



HAL
open science

La voie de signalisation Jak/Stat dans la leucémogénèse

Gouilleux F

► **To cite this version:**

Gouilleux F. La voie de signalisation Jak/Stat dans la leucémogénèse. Hématologie, 2001. hal-02464397

HAL Id: hal-02464397

<https://hal.science/hal-02464397v1>

Submitted on 3 Nov 2021

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

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

La voie de signalisation Jak/Stat dans la leucémogénèse

Fabrice Gouilleux

Au cours de la dernière décennie, la mise en évidence des protéines tyrosines kinases Jak et des facteurs de transcription Stat a permis de décrypter un mécanisme essentiel de la signalisation induite par les récepteurs de cytokines. L'inactivation des gènes des *jaks* et des *stats* a montré que cette voie de signalisation était cruciale pour la prolifération, la survie et la différenciation des cellules hématopoïétiques. Les premières études chez la drosophile d'une part et dans des leucémies humaines d'autre part ont suggéré que la dérégulation de l'activité de cette voie de signalisation était susceptible d'entraîner des hémopathies ou tout au moins d'être un des maillons dans la chaîne d'événements conduisant à la leucémogénèse. L'activation constitutive de la voie Jak/Stat a été effectivement mise en évidence :

1) par le biais de protéines de fusion issues de translocations chromosomiques décrites dans des leucémies et impliquant les gènes *jak2* et *stat5b* ;

2) dans des cellules leucémiques transformées par des oncogènes viraux et cellulaires ou après infection par des virus immortalisants ou transformants.

Les récentes données obtenues *in vitro* et *in vivo* ont montré que cette voie de signalisation régulait l'expression de gènes impliqués dans la survie et le cycle cellulaire. L'objectif de cette revue est de résumer les connaissances que nous avons actuellement sur le rôle de la voie Jak/Stat dans l'hématopoïèse, sur les mécanismes de son activation constitutive et son implication potentielle dans la leucémogénèse. La disponibilité des souris mutantes pour les *jaks* et les *stats* sera un outil précieux dans l'avenir pour déterminer l'importance fonctionnelle de ces protéines dans la transformation induite par différents oncogènes.

Mots clés : Jak, Stat, hématopoïèse, leucémogénèse.

Key-words : Jak, Stat, hematopoiesis, leukemia, oncogene.

ADRESSE

ICGM/Inserm U. 363, hôpital Cochin, 27, rue du Faubourg-Saint-Jacques, 75014 Paris.

Hématologie n° 1, vol. 7, janvier-février 2001

La voie Jak/Stat dans l'hématopoïèse

Mécanisme d'activation de la voie Jak/Stat

Les études portant sur la caractérisation des voies de transduction du signal induites par les cytokines ont montré le rôle crucial de la voie de signalisation Jak/Stat dans la prolifération, la différenciation et la survie des cellules hématopoïétiques [1]. Après liaison de la cytokine à son récepteur, les protéines tyrosine kinases Jak préassociées à ces récepteurs sont activées et vont ensuite phosphoryler le récepteur ainsi que de nombreux substrats cellulaires et permettre ainsi la propagation du signal. Quatre protéines Jak ont été isolées (Jak1, Jak2, Jak3, TYK2). L'inactivation des gènes des Jak chez la souris a montré l'importance de ces kinases dans le développement des cellules hématopoïétiques des compartiments lymphoïdes et myéloïdes [2]. Les protéines Stat (*signal transducer and activator of transcription*) ont été les premiers substrats

connus de ces tyrosine kinases. Sept membres ont été identifiés chez les mammifères (Stat1, 2, 3, 4, 5A, 5B, 6). Lorsque les protéines Stat sont activées, elles forment des dimères (homo- ou hétéro-dimères). Ce complexe migre dans le noyau, se lie sur des éléments ADN spécifiques présents dans les régions régulatrices de gènes cibles et module leur transcription (*figure 1*). La phosphorylation sur des résidus serines de ces facteurs régule également leur activité transcriptionnelle et/ou leur activité de liaison à l'ADN, voire leur translocation nucléaire.

Structure des protéines Stat

Comme leur nom l'indique, les Stat sont à la fois des molécules de signalisation et des facteurs de transcription. Cette bipotentialité est retrouvée dans la structure globale de ces protéines puisqu'elles contiennent toutes un domaine d'interaction protéique SH2 (*Src homology domain 2*), et un résidu tyrosine présent dans la partie carboxy-terminale, qui, une fois phosphorylé, permet l'activation de ces protéines. Le domaine SH2 permet

RÉFÉRENCES

1. Ihle JN, Thierfelder W, Teglund S, Stravapodis D, Wang D, Feng J, Parganas E. Signaling by the cytokine receptor superfamily. *Ann N Y Acad Sci* 1998 ; 865 : 1.
2. Gisselbrecht S. Fonctions des tyrosines kinases de la famille Jak dans les cellules hématopoïétiques. *Hématologie* 1998 ; 4 : 332.
3. Moriggi R, Gouilleux-Gruart V, Jahne R, Berchtold S, Gartmann C, Liu X, Hennighausen L, Sotiropoulos A, Groner B, Gouilleux F. Deletion of the carboxyl-terminal transactivation domain of MGF-Stat5 results in sustained DNA binding and a dominant negative phenotype. *Mol Cell Biol* 1996 ; 16 : 5691.
4. Levy DE, Gilliland DG. Divergent roles of Stat1 and Stat5 in malignancy as revealed by gene disruptions in mice. *Oncogene* 2000 ; 19 : 2505.
5. Wurster AL, Tanaka T, Grusby MJ. The biology of Stat4 and Stat6. *Oncogene* 2000 ; 19 : 2577.
6. Akira S. Roles of Stat3 defined by tissue-specific gene targeting. *Oncogene* 2000 ; 19 : 2607.
7. Lin JX, Leonard WJ. The role of Stat5a and Stat5b in signaling by IL-2 family cytokines. *Oncogene* 2000 ; 19 : 2566.
8. Feldman GM, Rosenthal LA, Liu X, Hayes MP, Wynshaw-Boris A, Leonard WJ, Hennighausen L, Finbloom DS. Stat5A-deficient mice demonstrate a defect in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced proliferation and gene expression. *Blood* 1997 ; 90 : 1768.

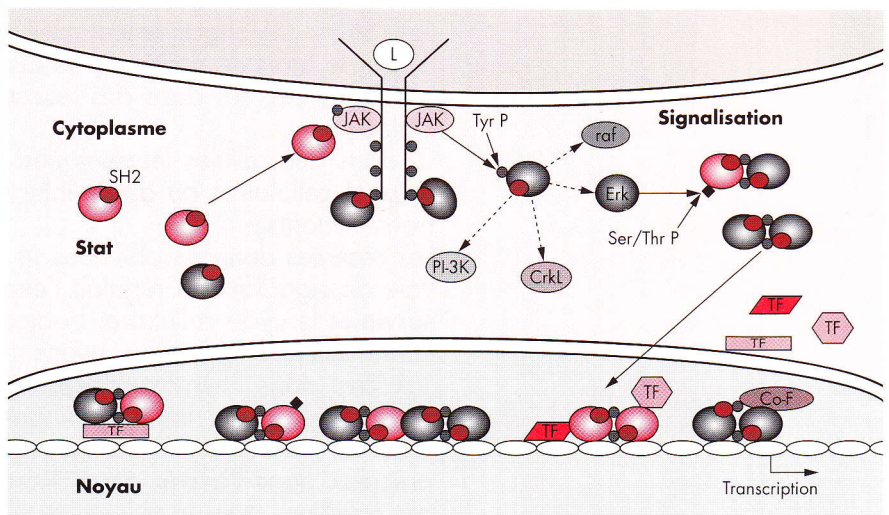


Figure 1. **Activation de la voie Jak/Stat par les récepteurs de cytokines.** La liaison de la cytokine à son récepteur induit son oligomérisation et l'activation des Jak qui sont associées aux chaînes de récepteurs. Les Jak activés vont phosphoryler des résidus tyrosine présents dans la partie cytoplasmique des récepteurs et ainsi favoriser le recrutement des Stat au niveau du récepteur activé par le biais de leur domaine SH2. Les Stat sont ensuite phosphorylés sur tyrosine, vont former des dimères (homo- ou hétéro-dimères), migrer dans le noyau, se lier sur des séquences ADN spécifiques dans les promoteurs de gènes cibles et activer leur transcription. Les Stat peuvent être également activées directement par les Jak et sont la cible de sérine/thréonine kinases. En tant que facteur de transcription, l'interaction des Stat avec d'autres facteurs de transcription ou des co-facteurs, la formation de tétramères de Stat vont être en grande partie responsables de la spécificité de réponse. En tant que molécules de signalisation, les Stat vont pouvoir interagir avec des molécules impliquées dans d'autres voies de signalisation tel que c-raf, CrkL, Erk et la PI 3-kinase.

