:5267-5272.
- Lim, C.P., and X. Cao. 2006. Structure, function, and regulation of STAT proteins. *Mol Biosyst.* 2:536-550.
- Lim, S., and P. Kaldis. 2013. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development.* 140:3079-3093.
- Lin, K.I., C. Angelin-Duclos, T.C. Kuo, and K. Calame. 2002. Blimp-1-dependent repression of Pax-5 is required for differentiation of B cells to immunoglobulin M-secreting plasma cells. *Mol Cell Biol.* 22:4771-4780.
- Ling, N.R., D. Hardie, J. Lowe, G.D. Johnson, M. Khan, and I.C. MacLennan. 1989. A phenotypic study of cells from Burkitt lymphoma and EBV-B-lymphoblastoid lines and their relationship to cells in normal lymphoid tissues. *Int J Cancer.* 43:112-118.
- Ling, N.R., and J.A. Lowe. 1989. Changes in the phenotype and immunoglobulin secretion of human B cells following co-culture with cells of an EBV+ lymphoblastoid line or fusion with mouse plasmacytoma cells. *Studies in short-term and long-term culture. Clinical and experimental immunology.* 75:311-316.
- Liu, B., J. Liao, X. Rao, S.A. Kushner, C.D. Chung, D.D. Chang, and K. Shuai. 1998. Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:10626-10631.
- Lohoff, M., and T.W. Mak. 2005. Roles of interferon-regulatory factors in T-helper-cell differentiation. *Nat Rev Immunol.* 5:125-135.
- Macatonia, S.E., N.A. Hosken, M. Litton, P. Vieira, C.S. Hsieh, J.A. Culpepper, M. Wysocka, G. Trinchieri, K.M. Murphy, and A. O'Garra. 1995. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol.* 154:5071-5079.
- Mao, X., Z. Ren, G.N. Parker, H. Sondermann, M.A. Pastorello, W. Wang, J.S. McMurray, B. Demeler, J.E. Darnell, Jr., and X. Chen. 2005. Structural bases of unphosphorylated STAT1 association and receptor binding. *Mol Cell.* 17:761-771.
- Marg, A., Y. Shan, T. Meyer, T. Meissner, M. Brandenburg, and U. Vinkemeier. 2004. Nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins Nup153 and Nup214 and CRM1-dependent nuclear export control the subcellular distribution of latent Stat1. *The Journal of cell biology.* 165:823-833.



- McBride, K.M., C. McDonald, and N.C. Reich. 2000. Nuclear export signal located within the DNA-binding domain of the STAT1 transcription factor. *EMBO J.* 19:6196-6206.
- McBride, K.M., and N.C. Reich. 2003. The ins and outs of STAT1 nuclear transport. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment.* 2003:RE13.
- Meraz, M.A., J.M. White, K.C. Sheehan, E.A. Bach, S.J. Rodig, A.S. Dighe, D.H. Kaplan, J.K. Riley, A.C. Greenlund, D. Campbell, K. Carver-Moore, R.N. DuBois, R. Clark, M. Aguet, and R.D. Schreiber. 1996. Targeted disruption of the *Stat1* gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell.* 84:431-442.
- Mertens, C., M. Zhong, R. Krishnaraj, W. Zou, X. Chen, and J.E. Darnell, Jr. 2006. Dephosphorylation of phosphotyrosine on STAT1 dimers requires extensive spatial reorientation of the monomers facilitated by the N-terminal domain. *Genes Dev.* 20:3372-3381.
- Meyer, T., L. Hendry, A. Begitt, S. John, and U. Vinkemeier. 2004. A single residue modulates tyrosine dephosphorylation, oligomerization, and nuclear accumulation of stat transcription factors. *J Biol Chem.* 279:18998-19007.
- Meyer, T., A. Marg, P. Lemke, B. Wiesner, and U. Vinkemeier. 2003. DNA binding controls inactivation and nuclear accumulation of the transcription factor *Stat1*. *Genes Dev.* 17:1992-2005.
- Mowen, K.A., J. Tang, W. Zhu, B.T. Schurter, K. Shuai, H.R. Herschman, and M. David. 2001. Arginine methylation of STAT1 modulates IFN $\alpha$ / $\beta$ -induced transcription. *Cell.* 104:731-741.
- Muhlethaler-Mottet, A., W. Di Berardino, L.A. Otten, and B. Mach. 1998. Activation of the MHC class II transactivator CIITA by interferon-gamma requires cooperative interaction between *Stat1* and *USF-1*. *Immunity.* 8:157-166.
- Myers, M.P., J.N. Andersen, A. Cheng, M.L. Tremblay, C.M. Horvath, J.P. Parisien, A. Salmeen, D. Barford, and N.K. Tonks. 2001. TYK2 and JAK2 are substrates of protein-tyrosine phosphatase 1B. *J Biol Chem.* 276:47771-47774.
- Nagata, S. 1997. Apoptosis by death factor. *Cell.* 88:355-365.
- Najjar, I., F. Baran-Marszak, C. Le Clorenec, C. Laguillier, O. Schischmanoff, I. Youlyouz-Marfak, M. Schlee, G.W. Bornkamm, M. Raphael, J. Feuillard, and R. Fagard. 2005. Latent membrane protein 1 regulates STAT1 through NF-kappaB-dependent interferon secretion in Epstein-Barr virus-immortalized B cells. *J Virol.* 79:4936-4943.
- Najjar, I., P.A. Deglesne, P.O. Schischmanoff, E.E. Fabre, S. Boisson-Dupuis, F. Nimmerjahn, G.W. Bornkamm, I. Dusanter-Fourt, and R. Fagard. 2010. STAT1-dependent IgG cell-surface expression in a human B cell line derived from a STAT1-deficient patient. *J Leukoc Biol.* 87:1145-1152.