RÉFÉRENCES

9. Teglund S, McKay C, Schuetz E, van Deursen JM, Stravopodis D, Wang D, Brown M, Bodner S, Grosveld G, Ihle JN. Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell* 1998; 93: 841.
10. Moriggl R, Topham DJ, Teglund S, Sexl V, McKay C, Wang D, Hoffmeyer A, van Deursen J, Sangster MY, Bunting KD, Grosveld GC, Ihle JN: Stat5 is required for IL-2-induced cell cycle progression of peripheral T-cells. *Immunity* 1999; 10: 249.
11. Sexl V, Piekorz R, Moriggl R, Rohrer J, Brown MP, Bunting KD, Rothhammer K, Roussel MF, Ihle JN. Stat5a/b contribute to interleukin 7-induced B-cell precursor expansion, but abl and bcr/abl-induced transformation are independent of stat5 [In Process Citation]. *Blood* 2000; 96: 2277.
12. Socolovsky M, Fallon AE, Wang S, Brugnara C, Lodish HF. Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a^{-/-}5b^{-/-} mice: a direct role for Stat5 in Bcl-X(L) induction. *Cell* 1999; 98: 181.
13. Kieslinger M, Woldman I, Moriggl R, Hofmann J, Marine JC, Ihle JN, Beug H, Decker T. Antiapoptotic activity of Stat5 required during terminal stages of myeloid differentiation. *Genes Dev* 2000; 14: 232.
14. Luo H, Rose P, Barber D, Hanratty WP, Lee S, Roberts TM, D'Andrea AD, Dearolf CR. Mutation in the Jak kinase JH2 domain hyperactivates Drosophila and mammalian Jak-Stat pathways. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 1562.
15. Lacronique V, Boureux A, Valle VD, Poirel H, Quang CT, Mauchauffe M, Berthou C, Lesard M, Berger R, Ghysdael J, Bernard OA. A TelJak2 fusion protein with constitutive kinase activity in human leukemia. *Science* 1997; 278: 1309.

Hématologie n° 1, vol. 7, janvier-février 2001

le recrutement des protéines Stat sur le récepteur phosphorylé et la dimérisation des Stat par le biais d'une interaction réciproque entre le domaine SH2 de l'un des monomères et le résidu tyrosine phosphorylé de l'autre (figure 2). En tant que facteur de transcription, ces protéines contiennent un domaine de liaison à l'ADN (DBD) interagissant avec une séquence consensuelle palindromique TT N(5ou6)AA appelée GAS (*gamma activated site*). La nature et la longueur des nucléotides présents entre les motifs TT et AA spécifient l'interaction de chaque protéine Stat. Les études cristallographiques ont montré que ce domaine se caractérisait par un repliement de type immunoglobuline et présentait des similitudes avec les structures des domaines de liaison à l'ADN de la protéine suppresseur de tumeur, p53 et du facteur de transcription NF- κ B. En dehors de l'interaction d'un dimère de Stat sur une séquence GAS définie, les dimères de Stat s'associent également pour reconnaître des séquences GAS présentes en tandem dans les promoteurs de gènes cibles soulignant ainsi la très grande variabilité d'interaction de ces protéines sur des sites GAS pour lesquels elles présentent une affinité plus ou moins élevée. Cette capacité à former des tétramères requiert l'extrémité NH₂ terminale des protéines Stat

Le domaine de liaison à l'ADN est séparé du domaine SH2 par une région appelée LD pour *linker domain*, initialement décrite comme un domaine SH3. Dans le cas de Stat1, ce domaine module son activité transcriptionnelle. Par ailleurs, entre le domaine de tétramérisation NH₂-terminal et le DBD se situe une région *coiled-coil* impliquée dans des interactions avec d'autres facteurs de transcription.

L'extrémité COOH-terminale des protéines Stat représente la région la plus divergente entre les membres de cette famille. Elle contient un domaine de régulation de la transcription et est fréquemment la cible de phosphorylation sur des résidus serine et /ou thréonine. Par ailleurs, ce domaine est capable d'interagir avec d'autres facteurs de transcription ou des co-facteurs tels que CBP/P300. En dehors de son rôle dans l'activité transcriptionnelle, la région COOH-terminale est également susceptible de moduler l'activité de liaison à l'ADN des protéines Stat. En effet des délétions de cette région dans Stat3 et Stat5 augmentent la capacité de ces protéines à interagir avec leurs séquences cibles respectives [3]. Dans le cas de Stat5, cette augmentation est corrélée à une stabilisation des formes phosphorylées de ces protéines tronquées suggérant ainsi que la région COOH-terminale est un domaine d'interaction potentiel avec une phosphatase ou avec des protéines responsables de la dégradation des Stat phosphorylées. Il est important de noter que la région COOH-terminale est absente dans différentes isoformes des protéines Stat dont l'expression résulte d'un mécanisme d'épissage alternatif ou de clivage protéolytique. Leur rôle physiologique reste encore inconnu mais les différentes données *in vitro* montrent que ces protéines sont capables de bloquer ou d'antagoniser l'activité des formes non tronquées ce qui a conduit à leur attribuer des propriétés de dominant négatifs.

Spécificité d'activation des Jak et des Stat

Puisqu'il existe quatre Jak et sept Stat pour plus d'une vingtaine de ligands, la

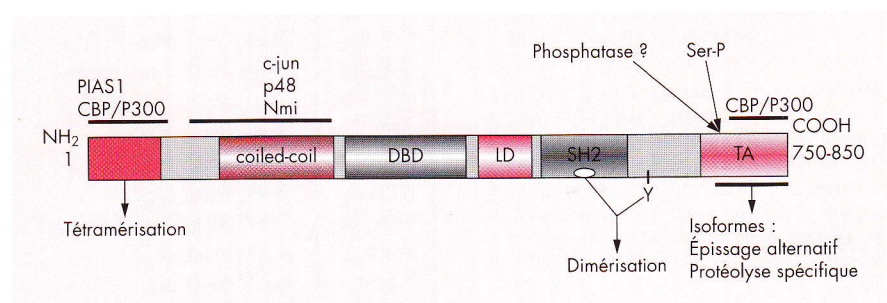


Figure 2. Représentation schématique de la structure des Stat avec les différents domaines. Les régions d'interaction avec des facteurs de transcription ou des co-facteurs sont indiquées.

RÉFÉRENCES

16. Peeters P, Raynaud SD, Cools J, Wlodarska I, Grosgeorge J, Philip P, Monpoux F, Van Rompaey L, Baens M, Van den Berghe H, Marynen P. Fusion of Tel, the ETS-variant gene 6 (ETV6), to the receptor-associated kinase Jak2 as a result of t(9;12) in a lymphoid and t(9;15;12) in a myeloid leukemia. *Blood* 1997 ; 90 : 2535.
17. Golub TR, Barker GF, Lovett M, Gilliland DG. Fusion of PDGF receptor beta to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation. *Cell* 1994 ; 77 : 307.
18. Ho JM, Beattie BK, Squire JA, Frank DA, Barber DL. Fusion of the ets transcription factor TEL to Jak2 results in constitutive Jak-Stat signaling. *Blood* 1999 ; 93 : 4354.
19. Lacronique V, Boueux A, Monni R, Dumon S, Mauchauffe M, Mayeux P, Gouilleux F, Berger R, Gisselbrecht S, Ghysdael J, Bernard OA. Transforming properties of chimeric Tel/Jak proteins in Ba/F3 cells. *Blood* 2000 ; 95 : 2076.
20. Schwaller J, Frantsve J, Aster J, Williams IR, Tomasson MH, Ross TS, Peeters P, Van Rompaey L, Van Etten RA, Ilaria R Jr, Marynen P, Gilliland DG. Transformation of hematopoietic cell lines to growth-factor independence and induction of a fatal myelo- and lymphoproliferative disease in mice by retrovirally transduced Tel/Jak2 fusion genes. *EMBO J* 1998 ; 17 : 5321.
21. Carron C, Cormier F, Janin A, Lacronique V, Giovannini M, Daniel MT, Bernard O, Ghysdael J. TEL/Jak2 transgenic mice develop T-cell leukemia. *Blood* 2000 ; 95 : 3891.

spécificité de réponse d'une cytokine concernant cette voie de signalisation ne peut pas uniquement s'expliquer en terme de spécificité d'activation des Jak et des Stat au niveau du récepteur. La multitude des données obtenues *in vitro* a montré effectivement qu'une Stat ou une Jak peuvent être activées par plusieurs cytokines et qu'une cytokine peut éventuellement activer plusieurs Stat ou plusieurs Jak. Cette règle n'est toutefois pas universelle et dépend du contexte cellulaire utilisé dans les expériences réalisées *in vitro*. La spécificité de réponse vis-à-vis d'une cytokine donnée est dépendante de plusieurs facteurs faisant intervenir en premier lieu, l'ancrage spécifique des Stat et des Jak sur le récepteur concerné. Dans le cas des Stat, cet ancrage est réalisé soit par l'interaction du domaine SH2 des Stat avec un ou plusieurs résidus phosphorylés sur tyrosine présents dans la région cytoplasmique du récepteur activé soit par le biais d'une interaction avec des molécules dites adaptatrices associées au récepteur ou encore par une interaction directe avec les Jak. La spécificité de réponse est ensuite affinée graduellement par la combinaison de Stat activées (homo-hétéro-

dimères), par leur phosphorylation sur des résidus serine, par leur capacité à migrer dans le noyau, par leur spécificité de liaison à l'ADN et au final par leurs interactions fonctionnelles avec d'autres facteurs de transcription qui seront déterminantes pour l'induction ou la répression de l'expression de gènes cibles (figure 1). La compilation des données obtenues à partir de cellules en culture a montré que Stat1, Stat3, Stat5A et Stat5B étaient phosphorylées par un très grand nombre de cytokines alors que Stat2, Stat4 et Stat6 avaient un profil d'activation beaucoup plus restreint (tableau I). Les protéines Stat sont également phosphorylées par les récepteurs de facteurs de croissance à activité tyrosine kinase tels que les récepteurs de l'EGF, du PDGF, du CSF-1, et les récepteurs FLT3 et c-Kit. Dans certains cas, cette activation peut se faire en l'absence d'activation des Jak et requiert le domaine kinase du récepteur ou le recrutement et l'activation d'autres tyrosine kinases comme Src, Lck, Lyn. L'activation des Stat fait ainsi intervenir différents mécanismes et différentes protéines kinases.