- Najjar, I., and R. Fagard. 2010. STAT1 and pathogens, not a friendly relationship. *Biochimie.* 92:425-444.
- Nepomuceno, R.R., A.L. Snow, P. Robert Beatty, S.M. Krams, and O.M. Martinez. 2002. Constitutive activation of Jak/STAT proteins in Epstein-Barr virus-infected B-cell lines from patients with posttransplant lymphoproliferative disorder. *Transplantation.* 74:396-402.
- Nguyen, H.V., E. Mouly, K. Chemin, R. Luinaud, R. Despres, J.P. Fermand, B. Arnulf, and J.C. Bories. 2012. The *Ets-1* transcription factor is required for *Stat1*-mediated T-bet expression and IgG2a class switching in mouse B cells. *Blood.* 119:4174-4181.
- Ning, Y., R.B. Riggins, J.E. Mulla, H. Chung, A. Zwart, and R. Clarke. 2010. IFN $\gamma$  restores breast cancer sensitivity to fulvestrant by regulating STAT1, IFN regulatory factor 1, NF-kappaB, BCL2 family members, and signaling to caspase-dependent apoptosis. *Molecular cancer therapeutics.* 9:1274-1285.
- Nutt, S.L., N. Taubenheim, J. Hasbold, L.M. Corcoran, and P.D. Hodgkin. 2011. The genetic network controlling plasma cell differentiation. *Semin Immunol.* 23:341-349.
- Ossina, N.K., A. Cannas, V.C. Powers, P.A. Fitzpatrick, J.D. Knight, J.R. Gilbert, E.M. Shekhtman, L.D. Tomei, S.R. Umansky, and M.C. Kiefer. 1997. Interferon-gamma modulates a p53-independent apoptotic pathway and apoptosis-related gene expression. *J Biol Chem.* 272:16351-16357.
- Peterson, M.L. 2007. Mechanisms controlling production of membrane and secreted immunoglobulin during B cell development. *Immunol Res.* 37:33-46.
- Phillips, C., N. Pachikara, and S.I. Gunderson. 2004. U1A inhibits cleavage at the immunoglobulin M heavy-chain secretory poly(A) site by binding between the two downstream GU-rich regions. *Mol Cell Biol.* 24:6162-6171.
- Pieper, K., B. Grimbacher, and H. Eibel. 2013. B-cell biology and development. *J Allergy Clin Immunol.* 131:959-971.
- Pulit-Penalzoza, J.A., S.V. Scherbik, and M.A. Brinton. 2012. Activation of *Oas1a* gene expression by type I IFN requires both STAT1 and STAT2 while only STAT2 is required for *Oas1b* activation. *Virology.* 425:71-81.
- Qing, Y., and G.R. Stark. 2004. Alternative activation of STAT1 and STAT3 in response to interferon-gamma. *J Biol Chem.* 279:41679-41685.
- Ramana, C.V., M. Chatterjee-Kishore, H. Nguyen, and G.R. Stark. 2000. Complex roles of *Stat1* in regulating gene expression. *Oncogene.* 19:2619-2627.