Rôle biologique des Stat

L'inactivation des différents gènes de Stat chez la souris, au moins pour celles ne conduisant pas à un phénotype létal, a montré de manière surprenante que l'hématopoïèse est qualitativement et globalement peu affectée ce qui contraste avec les résultats de l'inactivation des gènes des Jak (tableau II). Des perturbations graves des réponses immunitaires innées et acquises ont toutefois été observées chez les souris *stat1*^{-/-}, *stat4*^{-/-} et *stat6*^{-/-}. Les souris *stat1*^{-/-} sont très susceptibles aux infections par des agents pathogènes et à la cancérogenèse induite par des carcinogènes chimiques [4]. La perte de réponse aux interférons permet en grande partie d'expliquer ces deux phénomènes. Les souris *stat4*^{-/-} et *stat6*^{-/-} ne répondent plus à l'IL-12 et à l'IL-4 respectivement et en conséquence présentent un grave défaut dans le développement et la différenciation des lymphocytes TH1 et TH2 [5]. La prolifération des lymphocytes en réponse à l'IL-12 chez les souris *stat4*^{-/-} et celle en réponse à l'IL-4 chez les souris *stat6*^{-/-} sont défectueuses. Dans les deux cas, il y a un blocage dans la transition

Tableau I
Activation des Stat par les récepteurs de cytokines et de facteurs de croissance

IL-2R	Stat1, Stat3, Stat4, Stat5
IL-15R	Stat3, Stat5
IL-9R	Stat1, Stat3, Stat5
IL-7R	Stat1, Stat3, Stat5
IL-4R	Stat1, Stat3, Stat5, Stat6
IL-3R	Stat1, Stat3, Stat5, Stat6
IL-5R	Stat1, Stat3, Stat5
GM-CSFR	Stat1, Stat3, Stat5, Stat6
IL-6R (gp130)	Stat1, Stat3, Stat5a
LIFR	Stat1, Stat3, Stat5a
IL-12Rβ	Stat1, Stat3, Stat4
G-CSFR	Stat1, Stat3, Stat5
PRLR	Stat1, Stat5
GHR	Stat1, Stat3, Stat5
EPOR	Stat1, Stat3, Stat5
TPOR	Stat1, Stat3, Stat5
IFNα/βR	Stat1, Stat3, Stat5, Stat4, Stat5
IFNγR	Stat1, Stat3, Stat5
IL-10	Stat1, Stat3, Stat5
CSF-1R	Stat1, Stat3, Stat5
c-Kit	Stat1, Stat5
Flt3	Stat5

RÉFÉRENCES

22. Arnould C, Philippe C, Bourdon V, Grogre MJ, Berger R, Jonveaux P. The signal transducer and activator of transcription Stat5b gene is a new partner of retinoic acid receptor alpha in acute promyelocytic-like leukaemia. *Hum Mol Genet* 1999 ; 8 : 1741.
23. Gouilleux-Gruart V, Gouilleux F, Desaint C, Claisse JF, Capod JC, Delobel J, Weber-Nordt R, Dusanter-Fourt I, Dreyfus F, Groner B, Prin L. Stat-related transcription factors are constitutively activated in peripheral blood cells from acute leukemia patients. *Blood* 1996 ; 87 : 1692.
24. Shuai K, Halpern J, ten Hoeve J, Rao X, Sawyers CL. Constitutive activation of Stat5 by the BCR-ABL oncogene in chronic myelogenous leukemia. *Oncogene* 1996 ; 13 : 247.
25. Weber-Nordt RM, Egen C, Wehinger J, Ludwig W, Gouilleux-Gruart V, Mertelsmann R, Finke J. Constitutive activation of Stat proteins in primary lymphoid and myeloid leukemia cells and in Epstein-Barr virus (EBV)-related lymphoma cell lines. *Blood* 1996 ; 88 : 809.
26. Catlett-Falcone R, Landowski TH, Oshiro MM, Turkson J, Levitzki A, Savino R, Ciliberto G, Moscinski L, Fernandez-Luna JL, Nunez G, Dalton WS, Jove R. Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* 1999 ; 10 : 105.
27. Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R. Stat in oncogenesis. *Oncogene* 2000 ; 19 : 2474.

Tableau II
Phénotypes associés aux différentes inactivations des gènes des Stat

	Phénotype
<i>Stat1</i>	Pas de réponse à l'IFN γ . Susceptibilité accrue aux infections virales et bactériennes et à la carcinogenèse induite par agents chimiques
<i>Stat2</i>	Non décrit
<i>Stat3</i>	Létal au niveau embryonnaire (jour 6,5-7,5). Pas de gastrulation
<i>Stat4</i>	Pas de développement TH1. Pas de réponse à l'IL-12
<i>Stat5A</i>	Pas de développement de la glande mammaire. Prolifération des précurseurs monocytaires et des lymphocytes T réduite en réponse respectivement au GM-CSF et à l'IL-2
<i>Stat5B</i>	Défaut d'expression des gènes hépatiques liés au dimorphisme sexuel Diminution de la prolifération des cellules NK et de leur activité cytotoxique en réponse à l'IL-2
<i>Stat5A/B</i>	Pas de prolifération des lymphocytes T en réponse à l'IL-2. Absence de cellules NK. Défaut de prolifération des lymphocytes pro-B et pré-B en réponse à l'IL-7 Diminution du nombre de progéniteurs hématopoïétiques après stimulation IL-3, GM-CSF, IL-5 et G-CSF Sensibilité accrue à l'apoptose des progéniteurs érythroïdes et myéloïdes après stimulation par l'EPO et le GM-CSF respectivement
<i>Stat6</i>	Pas de développement TH2. Pas de réponse à l'IL-4

G1/S du cycle cellulaire consécutive à une dérégulation de l'expression de la protéine p27^{KIP-1}, un inhibiteur de CDK (cyclin dependent kinases). Stat4 et Stat6 contrôleraient ainsi la prolifération des lymphocytes après stimulation par l'IL-12 ou l'IL-4 en régulant l'expression d'inhibiteurs du cycle cellulaire par un mécanisme qui reste encore à déterminer. La délétion du gène *stat3* est létale chez la souris dès le stade embryonnaire et avant la gastrulation. Ces résultats ont donc conduit les laboratoires à réaliser la délétion conditionnelle de ce gène dans différents types cellulaires [6]. Ainsi la délétion spécifique de *stat3* dans les lymphocytes T conduit à diminuer l'effet anti-

apoptotique de l'IL-6 sur ces cellules et à une baisse de leur prolifération en réponse à l'IL-2. Cette diminution partielle de la prolifération des lymphocytes T s'explique par un défaut dans l'expression du gène de la chaîne α du récepteur de l'IL-2 (CD25) et donc dans la formation d'un récepteur de haute affinité. L'augmentation de la concentration d'IL-2 permet de corriger la réponse proliférative des lymphocytes T des souris *stat3*^{-/-}. La délétion conditionnelle de *stat3* dans les macrophages et les neutrophiles conduit à leur hyper-activation. Les souris correspondantes produisent en plus grandes quantités des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1, le TNF α , l'IFN γ , sont extrêmement susceptibles aux chocs endotoxiques et développent avec l'âge des inflammations chroniques du côlon. Ces phénotypes sont similaires à ceux observés chez les souris déficientes en IL-10, une cytokine anti-inflammatoire. En effet, les macrophages et les neutrophiles des souris *stat3*^{-/-} ne répondent plus efficacement à l'IL-10.