- Rastelli, J., C. Homig-Holzel, J. Seagal, W. Muller, A.C. Hermann, K. Rajewsky, and U. Zimmer-Strobl. 2008. LMP1 signaling can replace CD40 signaling in B cells in vivo and has unique features of inducing class-switch recombination to IgG1. *Blood*. 111:1448-1455.
- Refaeli, Y., L. Van Parijs, S.I. Alexander, and A.K. Abbas. 2002. Interferon gamma is required for activation-induced death of T lymphocytes. *J Exp Med*. 196:999-1005.
- Regis, G., S. Pensa, D. Boselli, F. Novelli, and V. Poli. 2008. Ups and downs: the STAT1:STAT3 seesaw of Interferon and gp130 receptor signalling. *Semin Cell Dev Biol*. 19:351-359.
- Reimold, A.M., P.D. Ponath, Y.S. Li, R.R. Hardy, C.S. David, J.L. Strominger, and L.H. Glimcher. 1996. Transcription factor B cell lineage-specific activator protein regulates the gene for human X-box binding protein 1. *J Exp Med*. 183:393-401.
- Richards, S.A., K.L. Carey, and I.G. Macara. 1997. Requirement of guanosine triphosphate-bound ran for signal-mediated nuclear protein export. *Science*. 276:1842-1844.
- Rickardson, L., M. Fryknas, S. Dhar, H. Lovborg, J. Gullbo, M. Rydaker, P. Nygren, M.G. Gustafsson, R. Larsson, and A. Isaksson. 2005. Identification of molecular mechanisms for cellular drug resistance by combining drug activity and gene expression profiles. *Br J Cancer*. 93:483-492.
- Roberts, D., J. Schick, S. Conway, S. Biade, P.B. Laub, J.P. Stevenson, T.C. Hamilton, P.J. O'Dwyer, and S.W. Johnson. 2005. Identification of genes associated with platinum drug sensitivity and resistance in human ovarian cancer cells. *Br J Cancer*. 92:1149-1158.
- Rogatsky, I., U. Chandrasekaran, M. Manni, W. Yi, and A.B. Pernis. 2014. Epigenetics and the IRFs: A complex interplay in the control of immunity and autoimmunity. *Autoimmunity*. 47:242-255.
- Rogers, R.S., C.M. Horvath, and M.J. Matunis. 2003. SUMO modification of STAT1 and its role in PIAS-mediated inhibition of gene activation. *J Biol Chem*. 278:30091-30097.
- Rundhaug, J.E. 2005. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *Journal of cellular and molecular medicine*. 9:267-285.
- Sachsenmaier, C., H.B. Sadowski, and J.A. Cooper. 1999. STAT activation by the PDGF receptor requires juxtamembrane phosphorylation sites but not Src tyrosine kinase activation. *Oncogene*. 18:3583-3592.
- Sadler, A.J., and B.R. Williams. 2008. Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat Rev Immunol*. 8:559-568.
- Saha, B., S. Jyothi Prasanna, B. Chandrasekar, and D. Nandi. 2010. Gene modulation and immunoregulatory roles of interferon gamma. *Cytokine*. 50:1-14.
- Sancar, A., L.A. Lindsey-Boltz, K. Unsal-Kacmaz, and S. Linn. 2004. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual review of biochemistry*. 73:39-85.
- Saribasak, H., and P.J. Gearhart. 2012. Does DNA repair occur during somatic hypermutation? *Semin Immunol*. 24:287-292.
- Satoh, J., and H. Tabunoki. 2013. A Comprehensive Profile of ChIP-Seq-Based STAT1 Target Genes Suggests the Complexity of STAT1-Mediated Gene Regulatory Mechanisms. *Gene regulation and systems biology*. 7:41-56.
- Scheeren, F.A., M. Naspetti, S. Diehl, R. Schotte, M. Nagasawa, E. Wijnands, R. Gimeno, F.A. Vyth-Dreese, B. Blom, and H. Spits. 2005. STAT5 regulates the self-renewal capacity and differentiation of human memory B cells and controls Bcl-6 expression. *Nat Immunol*. 6:303-313.
- Schiavone, D., L. Avalle, S. Dewilde, and V. Poli. 2011. The immediate early genes Fos and Egr1 become STAT1 transcriptional targets in the absence of STAT3. *FEBS Lett*. 585:2455-2460.
- Schindler, C., X.Y. Fu, T. Improta, R. Aebersold, and J.E. Darnell, Jr. 1992. Proteins of transcription factor ISGF-3: one gene encodes the 91- and 84-kDa ISGF-3 proteins that are activated by interferon alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89:7836-7839.
- Schlee, M., M. Holzel, S. Bernard, R. Mailhammer, M. Schuhmacher, J. Reschke, D. Eick, D. Marinkovic, T. Wirth, A. Rosenwald, L.M. Staudt, M. Eilers, F. Baran-Marszak, R. Fagard, J. Feuillard, G. Laux, and G.W. Bornkamm. 2007. C-myc activation impairs the NF-kappaB and the interferon response: implications for the pathogenesis of Burkitt's lymphoma. *Int J Cancer*. 120:1387-1395.
- Schneiderhan, N., A. Budde, Y. Zhang, and B. Brune. 2003. Nitric oxide induces phosphorylation of p53 and impairs nuclear export. *Oncogene*. 22:2857-2868.
- Schofield, M.J., and P. Hsieh. 2003. DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function. *Annual review of microbiology*. 57:579-608.
- Schrader, C.E., J. Vardo, and J. Stavnezer. 2002. Role for mismatch repair proteins Msh2, Mlh1, and Pms2 in immunoglobulin class switching shown by sequence analysis of recombination junctions. *J Exp Med*. 195:367-373.
- Schroder, K., P.J. Hertzog, T. Ravasi, and D.A. Hume. 2004. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*. 75:163-189.
- Schroeder, H.W., Jr., and L. Cavacini. 2010. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol*. 125:S41-52.
- Sehgal, P.B. 2008. Paradigm shifts in the cell biology of STAT signaling. *Semin Cell Dev Biol*. 19:329-340.

- Seidel, H.M., L.H. Milocco, P. Lamb, J.E. Darnell, Jr., R.B. Stein, and J. Rosen. 1995. Spacing of palindromic half sites as a determinant of selective STAT (signal transducers and activators of transcription) DNA binding and transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:3041-3045.
- Sekimoto, T., K. Nakajima, T. Tachibana, T. Hirano, and Y. Yoneda. 1996. Interferon-gamma-dependent nuclear import of Stat1 is mediated by the GTPase activity of Ran/TC4. *J Biol Chem.* 271:31017-31020.
- Semper, C., N.R. Leitner, C. Lassnig, M. Parrini, T. Mahlakoiv, M. Rammerstorfer, K. Lorenz, D. Rigler, S. Muller, T. Kolbe, C. Vogl, T. Rulicke, P. Staeheli, T. Decker, M. Muller, and B. Strobl. 2014. STAT1beta is not dominant negative and is capable of contributing to IFNgamma-dependent innate immunity. *Mol Cell Biol.*
- Shimizu, H., M. Popova, F. Fleury, M. Kobayashi, N. Hayashi, I. Sakane, H. Kurumizaka, A.R. Venkitaraman, M. Takahashi, and K. Yamamoto. 2009. c-ABL tyrosine kinase stabilizes RAD51 chromatin association. *Biochem Biophys Res Commun.* 382:286-291.
- Shinkura, R., M. Tian, M. Smith, K. Chua, Y. Fujiwara, and F.W. Alt. 2003. The influence of transcriptional orientation on endogenous switch region function. *Nat Immunol.* 4:435-441.
- Shuai, K., J. Liao, and M.M. Song. 1996. Enhancement of antiproliferative activity of gamma interferon by the specific inhibition of tyrosine dephosphorylation of Stat1. *Mol Cell Biol.* 16:4932-4941.
- Siemer, D., J. Kurth, S. Lang, G. Lehnerdt, J. Stanelle, and R. Kuppers. 2008. EBV transformation overrides gene expression patterns of B cell differentiation stages. *Mol Immunol.* 45:3133-3141.
- Sironi, J.J., and T. Ouchi. 2004. STAT1-induced apoptosis is mediated by caspases 2, 3, and 7. *J Biol Chem.* 279:4066-4074.
- Song, L., S. Bhattacharya, A.A. Yunus, C.D. Lima, and C. Schindler. 2006. Stat1 and SUMO modification. *Blood.* 108:3237-3244.
- Stark, G.R., and J.E. Darnell, Jr. 2012. The JAK-STAT pathway at twenty. *Immunity.* 36:503-514.
- Stark, G.R., I.M. Kerr, B.R. Williams, R.H. Silverman, and R.D. Schreiber. 1998. How cells respond to interferons. *Annual review of biochemistry.* 67:227-264.
- Stephanou, A., B.K. Brar, T.M. Scarabelli, A.K. Jonassen, D.M. Yellon, M.S. Marber, R.A. Knight, and D.S. Latchman. 2000. Ischemia-induced STAT-1 expression and activation play a critical role in cardiomyocyte apoptosis. *J Biol Chem.* 275:10002-10008.
- Stevenson, N.J., A.G. Murphy, N.M. Bourke, C.A. Keogh, J.E. Hegarty, and C. O'Farrelly. 2011. Ribavirin enhances IFN-alpha signalling and MxA expression: a novel immune modulation mechanism during treatment of HCV. *PLoS One.* 6:e27866.