Bien que Stat5A et Stat5B soient deux protéines extrêmement apparentées (96 % d'homologie) codées par deux gènes distincts, les phénotypes observés chez les souris *stat5a*^{-/-} et *stat5b*^{-/-} sont différents. Pour les souris *stat5a*^{-/-}, le développement de la glande mammaire et le processus de lactation sont altérés alors que dans le cas des souris *stat5b*^{-/-}, l'expression de gènes hépatiques liés au dimorphisme sexuel est affectée [4]. Ces souris ont également une taille réduite et développent une obésité. Les phénotypes distincts de ces deux mutations sont similaires à ceux observés après inactivation des gènes des récepteurs de la prolactine et de l'hormone de croissance. Dans le compartiment hématopoïétique, les souris *stat5a*^{-/-} ou *stat5b*^{-/-} présentent une diminution de la prolifération des lymphocytes T et des cellules NK (natural killer) en réponse à l'IL-2 [7]. Comme dans le cas de l'inactivation conditionnelle de *stat3*, cette diminution de prolifération dans les souris *stat5a*^{-/-} est liée à une baisse d'expression du gène CD25. L'augmentation de la concentration d'IL-2 permet également de corriger ce défaut de prolifération. En revanche, chez les souris *stat5b*^{-/-}, l'augmentation de la concentration d'IL-2 ne modifie pas la réponse proliférative des lymphocytes T. Chez ces dernières, en effet, la diminution

RÉFÉRENCES

28. Migone TS, Lin JX, Cereseto A, Mulloy JC, O'Shea JJ, Franchini G, Leonard WJ. Constitutively activated Jak-Stat pathway in T-cells transformed with HTLV-1. *Science* 1995 ; 269 : 79.
29. Gires O, Kohlhuber F, Kilger E, Baumann M, Kieser A, Kaiser C, Zeidler R, Scheffer B, Ueffing M, Hammerschmidt W. Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interacts with Jak3 and activates Stat proteins. *EMBO J* 1999 ; 18 : 3064.
30. Chaturvedi P, Sharma S, Reddy EP. Abrogation of interleukin-3 dependence of myeloid cells by the v-src oncogene requires SH2 and SH3 domains which specify activation of Stat. *Mol Cell Biol* 1997 ; 17 : 3295.
31. Sjöblom T, Boureux A, Ronnstrand L, Heldin CH, Ghysdael J, Ostman A. Characterization of the chronic myelomonocytic leukemia associated TEL-PDGF beta R fusion protein. *Oncogene* 1999 ; 18 : 7055.
32. Frank DA, Mahajan S, Ritz J. B lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia contain signal transducer and activator of transcription (Stat) 1 and Stat3 constitutively phosphorylated on serine residues. *J Clin Invest* 1997 ; 100 : 3140.
33. Danial NN, Losman JA, Lu T, Yip N, Krishnan K, Krolewski J, Goff SP, Wang JY, Rothman PB. Direct interaction of Jak1 and v-Abl is required for v-Abl-induced activation of STAT and proliferation. *Mol Cell Biol* 1998 ; 18 : 6795.
34. Danial NN, Rothman P. Jak-Stat signaling activated by Abl oncogenes. *Oncogene* 2000 ; 19 : 2523.
35. Nieborowska-Skorska M, Wasik MA, Slupianek A, Salomoni P, Kitamura T, Calabretta B, Skorski T. Signal transducer and activator of transcription (STAT)5 activation by BCR/ABL is dependent on intact Src homology (SH)3 and SH2 domains of BCR/ABL and is required for leukemogenesis. *J Exp Med* 1999 ; 189 : 1229.

d'expression du gène *CD25* et celle du gène de la chaîne β du récepteur de l'IL-2 permettrait d'expliquer ces différences. Par ailleurs, dans les souris *stat5b*^{-/-} et contrairement aux souris *stat5a*^{-/-}, l'activité cytotoxique des cellules NK est réduite en raison d'une baisse d'expression du gène de la perforine. Enfin, dans les souris *stat5a*^{-/-}, la prolifération des précurseurs de la lignée monocyttaire en réponse au GM-CSF est également diminuée [8]. L'homologie de séquence observée entre Stat5A et Stat5B laissait supposer que certains phénotypes associés à la perte d'expression d'une des deux protéines puissent être masqués par la présence de l'autre. Pour cette raison, l'inactivation simultanée des deux gènes a été réalisée. Chez les souris *stat5a/b*^{-/-} également et de manière surprenante, l'hématopoïèse reste globalement peu affectée [9]. Il existe toutefois un défaut complet de la prolifération des lymphocytes T périphériques en réponse à l'IL-2 dû à un blocage dans la progression du cycle cellulaire [10]. De même ces souris n'ont pas de cellules NK, développent des splénomégaties et leurs lymphocytes T sont activés. Ces différents phénotypes sont également observés chez les souris déficientes en IL-2 et en chaîne β de récepteur à l'IL-2. Dans le cas des lymphocytes B, l'expansion dépendante de l'IL-7 des cellules précurseurs pro-B et pré-B est perturbée dans les souris *stat5a/b*^{-/-} [11]. Au niveau du compartiment myéloïde, les progéniteurs myéloïdes et érythroïdes cultivés en présence de GM-CSF et d'Epo sont plus sensibles à l'apoptose [12, 13]. Par ailleurs, la sensibilité à l'apoptose des progéniteurs érythroïdes pourrait expliquer l'anémie observée dans le foie fœtal des embryons de ces souris. Ces résultats restent toutefois encore controversés. Enfin chez ces souris, une réduction du nombre de progéniteurs myéloïdes mis en culture en présence d'IL-3, IL-5, GM-CSF et G-CSF a été observée [9]. L'ensemble des données obtenues à partir de cellules hématopoïétiques des souris *stat3*^{-/-} et *stat5*^{-/-} illustre le rôle de ces facteurs à la fois dans des phénomènes anti-apoptotiques médiés par les cytokines ainsi que dans la régulation du cycle cellulaire. La voie Jak/Stat étant essentielle à la signalisation induite par les récepteurs des cytokines, il était envisageable d'imaginer que cette voie pouvait être dérégulée

au cours du processus de leucémogénèse. De plus, le rôle crucial des Jak *in vivo* dans l'hématopoïèse et celui des Stat dans la régulation de la survie et du cycle cellulaire laissait supposer que la dérégulation de l'activité de ces protéines était susceptible de conduire à des hémopathies malignes.

La voie Jak/Stat dans la leucémogénèse

Les premières données quant à l'implication potentielle de la voie Jak/Stat reposent sur des résultats obtenus chez la drosophile. En effet, deux mutations ponctuelles du locus *Hop* codant pour la protéine Jak de drosophile, les mutations *Hoptum-1* et *Hopt42* conduisent à l'hyperactivité de cette kinase et entraînent des hémopathies chez la mouche. L'introduction artificielle de ces mutations dans la protéine murine Jak2 induit également son hyperactivité [14]. Des mutations activatrices des gènes des Jak et des Stat n'ont pas encore été trouvées à ce jour chez les mammifères. Cependant leur implication directe dans la leucémogénèse a été récemment mise en évidence par la caractérisation de protéines de fusion issues de remaniements chromosomiques observés dans certaines leucémies. Ce sont les cas en particulier de Jak2 et de Stat5B dans les fusions *Tel-Jak2* et *Stat5B-Rar α* . D'autre part en dehors des protéines de fusion, l'activité constitutive des protéines Jak et Stat a été retrouvée dans différents types de leucémies, de lymphomes et de myélomes sans que la cause en ait été bien déterminée. Toutefois, les nombreuses données obtenues *in vitro* ont montré que cette activité constitutive est retrouvée dans différentes lignées cellulaires transformées par des oncogènes viraux et/ou cellulaires à activité tyrosine kinase ou par des virus immortalisants ou transformants tels que EBV (*Epstein-Barr virus*) ou HTLV-1 (*human T-cell leukemia virus-1*). Dans la suite de ce chapitre, nous décrirons dans un premier temps les connaissances que nous possédons à l'heure actuelle sur les mécanismes de cette activité constitutive que cela soit dans le cas des différentes protéines de fusion oncogéniques connues impliquant les Jak et les Stat ou par le biais indirect de l'activité de différents

oncogènes viraux ou cellulaires. Enfin dans un second temps, nous analyserons les conséquences cellulaires et moléculaires de l'activité constitutive des Jak et des Stat et les répercussions de cette dérégulation dans la leucémogénèse.

Les fusions oncogéniques Tel-Jak2 et Stat5B-Rar α

Tel-Jak2

Les translocations t(9;12)(p24;p13) et t(9;15;12)(p24;q15;p13) ont été caractérisées respectivement dans des leucémies aiguës lymphoïdes et dans une leucémie myéloïde chronique atypique [15, 16]. Ces remaniements conduisent à la production d'une protéine de fusion entre Tel, un membre de la famille des facteurs de transcription Ets et le domaine tyrosine kinase de Jak2 (figure 3A). Le gène *tel* est fréquemment remanié dans des cancers humains. Il est souvent fusionné à des gènes codant pour des facteurs de transcription tels qu'AML-1 ou des gènes codant pour des tyrosines ou des récepteurs à activité tyrosine kinase tel que *abl*, *PDGFR β* [17]. Dans ces exemples la partie amino-terminale de Tel, qui contient un motif de dimérisation entraîne l'oligomérisation et l'activation constitutive de la tyrosine kinase des protéines chimériques. La protéine Tel-Jak2 exprimée dans les cellules Ba/F3 dépendantes de la présence d'IL-3 pour leur survie et leur prolifération est capable de

lever cette dépendance, d'activer constitutivement Stat5 et d'autres voies de signalisation comme la PI 3-kinase et la voie ras/raf/MAP kinase [18, 19]. L'introduction de Tel-Jak2 par vecteur rétroviral dans des cellules de moelle osseuse est capable d'induire des syndromes myélo et lymphoprolifératifs après greffe de ces cellules chez la souris [20]. Enfin, les souris transgéniques exprimant Tel-Jak2 dans le compartiment lymphoïde développent des leucémies T [21]. Ces différentes données illustrent le pouvoir oncogénique de Tel-Jak2.

Stat5B/Rar α

Le remaniement du chromosome 17 observé dans une leucémie aiguë promyélocytaire (LAP) a permis d'identifier une nouvelle fusion génique entre le gène codant pour le récepteur de l'acide rétinolique Rar α et le gène *stat5b* [22] (figure 3B). Rar α est fréquemment réarrangé dans ce type de leucémie et plusieurs partenaires ont déjà été identifiés tels que PML (*promyelocytic leukemia*) (90 % des LAP) et PLZF (*promyelocytic leukemia zinc finger*). Dans la fusion Stat5B-Rar α , la partie COOH terminale de Stat5B contenant le domaine de régulation de la transcription et la tyrosine nécessaire à son activation est absente. En revanche, le domaine de liaison à l'ADN de Stat5B ainsi que celui de Rar α sont présents dans la protéine de fusion. La localisation de Stat5B/Rar α est majoritairement nucléaire, un faible pourcentage de la

RÉFÉRENCES

36. Rhodes J, York RD, Tara D, Tajinda K, Drucker BJ. Crkl functions as a nuclear adaptor and transcriptional activator in Bcr/Abl-expressing cells. *Exp Hematol* 2000 ; 28 : 305.
37. De Groot RP, Raaijmakers JA, Lammers JW, Jove R, Koenderman L. STAT5 activation by BCR/Abl contributes to transformation of K562 leukemia cells. *Blood* 1999 ; 94 : 1108.
38. Sillaber C, Gesbert F, Frank DA, Sattler M, Griffin JD. STAT5 activation contributes to growth and viability in Bcr/Abl-transformed cells. *Blood* 2000 ; 95 : 2118.
39. Skorski T, Bellacosa A, Nieborowska-Skorska M, Majewski M, Martinez R, Choi JK, Trotta R, Wlodarski P, Perrotti D, Chan TO, Wasik MA, Tschlis PN, Calabretta B. Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation of a PI-3k/Akt-dependent pathway. *EMBO J* 1997 ; 16 : 6151.
40. Schwaller J, Parganas E, Wang D, Cain D, Aster JC, Williams IR, Lee CK, Gerthner R, Kitamura T, Frantsve J, Anastasiadou E, Loh ML, Levy DE, Ihle JN, Gilliland DG. Stat5 is essential for the myelo- and lymphoproliferative disease induced by TEL/JAK2. *Mol Cell* 2000 ; 6 : 693.
41. Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C, Darnell JE, Jr. Stat3 as an oncogene [published erratum appears in *Cell* 1999 ; 99 : 239]. *Cell* 1999 ; 98 : 295.
42. Kiuchi N, Nakajima K, Ichiba M, Fukada T, Narimatsu M, Mizuno K, Hibi M, Hirano T. STAT3 is required for the gp130-mediated full activation of the c-myc gene. *J Exp Med* 1999 ; 189 : 63.
43. Dumon S, Santos SC, Debierre-Grockieo F, Gouilleux-Gruart V, Cocault L, Boucheron C, Mollat P, Gisselbrecht S, Gouilleux F. IL-3 dependent regulation of Bcl-xL gene expression by STAT5 in a bone marrow derived cell line. *Oncogene* 1999 ; 18 : 4191.

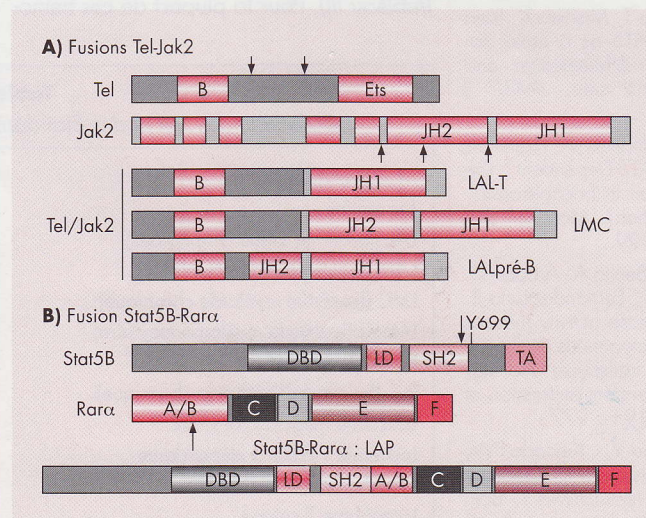


Figure 3. **Les protéines de fusion oncogéniques TEL-Jak2 et Stat5B-Rar α .** A. Structure de Tel et de Jak2. Les domaines B d'oligomérisation et de fixation à l'ADN sont représentés. De même les domaines pseudo-kinase (JH2) et kinase (JH1) de Jak2 sont indiqués. Les flèches indiquent la position des points de fusion des différentes protéines. B. Structure des protéines Stat5B et Rar α . Les différents domaines de Stat décrits dans le texte sont indiqués. Les domaines A/B et F

correspondent aux domaines de transactivation, le domaine C au domaine de liaison à l'ADN, le domaine E au domaine de liaison du ligand de Rar α . Les flèches indiquent les points de fusion dans les deux protéines.

RÉFÉRENCES

44. Fujio Y, Kunisada K, Hirota H, Yamauchi-Takahara K, Kishimoto T. Signals through gp130 upregulate bcl-x gene expression via STAT1-binding cis-element in cardiac myocytes. *J Clin Invest* 1997 ; 99 : 2898.
45. Lord JD, McIntosh BC, Greenberg PD, Nelson BH. The IL-2 receptor promotes lymphocyte proliferation and induction of the c-myc, bcl-2, and bcl-x genes through the trans-activation domain of Stat5. *J Immunol* 2000 ; 164 : 2533.
46. Matsumura I, Kitamura T, Wakao H, Tanaka H, Hashimoto K, Albanese C, Downward J, Pestell RG, Kanakura Y. Transcriptional regulation of the cyclin D1 promoter by STAT5: its involvement in cytokine-dependent growth of hematopoietic cells. *EMBO J* 1999 ; 18 : 1367.
47. Shirogane T, Fukada T, Muller JM, Shima DT, Hibi M, Hirano T. Synergistic roles for Pim-1 and c-Myc in STAT3-mediated cell cycle progression and antiapoptosis. *Immunity* 1999 ; 11 : 709.
48. Nosaka T, Kawashima T, Misawa K, Ikuta K, Mui AL, Kitamura T. STAT5 as a molecular regulator of proliferation, differentiation and apoptosis in hematopoietic cells. *EMBO J* 1999 ; 18 : 4754.
49. De Groot RP, Raaijmakers JA, Lammers JW, Koenderman L. STAT5-Dependent CyclinD1 and bcl-xL expression in bcr-abl-transformed cells [In Process Citation]. *Mol Cell Biol Res Commun* 2000 ; 3 : 299.
50. Horita M, Andreu EJ, Benito A, Arbona C, Sanz C, Benet I, Prosper F, Fernandez-Luna JL. Blockade of the Bcr-Abl kinase activity induces apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells by suppressing signal transducer and activator of transcription 5-dependent expression of Bcl-xL. *J Exp Med* 2000 ; 191 : 977.
51. Oritani K, Tomiyama Y, Kincade PW, Aoyama K, Yokota T, Matsumura I, Kanakura Y, Nakajima K, Hirano T, Matsuzawa Y. Both Stat3-activation and Stat3-independent BCL2 downregulation are important for interleukin-6-induced apoptosis of 1A9-M cells. *Blood* 1999 ; 93 : 1346.

protéine étant exprimé dans le cytoplasme. Le rôle et les mécanismes d'action de cette protéine de fusion dans cette pathologie restent à identifier. Toutefois, comme dans le cas de la fusion PLZF/Rar α , les cellules leucémiques exprimant la fusion Stat5B-Rar α sont insensibles au traitement par l'ATRA (*all trans retinoic acid*). Une des hypothèses retenue pour expliquer cette insensibilité du traitement à l'ATRA et dans les translocations PLZF-Rar α est que PLZF interagit de manière stable avec le co-répresseur N-Cor/SMRT ce qui en conséquence bloquerait l'action de l'ATRA et inhiberait constitutivement l'expression des gènes normalement régulés par le Rar α . Très récemment, l'observation d'une interaction entre Stat5B et N-Cor/SMRT soutient effectivement cette hypothèse et suggère que les propriétés oncogéniques de ces deux protéines de fusion pourraient être similaires.