- Stojic, L., R. Brun, and J. Jiricny. 2004. Mismatch repair and DNA damage signalling. *DNA repair.* 3:1091-1101.
- Suk, K., S. Kim, Y.H. Kim, K.A. Kim, I. Chang, H. Yagita, M. Shong, and M.S. Lee. 2001. IFN-gamma/TNF-alpha synergism as the final effector in autoimmune diabetes: a key role for STAT1/IFN regulatory factor-1 pathway in pancreatic beta cell death. *J Immunol.* 166:4481-4489.
- Tanaka, T., M.A. Soriano, and M.J. Grusby. 2005. SLIM is a nuclear ubiquitin E3 ligase that negatively regulates STAT signaling. *Immunity.* 22:729-736.
- ten Hoeve, J., M. de Jesus Ibarra-Sanchez, Y. Fu, W. Zhu, M. Tremblay, M. David, and K. Shuai. 2002. Identification of a nuclear Stat1 protein tyrosine phosphatase. *Mol Cell Biol.* 22:5662-5668.
- Thomas, M., C.E. Finnegan, K.M. Rogers, J.W. Purcell, A. Trimble, P.G. Johnston, and M.P. Boland. 2004. STAT1: a modulator of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* 64:8357-8364.
- Tobon, G.J., J.H. Izquierdo, and C.A. Canas. 2013. B Lymphocytes: Development, Tolerance, and Their Role in Autoimmunity-Focus on Systemic Lupus Erythematosus. *Autoimmune Dis.* 2013:827254.
- Townsend, P.A., M.S. Cragg, S.M. Davidson, J. McCormick, S. Barry, K.M. Lawrence, R.A. Knight, M. Hubank, P.L. Chen, D.S. Latchman, and A. Stephanou. 2005. STAT-1 facilitates the ATM activated checkpoint pathway following DNA damage. *J Cell Sci.* 118:1629-1639.
- Townsend, P.A., T.M. Scarabelli, S.M. Davidson, R.A. Knight, D.S. Latchman, and A. Stephanou. 2004. STAT-1 interacts with p53 to enhance DNA damage-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 279:5811-5820.
- Tsai, M.H., J.A. Cook, G.V. Chandramouli, W. DeGraff, H. Yan, S. Zhao, C.N. Coleman, J.B. Mitchell, and E.Y. Chuang. 2007. Gene expression profiling of breast, prostate, and glioma cells following single versus fractionated doses of radiation. *Cancer Res.* 67:3845-3852.
- Tunyaplin, C., A.L. Shaffer, C.D. Angelin-Duclos, X. Yu, L.M. Staudt, and K.L. Calame. 2004. Direct repression of prdm1 by Bcl-6 inhibits plasmacytic differentiation. *J Immunol.* 173:1158-1165.
- Ungureanu, D., and O. Silvennoinen. 2005. SLIM trims STATs: ubiquitin E3 ligases provide insights for specificity in the regulation of cytokine signaling. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment.* 2005:pe49.
- Ungureanu, D., S. Vanhatupa, N. Kotaja, J. Yang, S. Aittomaki, O.A. Janne, J.J. Palvimo, and O. Silvennoinen. 2003. PIAS proteins promote SUMO-1 conjugation to STAT1. *Blood.* 102:3311-3313.