Activation constitutive des Jak et des Stat

Activation constitutive dans des hémopathies et dans des cellules transformées par des oncogènes

L'activation constitutive des Jak et des Stat a été observée dans des leucémies aiguës et chroniques (LAM, LAL, LMC, LMMC), dans des leucémies induites par le virus HTLV-1, dans des lymphomes B induits par l'EBV et dans des myélomes [23-26] (tableau III). Pour la plupart de ces hémopathies,

l'activation de Jak1, Jak2 et Jak3 et l'activation de Stat1, Stat3, Stat5 et plus rarement Stat6 ont été retrouvées. Les protéines Stat sont ainsi constitutivement phosphorylées sur des résidus tyrosine et interagissent avec les éléments de réponse présents dans les promoteurs de leurs gènes cibles. L'activation constitutive de la voie Jak/Stat a également été mise en évidence dans différentes lignées de cellules hématopoïétiques exprimant soit des oncogènes viraux comme, v-abl, v-src, v-mpl, soit des protéines de fusion oncogéniques caractérisées dans différentes leucémies humaines comme Bcr-Abl, Tel-Abl, Tel-PDGFR β , HIP1/PDGFR β , soit des virus tels que HTLV1 ou la protéine LMP1 du virus EBV [27-29] (tableaux III et IV). Dans la plupart des cas, l'expression de ces oncoprotéines dans des cellules hématopoïétiques dépendantes de facteurs de croissance pour leur prolifération et leur survie est suffisante pour lever cette dépendance [18, 19, 30, 31]. En dehors des cellules hématopoïétiques, l'activation constitutive des Jak et des Stat a été détectée dans des tumeurs solides comme les cancers mammaires, pulmonaires et dans des fibroblastes transformés par les oncogènes v-ros, v-eyk, v-src, v-fps et v-sis (tableau IV). Ainsi, comme dans le cas de cellules hématopoïétiques, l'activation de cette voie pourrait être impliquée de manière plus générale dans l'oncogenèse de différents types cellulaires [27]. Bien que l'activation constitutive des Stat par phosphorylation sur tyrosine n'ait pas été formellement démontrée dans tous les

Tableau III
Activation des Jak et des Stat dans différentes hémopathies malignes

Myélome multiple	Stat1, Stat3
Leucémies	
LAL (leucémie aiguë lymphoïde)	Stat1, Stat5
LAM (leucémie aiguë myéloïde)	Stat1, Stat3, Stat5
LMC (leucémie myéloïde chronique)	Stat1, Stat5
LMMC (leucémie myélomonocytaire)	Stat1, Stat5
Érythroleucémie	Stat1, Stat5
LLC (leucémie lymphoïde chronique)	Stat1, Stat3 (Phosphor. sérine)
Leucémie mégacaryocytaire	Stat5
Leucémie T HTLV-1 dépendante	Stat3, Stat5 ; Jak1, Jak3
Lymphomes	
Lymphome T cutané	Stat3, Stat5 ; Jak3
Lymphome EBV dépendant/Burkitt	Stat1, Stat3 ; Jak3
Lymphome T (mycosis fungoïde)	Stat3

RÉFÉRENCES

52. Shuai K. Modulation of STAT signaling by STAT-interacting proteins. *Oncogene* 2000 ; 19 : 2638.
53. Rosa Santos SC, Dumon S, Mayeux P, Gisselbrecht S, Gouilleux F. Cooperation between STAT5 and phosphatidylinositol 3-kinase in the IL-3-dependent survival of a bone marrow derived cell line. *Oncogene* 2000 ; 19 : 1164.
54. Ozaki K, Oda A, Wakao H, Rhodes J, Druker BJ, Ishida A, Wakui M, Okamoto S, Morita K, Handa M, Komatsu N, Ohashi H, Miyajima A, Ikeda Y. Thrombopoietin induces association of Crkl with STAT5 but not STAT3 in human platelets. *Blood* 1998 ; 92 : 4652.
55. Stancato LF, Yu CR, Petricoin EF 3rd, Lerner AC. Activation of Raf-1 by interferon gamma and oncostatin M requires expression of the Stat1 transcription factor. *J Biol Chem* 1998 ; 273 : 18701.
56. Carroll M, Ohno-Jones S, Tamura S, Buchdunger E, Zimmermann J, Lydon NB, Gilliland DG, Druker BJ. CGP 57148, a tyrosine kinase inhibitor, inhibits the growth of cells expressing BCR-ABL, TEL-ABL, and TEL-PDGFR fusion proteins. *Blood* 1997 ; 90 : 4947.
57. Meydan N, Grunberger T, Dadi H, Shahar M, Arpaia E, Lapidot Z, Leeder JS, Freedman M, Cohen A, Gazit A, Levitzki A, Roifman CM. Inhibition of acute lymphoblastic leukaemia by a Jak-2 inhibitor. *Nature* 1996 ; 379 : 645.
58. Lin TS, Mahajan S, Frank DA. Stat signaling in the pathogenesis and treatment of leukemias. *Oncogene* 2000 ; 19 : 2496.
59. Niu G, Heller R, Catlett-Falcone R, Coppola D, Jaroszeski M, Dalton W, Jove R, Yu H. Gene therapy with dominant-negative Stat3 suppresses growth of the murine melanoma B16 tumor *in vivo*. *Cancer Res* 1999 ; 59 : 5059.
60. Hilton DJ. Negative regulators of cytokine signal transduction. *Cell Mol Life Sci* 1999 ; 55 : 1568.
61. Liu Q, Schwaller J, Kutok J, Cain D, Aster JC, Williams IR, Gilliland DG. Signal transduction and transforming properties of the TEL-TRKC fusions associated with t(12;15)(p13;q25) in congenital fibrosarcoma and acute myelogenous leukemia [In Process Citation]. *EMBO J* 2000 ; 19 : 1827.

Tableau IV
Activation des Stat par différents oncogènes viraux et cellulaires

Cellules hématopoïétiques		
<i>v-abl</i>		<i>Stat1, Stat5, Stat6</i>
<i>v-src</i>		<i>Stat1, Stat3, Stat5</i>
<i>v-mpl</i>		<i>Stat5</i>
<i>Bcr-Abl p190</i>	t(9;22)	<i>Stat1, Stat5, Stat6</i>
<i>Bcr-Abl p210</i>	LAL, LMC	<i>Stat1, Stat5</i>
<i>Tel-Abl</i>	t(9;12)	<i>Stat1, Stat5</i>
	LAL, LAM	
<i>Tel-Jak2</i>	t(9;12)	<i>Stat1, Stat5</i>
	LAL, LMC	
<i>Tel-PDGFRβ</i>	t(5;12)	<i>Stat1, Stat5</i>
		LMMC
<i>HIP1-PDGFRβ</i>	t(5;7)	<i>Stat5</i>
		LMMC
Fibroblastes		
<i>v-src, c-src</i>		<i>Stat3, Stat5</i>
<i>v-eyk, c-eyk</i>		<i>Stat1, Stat3</i>
<i>v-fps (Fes)</i>		<i>Stat3</i>
<i>v-sis</i>		<i>Stat3</i>
<i>v-ros</i>		<i>Stat3</i>

cas de leucémies lymphoïdes chroniques, la phosphorylation constitutive sur le résidu sérine 727 de Stat1 et Stat3 amplifiant leur activité transcriptionnelle a en revanche été détectée dans les cellules de pratiquement tous les patients présentant une LLC [32]. L'importance de cette phosphorylation dans ce cas bien précis n'est pas connue mais pourrait potentialiser l'action des cytokines et favoriser l'émergence très lente d'une population clonale de cellules B malignes caractéristique de ce type de leucémies.

Mécanismes d'activation constitutive des Jak et des Stat dans les cellules transformées par des oncogènes

Les exemples les mieux étudiés à ce jour d'un point de vue mécanistique sont ceux concernant l'activation de la voie Jak/Stat par les oncoprotéines *v-Abl*, *Bcr-Abl* et *v-Src*. Ces études montrent clairement que les mécanismes d'activation des Stat par ces oncogènes sont complètement différents de ceux dépendant des cytokines. Ils reposent sur la structure de ces oncogènes et sur le contexte cellulaire dans lesquelles les expériences ont été réalisées.

Dans le cas des oncoprotéines *Abl*, l'expression de *v-abl* induit l'activation de

Jak1 et *Jak3* de même que celle de *Stat5* et de *Stat6*. Cette activation nécessite l'activité kinase de *v-Abl* et une interaction entre *v-Abl* et les *Jak* faisant intervenir la région COOH-terminale de *v-Abl* [33]. Cette région montre certaines similitudes avec la boîte 1 du domaine cytoplasmique des récepteurs de cytokines qui a été définie comme nécessaire pour l'interaction avec les *Jak*. L'introduction d'une forme inactive de *Jak1* dans les cellules transformées par *v-Abl* abolit l'activation des Stat suggérant ainsi que l'activation des Stat par *v-Abl* est réalisée via *Jak1*. Contrairement à *v-Abl*, l'activation de *Stat1* et de *Stat5* par *Bcr-Abl* ne semble pas nécessiter l'activation des *Jak* bien que l'activation de *Jak1* et *Jak2* ait été retrouvée, dans des cellules transformées par *Bcr-Abl* [34]. Par ailleurs, l'interaction entre *Bcr-Abl* et les *Jak* n'a pas été détectée et l'introduction d'une forme inactive de *Jak2* n'abolit pas l'activation de *Stat5*. En revanche, l'activation de *Stat5* requiert les domaines SH2 et SH3 et l'activité kinase de *Bcr-Abl* [35]. Il est donc possible que l'activation de *Stat5* soit réalisée directement par l'oncoprotéine ou par le biais de protéines intermédiaires. La protéine adaptatrice *Crkl* pourrait être une de ces protéines intermédiaires puisqu'elle interagit avec *Bcr-*

Abl et Stat5 [36]. Si Stat5 est communément activé par les différentes formes connues de Bcr-Abl, comme la p190, p210 et p230, il semble que la p190 permette l'activation de Stat6 (tableau IV). Les raisons de cette activation différentielle ne sont pas connues.

Comme dans le cas des oncoprotéines Abl, différents mécanismes d'activation des Stat par v-Src, ont été décrits. Dans la lignée de cellules myéloïdes 32Dcl3, l'introduction de la forme oncogénique v-Src dans ces cellules suffit pour lever leur dépendance à l'IL-3 pour la prolifération et la survie et bloque la différenciation granulocytaire induite par le G-CSF [30]. L'activation constitutive de Stat1, Stat3, Stat5 est retrouvée dans ces cellules mais pas celle de Jak1 et de Jak2. L'activation de Stat3 résulte de son interaction avec v-Src et requiert les domaines SH2 et SH3 de cette oncoprotéine. Les mécanismes d'activation de Stat1 et de Stat5 dans ce contexte restent encore à déterminer. Il est intéressant de noter dans ces différents exemples que l'activité kinase des Jak n'est pas d'une absolue nécessité pour induire celle des Stat. Ces résultats sont également retrouvés dans le cas de la fusion Tel-PDGFR β . L'activation de Stat1 et de Stat5 dans des cellules exprimant cette protéine de fusion se fait indépendamment de l'activité des Jak et nécessite l'activité kinase du récepteur PDGF. La pertinence de ces différents mécanismes d'activation reste bien évidemment à montrer *in vivo*.

Conséquences biologiques de l'activation constitutive des Jak et des Stat

L'utilisation de formes mutées de Jak et/ou de Stat susceptibles de bloquer l'activité des formes sauvages (dominant négatifs) ou d'agir constitutivement (dominant positifs) a permis d'apprécier leur importance fonctionnelle *in vitro* dans des cellules leucémiques. Ainsi dans le cas des cellules hématopoïétiques exprimant l'oncoprotéine v-Abl, l'introduction d'un mutant dominant négatif de Jak1 inhibe la prolifération cellulaire. Par ailleurs des cellules exprimant un mutant de v-Abl ne possédant plus le domaine d'interaction avec Jak-1 sont peu tumorigènes par rapport à celles exprimant la forme sauvage de v-Abl. L'infection de cellules de moelle osseuse de souris par un rétrovirus bi-cistronique exprimant à la fois le mutant Jak1 inactif et

v-Abl réduit la capacité de v-Abl à transformer ces cellules d'environ 65 %. Donc Jak1 semble jouer un rôle important dans la transformation induite par cet oncogène [33, 34]. En revanche, l'utilisation de souris déficientes en Stat5A et en Stat5B a montré que ces facteurs n'étaient pas indispensables pour la transformation induite par v-Abl *in vivo* [11]. Il est donc possible que des voies de signalisation alternatives activées par cet oncogène et dépendantes ou indépendantes de Jak1 soient susceptibles de compenser la perte fonctionnelle de Stat5 ou dans un autre cas de figure que l'activation de Stat5 ait un rôle accessoire ou plus ou moins amplificateur de l'effet oncogénique de v-Abl.

Dans le cas de Bcr-Abl, la plupart des expériences réalisées *in vitro* montrent que des mutants dominant négatifs de Stat5 bloquent la croissance et la viabilité de différentes cellules hématopoïétiques murines ou humaines exprimant cette protéine de fusion [37, 38]. L'infection de cellules de moelle osseuse de souris par des rétrovirus exprimant le mutant Bcr-Abl SH2-SH3 déficient pour l'activation de Stat5 ou inversement la co-introduction de la forme sauvage de Bcr-Abl avec un dominant négatif de Stat5 ne conduit pas à la transformation de ces cellules soulignant ainsi le rôle crucial de Stat5 dans la transformation induite par Bcr-Abl [35]. Au contraire et de manière surprenante, l'utilisation de souris déficientes en Stat5A/B montre que Stat5 n'est pas indispensable au pouvoir leucémogène de Bcr-Abl *in vivo* [11]. Comme dans le cas de v-Abl, il est tout à fait envisageable que d'autres voies de signalisation activées par Bcr-Abl puissent compenser l'absence de Stat5 dans les souris *stat5a/b*^{-/-}. Par exemple, la voie PI 3-kinase activée par Bcr-Abl joue un rôle important dans le pouvoir leucémogène de cette oncoprotéine [39]. Une autre hypothèse consiste à penser que Stat5 ne joue effectivement qu'un rôle mineur ou amplificateur de la transformation induite par Bcr-Abl. La contradiction apparente des résultats obtenus par ces deux laboratoires reste obscure mais pourrait s'expliquer par l'utilisation de conditions expérimentales distinctes ou de souris génétiquement différentes.

Dans le cas de Tel-Jak2, en revanche, les résultats obtenus *in vivo* montre que Stat5 mais pas Stat1 est essentiel pour les propriétés oncogéniques de cette protéine de fusion [4, 40]. En effet, l'expression d'une

forme constitutivement activée de Stat5 dans des cellules de moelle osseuse est capable d'induire après réimplantation de ces cellules chez la souris et ceci de manière similaire à Tel-Jak2, un syndrome myéloprolifératif rapide et fatal. Par ailleurs, Tel-Jak2 induit des syndromes myéloprolifératifs dans des souris mutantes pour *stat1* mais pas dans des souris *stat5a/b*^{-/-} [40]. Enfin, l'expression de l'oncostatine M, gène cible de Stat5 est également capable d'induire ce syndrome. Il semble donc que l'expression constitutive de l'oncostatine M-dépendante de Stat5 est un des événements mis en place au cours du processus leucémogène induit par Tel-Jak2. L'utilisation de souris *stat5a/b*^{-/-} et de *stat1*^{-/-} permettra également de déterminer dans un proche avenir l'importance fonctionnelle de ces facteurs dans la transformation induite par les oncoprotéines Tel-Abl et Tel-PDGFR β .

Gènes cibles des Stat régulant la prolifération et la survie des cellules hématopoïétiques

L'implication *in vivo* des protéines Stat dans la prolifération et la survie des cellules hématopoïétiques et leur activation constitutive dans les cellules leucémiques ont orienté les recherches vers l'identification de gènes cibles directement ou indirectement régulés par les protéines Stat. Pour cela, différentes approches expérimentales ont été utilisées *in vitro*. L'expression de formes mutées de récepteurs de cytokines incapables d'activer les Stat, de mutants dominant négatifs ou constitutivement activés des Stat dans des lignées de cellules hématopoïétiques ont permis d'identifier des gènes régulés par ces facteurs. Certains de ces gènes sont effectivement impliqués soit dans la régulation du cycle cellulaire soit dans l'inhibition de l'apoptose (tableau V). Ainsi l'expression de la cycline D1, de l'inhibiteur de CDK (*cyclin dependent kinase*), p21^{Waf-1}, des proto-oncogènes *Pim-1* et *c-myc*, du gène anti-apoptotique *Bcl-xL* peuvent être régulés par Stat1, Stat3 et/ou Stat5 [12, 26, 41-48]. Ces gènes contiennent tous dans leur régions régulatrices des sites potentiels d'interaction pour les Stat et des expériences de trans-

Tableau V
Gènes dont l'expression est régulée par les Stat

Survie	
<i>Bcl-xL</i>	Stat1, Stat3, Stat5
<i>A1</i> ?	Stat5
<i>Bcl-2</i> ?	Stat3
Cycle cellulaire	
<i>Cycline A</i> ?	Stat3
<i>Cycline D1</i>	Stat3, Stat5
<i>Cycline D2</i> ?	Stat5
<i>CDK6</i> ?	Stat5
<i>p21^{Waf1/cip1}</i>	Stat1, Stat3, Stat5
Proto-oncogènes	
<i>c-myc</i>	Stat3
<i>pim-1</i>	Stat3, Stat5
Cytokines et récepteurs de cyt.	
<i>Osm</i>	Stat5
<i>CD25</i>	Stat5

Les points d'interrogations indiquent que les mécanismes de la régulation de l'expression des gènes par les Stat ne sont pas connus.