- Unlu, S., A. Kumar, W.R. Waterman, J. Tsukada, K.Z. Wang, D.L. Galson, and P.E. Auron. 2007. Phosphorylation of IRF8 in a pre-associated complex with Spi-1/PU.1 and non-phosphorylated Stat1 is critical for LPS induction of the IL1B gene. *Mol Immunol.* 44:3364-3379.
- Venkataraman, C., S. Leung, A. Salvekar, H. Mano, and U. Schindler. 1999. Repression of IL-4-induced gene expression by IFN-gamma requires Stat1 activation. *J Immunol.* 162:4053-4061.
- Villarino, A.V., E. Gallo, and A.K. Abbas. 2010. STAT1-activating cytokines limit Th17 responses through both T-bet-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol.* 185:6461-6471.
- Wagner, M.W., L.S. Li, J.C. Morales, C.L. Galindo, H.R. Garner, W.G. Bornmann, and D.A. Boothman. 2008. Role of c-Abl kinase in DNA mismatch repair-dependent G2 cell cycle checkpoint arrest responses. *J Biol Chem.* 283:21382-21393.
- Wang, Y., T.R. Wu, S. Cai, T. Welte, and Y.E. Chin. 2000. Stat1 as a component of tumor necrosis factor alpha receptor 1-TRADD signaling complex to inhibit NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol.* 20:4505-4512.
- Weber-Nordt, R.M., C. Egen, J. Wehinger, W. Ludwig, V. Gouilleux-Gruart, R. Mertelsmann, and J. Finke. 1996. Constitutive activation of STAT proteins in primary lymphoid and myeloid leukemia cells and in Epstein-Barr virus (EBV)-related lymphoma cell lines. *Blood.* 88:809-816.
- Weichselbaum, R.R., H. Ishwaran, T. Yoon, D.S. Nuyten, S.W. Baker, N. Khodarev, A.W. Su, A.Y. Shaikh, P. Roach, B. Kreike, B. Roizman, J. Bergh, Y. Pawitan, M.J. van de Vijver, and A.J. Minn. 2008. An interferon-related gene signature for DNA damage resistance is a predictive marker for chemotherapy and radiation for breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:18490-18495.
- Wenta, N., H. Strauss, S. Meyer, and U. Vinkemeier. 2008. Tyrosine phosphorylation regulates the partitioning of STAT1 between different dimer conformations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:9238-9243.
- Wesemann, D.R., H. Qin, N. Kokorina, and E.N. Benveniste. 2004. TRADD interacts with STAT1-alpha and influences interferon-gamma signaling. *Nat Immunol.* 5:199-207.
- Wong, A.H., J.E. Durbin, S. Li, T.E. Dever, T. Decker, and A.E. Koromilas. 2001. Enhanced antiviral and antiproliferative properties of a STAT1 mutant unable to interact with the protein kinase PKR. *J Biol Chem.* 276:13727-13737.
- Wong, A.H., N.W. Tam, Y.L. Yang, A.R. Cuddihy, S. Li, S. Kirchhoff, H. Hauser, T. Decker, and A.E. Koromilas. 1997. Physical association between STAT1 and the interferon-inducible protein kinase PKR and implications for interferon and double-stranded RNA signaling pathways. *EMBO J.* 16:1291-1304.
- Wu, T.R., Y.K. Hong, X.D. Wang, M.Y. Ling, A.M. Dragoi, A.S. Chung, A.G. Campbell, Z.Y. Han, G.S. Feng, and Y.E. Chin. 2002. SHP-2 is a dual-specificity phosphatase involved in Stat1 dephosphorylation at both tyrosine and serine residues in nuclei. *J Biol Chem.* 277:47572-47580.
- Xu, W., and J.J. Zhang. 2005. Stat1-dependent synergistic activation of T-bet for IgG2a production during early stage of B cell activation. *J Immunol.* 175:7419-7424.
- Xu, X., X.Y. Fu, J. Plate, and A.S. Chong. 1998. IFN-gamma induces cell growth inhibition by Fas-mediated apoptosis: requirement of STAT1 protein for up-regulation of Fas and FasL expression. *Cancer Res.* 58:2832-2837.
- Xu, Z., E.J. Pone, A. Al-Qahtani, S.R. Park, H. Zan, and P. Casali. 2007. Regulation of aicda expression and AID activity: relevance to somatic hypermutation and class switch DNA recombination. *Critical reviews in immunology.* 27:367-397.
- Xu, Z., H. Zan, E.J. Pone, T. Mai, and P. Casali. 2012. Immunoglobulin class-switch DNA recombination: induction, targeting and beyond. *Nat Rev Immunol.* 12:517-531.
- Yang, J., and G.R. Stark. 2008. Roles of unphosphorylated STATs in signaling. *Cell Res.* 18:443-451.
- Yang, Y., J.C. Ochando, J.S. Bromberg, and Y. Ding. 2007. Identification of a distant T-bet enhancer responsive to IL-12/Stat4 and IFN-gamma/Stat1 signals. *Blood.* 110:2494-2500.
- Yoshimoto, T., K. Okada, N. Morishima, S. Kamiya, T. Owaki, M. Asakawa, Y. Iwakura, F. Fukai, and J. Mizuguchi. 2004. Induction of IgG2a class switching in B cells by IL-27. *J Immunol.* 173:2479-2485.
- Youlyouz-Marfak, I., N. Gachard, C. Le Cloennec, I. Najjar, F. Baran-Marszak, L. Reminieras, E. May, G.W. Bornkamm, R. Fagard, and J. Feuillard. 2008. Identification of a novel p53-dependent activation pathway of STAT1 by antitumour genotoxic agents. *Cell Death Differ.* 15:376-385.
- Zhang, J.J., U. Vinkemeier, W. Gu, D. Chakravarti, C.M. Horvath, and J.E. Darnell, Jr. 1996. Two contact regions between Stat1 and CBP/p300 in interferon gamma signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:15092-15096.
- Zhuang, S. 2013. Regulation of STAT signaling by acetylation. *Cell Signal.* 25:1924-1931.