fection ont montré que ces facteurs régulaient l'activité des promoteurs de ces gènes. *Bcl-xL* et la cycline D1 sont surexprimés dans la lignée humaine K562 exprimant Bcr-Abl [49]. La surexpression de *Bcl-xL* a également été retrouvée dans des cellules de leucémie myéloïde chronique et dans des cellules de myélome dans lesquelles une activation constitutive de Stat5 et de Stat3 respectivement a été détectée [26, 50]. Dans ces deux derniers cas, l'inhibition de Stat5 ou de Stat3 par l'expression de mutants dominant négatifs contribue à diminuer l'expression de *Bcl-xL* et à bloquer la croissance des cellules. L'expression de *Bcl-xL* est également induite dans des cellules exprimant des formes constitutivement activées de Stat3 et de Stat5 [26, 41, 47]. Ces données indiquent que Stat5 et Stat3 en régulant l'expression de *Bcl-xL* et/ou de la cycline D1 pourraient conférer un avantage prolifératif indépendant de l'action de cytokines dans des cellules leucémiques ou transformées par des oncogènes. D'autres gènes dont l'expression est susceptible d'être modulée par Stat3 tels que la cycline A ou *Bcl-2* ou dans le cas de Stat5, la cycline D2, la cycline D3, *CDK6* et le gène anti-apoptotique *A1* ont été mis en évidence *in vitro* et *in vivo* [8, 10, 51]. Toutefois, la présence d'éléments Stat fonctionnels dans les régions régulatrices

de ces gènes n'a pas encore été démontrée. Il est possible que ces promoteurs contiennent des sites Stat composites différents des sites Stat classiques et faisant intervenir l'interaction de Stat monomériques ou dimériques avec d'autres facteurs de transcription. Les données sur l'interaction potentielle des Stat avec d'autres facteurs de transcription sont en pleine expansion. Des interactions avec NF κ B, avec le récepteur des glucocorticoïdes (GR), avec le facteur IRF-1 ou certains membres de la famille Ets et bien d'autres protéines régulatrices ont en effet été décrites dans les études publiées [52]. Il est également possible que la régulation de l'expression de ces gènes soit réalisée de manière indirecte par le biais d'autres voies de signalisation. En effet, en dehors de leur rôle dans la transcription, les Stat sont également des molécules interagissant directement ou indirectement avec des protéines impliquées dans l'activité ou l'activation de voies de signalisation comme par exemple Crkl, la PI 3-kinase, c-raf. Le rôle physiologique de ces interactions reste toutefois à déterminer [53-55].

La voie Jak/Stat, cible d'une thérapie anti-cancéreuse

La dérégulation de la voie Jak/Stat et les conséquences de cette dérégulation sur la prolifération et la survie des cellules leucémiques suggèrent que cette voie pourrait être la cible de molécules anti-tumorales. L'inhibition de l'activité des Jak et des Stat contribuerait ainsi à éliminer l'impact de ces facteurs sur la survie et la prolifération ou dans certains cas de leucémies résistantes au traitement par chimiothérapie classique à potentialiser l'action d'agents cliniquement utilisés pour induire l'apoptose des cellules tumorales. Par exemple, une étude récente a montré que l'expression d'une forme dominante négative de Stat5 dans des cellules exprimant Bcr-Abl sensibilisait ces cellules à des agents cytotoxiques comme l'hydroxyurée et la cytarabine [38]. Concernant le développement d'inhibiteur de la voie Jak/Stat, plusieurs niveaux d'intervention sont possibles. L'activation des Stat passant par leur phosphorylation sur tyrosine, il est envisageable d'inhiber

spécifiquement les tyrosine kinases qui les activent. Ainsi l'inhibiteur CGP57148B ou STI571 bloque l'activité kinase des oncoprotéines Tel-ABL, BCR-Abl et Tel-PDGFR β et la croissance des cellules exprimant ces protéines de fusion [56]. Cet inhibiteur dans des cellules de LMC est en effet capable de bloquer l'activation de Stat5, l'expression du gène *Bcl-xL*, la prolifération et la survie de ces cellules leucémiques [50]. De même l'activation de Stat1 et de Stat5 est également inhibée par ce composé dans des cellules exprimant TEL-PDGFR β . Le STI571 fait actuellement l'objet d'essais cliniques dans le traitement des LMC et les résultats obtenus semblent être très prometteurs. D'autres molécules comme l'inhibiteur de tyrosine kinase AG490 diminuent l'activité de Jak2 dans des cellules leucémiques issues d'une LAL et inhibent leur prolifération *in vivo* sans conséquence apparente sur l'hématopoïèse normale [57]. Dans des cellules de myélome dépendantes d'IL-6 pour leur prolifération et survie, cet inhibiteur bloque l'activation des Jak et de Stat3 réprimant ainsi l'expression de *Bcl-xL*, la prolifération et la survie de ces cellules [26]. En dehors des tyrosine kinases, l'inhibition de sérine/thréonine kinases impliquées dans la phosphorylation des Stat peut être une approche prometteuse dans les cas de traitement des LLC où une phosphorylation constitutive du résidu sérine 727 de Stat1 et Stat3 a été observée. Cette stratégie est confortée par le fait que la surexpression d'un mutant de Stat3 dont le résidu sérine 727 a été modifié, inhibe la transformation de fibroblastes induite par l'oncoprotéine v-Src [58]. Enfin des méthodes plus directes susceptibles de modifier l'expression des Stat, leur dimérisation, leur activité de liaison à l'ADN ou leur activité transcriptionnelle sont également envisageables. L'application de la thérapie génique au traitement des cancers bien que balbutiante reste une méthode attrayante pour cibler et inhiber spécifiquement des molécules telles que les Stat. Ainsi une étude récente a montré qu'on peut obtenir la régression d'une tumeur établie expérimentalement chez la souris à partir de cellules de mélanome, après injection intra-tumorale d'un vecteur d'expression d'une forme dominante négative de Stat3. Cette régression tumorale est liée à une apoptose massive des cellules cancéreuses [59]. Ces données montrent donc

que Stat3, dans ce contexte, peut être une cible moléculaire d'une thérapie anti-tumorale.

L'activation constitutive des Stat dans des hémopathies peut résulter d'une absence de signaux permettant de remettre au repos la voie Jak/Stat. Plusieurs mécanismes de régulation négative ont été mis en évidence ces dernières années. Ils font intervenir des tyrosine phosphatases telles que SHP-1, les membres de la famille Cis/Socs et les protéines de la famille PIAS qui bloquent l'activité transcriptionnelle des Stat [60]. La compréhension des mécanismes d'action de ces protéines qui restent encore mal définis représente également un intérêt dans le développement de nouvelles molécules mimétiques susceptibles d'être utilisées dans le cadre d'une thérapie anti-cancéreuse.

Conclusion

Au cours de ces dernières années, de nombreuses données de la littérature ont montré que l'activation inappropriée des Jak et des Stat *in vitro* et *in vivo* contribue à la leucémogénèse et plus généralement à l'oncogénèse. Bien que les données *in vivo* sur l'importance fonctionnelle des Stat dans la transformation restent encore fragmentaires, le croisement entre des souris mutantes pour les gènes des Stat et des souris transgéniques exprimant différentes oncoprotéines permettra dans un futur très proche d'avoir une vision globale de cette importance. Bien évidemment, il est très probable que l'activation constitutive des Stat détectée dans des hémopathies

ou d'autres types de cancers se superpose à l'activation d'autres voies de signalisation susceptibles d'être elle-mêmes impliquées dans la transformation cellulaire. Ainsi l'activation de la PI 3-kinase semble jouer un rôle important dans la transformation induite par Bcr-Abl [39]. Par ailleurs, la protéine de fusion oncogénique Tel-TRKC résultant de la translocation chromosomique humaine t(12;15) associée à un fibrosarcome ou à une leucémie aiguë myéloïde, est capable d'induire la prolifération des cellules hématopoïétiques indépendamment de la présence de cytokine sans activer les protéines Stat [61]. Ces données indiquent que l'activation des Stat même si leur contribution ne peut être complètement écartée est soit insuffisante voire non nécessaire au pouvoir leucémogène de certaines oncoprotéines. Dans tous les cas, le développement de méthodes d'analyse du statut d'activation des Jak et des Stat dans des hémopathies malignes (phosphorylation sur tyrosine ou serine) semble être prometteur que cela soit dans une perspective future de diagnostic ou de pronostic ou dans le choix de molécules à usage thérapeutique ■

Remerciements

Je remercie S. Gisselbrecht, I. Dusanter et V. Gouilleux-Gruart pour leur lecture critique de cet article.

Summary

The Jak/Stat signaling pathway in leukemogenesis

Cytokine signaling through the Jak/Stat pathway has been shown to play a crucial role in hematopoietic cell proliferation, survival and differentiation. In addition constitutive activity of the Jak/Stat pathway has been described in cells from leukemic patients or in hematopoietic cells transformed by various viral or cellular oncogenes indicating that inappropriate activation of this pathway could be one of the events that contribute to leukemogenesis. Constitutive activity of the Jak/Stat pathway may result from the expression of oncogenic fusion proteins involving the Jak2 or Stat5B described in different types of leukemia or through the activity of viral or cellular oncogenes. Genetic manipulations of the *jak* and *stat* genes *in vitro* and *in vivo* have shown that both proteins regulate expression of genes involved in cell survival and cell cycle. The aim of this review is to summarize the current knowledge on the role of this signaling pathway in hematopoiesis and leukemogenesis. Mice with inactivated *jak* and *stat* genes are now available and will be helpful in the future to determine the functional importance of this pathway in cell transformation.

TIRÉS À PART

F. Gouilleux.
<gouilleux@cochin.inserm.fr>