# Résumé de thèse

Le facteur de transcription STAT1 est un effecteur majeur de la réponse à l'interféron exerçant ainsi un rôle clé dans l'immunité innée. Il est également un suppresseur de tumeur et régule des effets antiprolifératifs et pro-apoptotiques. Afin de mettre en évidence de nouvelles implications anti-tumorales de STAT1, ce projet de doctorat a porté sur son implication fonctionnelle i) dans l'expression des immunoglobulines (Ig), processus essentiel de l'immunité adaptative et ii) dans la réponse cellulaire aux traitements par les agents génotoxiques

Notre étude cinétique, après induction de l'expression de STAT1 dans des cellules initialement totalement déficientes, a montré son implication dans l'expression des IgG membranaires. Le mécanisme régulateur est indirect : il impliquerait une inhibition de l'activation de STAT3 conduisant à l'inhibition de l'expression de BLIMP1, un acteur essentiel de la différenciation plasmocytaire. La capacité de STAT1 à pouvoir se fixer sur le promoteur de BLIMP1, de même que STAT3 n'exclut pas une implication transcriptionnelle.

Au cours d'un traitement génotoxique par le MNNG, nous avons décrit la participation de STAT1 à un complexe de réparation de l'ADN. Seule la présence de STAT1 permet l'intégration au complexe MLH1/p53 de la kinase c-Abl. Dans ce contexte, on observe une cytotoxicité sous le contrôle de l'activité kinase de c-Abl, une réparation rapide et efficace de l'ADN, un arrêt seulement transitoire du cycle et une orientation vers la survie cellulaire équivalent à une résistance à ce traitement.

Ces résultats mettent en évidence deux nouveaux rôles anti-tumoraux de STAT1 par sa contribution à des complexes régulateurs essentiels et la désigne comme une potentielle cible thérapeutique.

## Abstract

The transcription factor STAT1, as a major effector of interferon, plays a key role in innate immunity. Through its strong anti-proliferative and pro-apoptotic properties STAT1 is also considered as a tumor suppressor. The aim of this project was to delineate new potential tumor suppressor properties for STAT1 in two signaling mechanisms: i) Ig expression in plasmacytoid cells and ii) cellular response to genotoxic stress.

Our kinetic experiments, upon "de novo" expression of STAT1 in a rare STAT1-deficient cell line showed its modulation of membrane IgG expression. The underlying mechanism involves a STAT1-dependent inactivation of STAT3 and subsequently a decreased expression of BLIMP1, a major contributor to plasma cell differentiation. Since STAT1, like STAT3, is able to bind to the BLIMP1 promoter elements a transcriptional interference cannot be excluded.

During alkylating agent treatment with MNNG we have observed the presence of STAT1 in DNA repair complex. STAT1 expression allows the recruitment into a MLH1/p53 complex of the kinase c-Abl. This complex leads to cytotoxic dependence on c-Abl kinase activity, an efficient DNA repair with a transient cell cycle arrest and to signaling mechanisms toward cell survival. At longer term of exposure STAT1 also lead to cellular resistance to treatment.

These results provide evidences for new anti-tumor roles of STAT1 in two major regulatory systems and indicate STAT1 as a potential therapeutic target.

Mots clés: STAT1, immunoglobulines, BLIMP1, STAT3, MLH1, c-Abl, MNNG, MMR, p53

Key words: STAT1, immunoglobulins, BLIMP1, STAT3, MLH1, c-Abl, MNNG, MMR, p53

Discipline: Biologie cellulaire et moléculaire

UMR U978 Inserm-Université Paris 13, UFR SMBH-74 rue Marcel Cachin, 93000 Bobigny