

Récentes avancées dans la compréhension de la voie de signalisation du TGF- β par les Smad

La superfamille du *transforming growth factor- β* (TGF- β) comprend un grand nombre de facteurs de croissance, incluant les TGF- β , les activines et les BMP (*bone morphogenic proteins*), ainsi que leur contrepartie drosophilienne, *decapentaplegic* (dpp). Les membres de la famille du TGF- β transmettent leur signaux en contactant simultanément deux sérine/thréonine kinases transmembranaires appelées récepteurs de type I et de type II (TBRI et TBRII). L'identification récente des protéines de la famille Smad, agissant directement en aval de ces récepteurs, permet de comprendre certaines des étapes moléculaires qui conduisent à une réponse biologique spécifique (*m/s* 1997, n° 10, p. 1197) [1, 2].

Toutes les Smad présentent des régions carboxy- et amino-terminales très conservées, appelées MH1 et MH2, connectées par une région centrale variable, riche en sérine, thréonine et proline. Même si les mécanismes contrôlant la compartimentalisation des Smad ne sont pas encore totalement élucidés, il apparaît clairement que ces protéines peuvent fonctionner comme médiateurs de signaux du TGF- β depuis la membrane plasmique jusqu'au noyau. Les Smad associées aux TBR, tels que Smad1, Smad2, Smad3 et Smad5, sont directement phosphorylés par le TBRI activé. Ces Smad sont spécifiques du ligand et forment, après phosphorylation, un complexe hétérodimérique avec Smad4. Ce dernier semble être un médiateur commun à toutes les Smad et fait partie du groupe des co-Smad (qui comprend aussi sa contrepartie drosophilienne

Medea). Il est actuellement admis que les complexes hétérodimériques comprenant Smad4 subissent une translocation nucléaire rapide et fonctionnent comme facteurs de transcription. Ils peuvent en effet s'accrocher à l'ADN, soit directement, soit grâce à une protéine accessoire de la famille des Fast [1, 2], et induire une réponse transcriptionnelle. Les membres du troisième groupe, appelés Smad inhibiteurs, tels que Smad6 et Smad7, peuvent empêcher la phosphorylation ou la translocation des complexes Smad transactivateurs (*m/s* 1998, n° 1, p. 101).

Le TGF- β est impliqué dans de nombreux aspects de la pathologie humaine, depuis les fibroses tissulaires jusqu'à l'invasion tumorale. Ainsi, le TGF- β stimule la déposition de matrice extracellulaire, joue un rôle actif dans le recrutement des cellules conjonctives et leur prolifération, ainsi que dans l'angiogenèse. Il accélère la cicatrisation normale et pourrait également corriger les anomalies de la cicatrisation. La production continue de TGF- β conduit au développement de fibroses tissulaires, caractérisées par une accumulation excessive de matrice conjonctive dans les tissus concernés. L'inactivation des TBR dans certains cancers indique que le TGF- β joue un rôle important dans la genèse de nombreuses tumeurs malignes chez l'homme [3]. Dans les lignées malignes ne présentant pas de TBR actifs, la restauration de l'expression de récepteurs intacts annule le phénotype transformé. Cela suggère que les ligands de la famille du TGF- β , ou les éléments de la cascade de signalisation en aval, fonctionnent comme

des suppresseurs de tumeurs [3]. Dans ce contexte, il faut noter que Smad4 est délété ou muté dans 50 % des carcinomes pancréatiques, d'où son autre dénomination, DPC4 (*depleted in pancreatic cancer*) (*m/s* 1997, n° 10, p. 1197). Des mutations rendant impossible la phosphorylation de Smad2 par TBRI ont été détectées dans des cancers colorectaux. Ces résultats sont à corrélés au fait que le TGF- β est un inhibiteur de la prolifération cellulaire pour la plupart des cellules normales, et que de nombreuses lignées transformées ont une réponse au TGF- β fortement atténuée [3]. Dès lors, le TGF- β représente une cible potentielle pour des stratégies thérapeutiques, à la fois dans le contexte des maladies affectant le tissu conjonctif et dans la prévention des cancers. L'identification de gènes cibles du TGF- β et la compréhension de la machinerie transcriptionnelle impliquée dans la transmission du signal par les récepteurs du TGF- β représentent donc un énorme potentiel clinique associé à la possibilité d'altérer l'action du TGF- β *in vivo*.

Bien que de nombreux travaux aient permis des avancées considérables dans la compréhension du fonctionnement des Smad en tant que facteurs de transcription, l'essentiel des approches expérimentales est centré sur la surexpression de tel ou tel Smad ou protéine accessoire, dans le cadre de la transactivation d'un promoteur artificiel tel que 3TPLux. Le site d'activation de ce vecteur « type » par les Smad est un doublet de sites AP-1 [4] qui ne correspond pas forcément à un élément de réponse naturel au TGF- β .

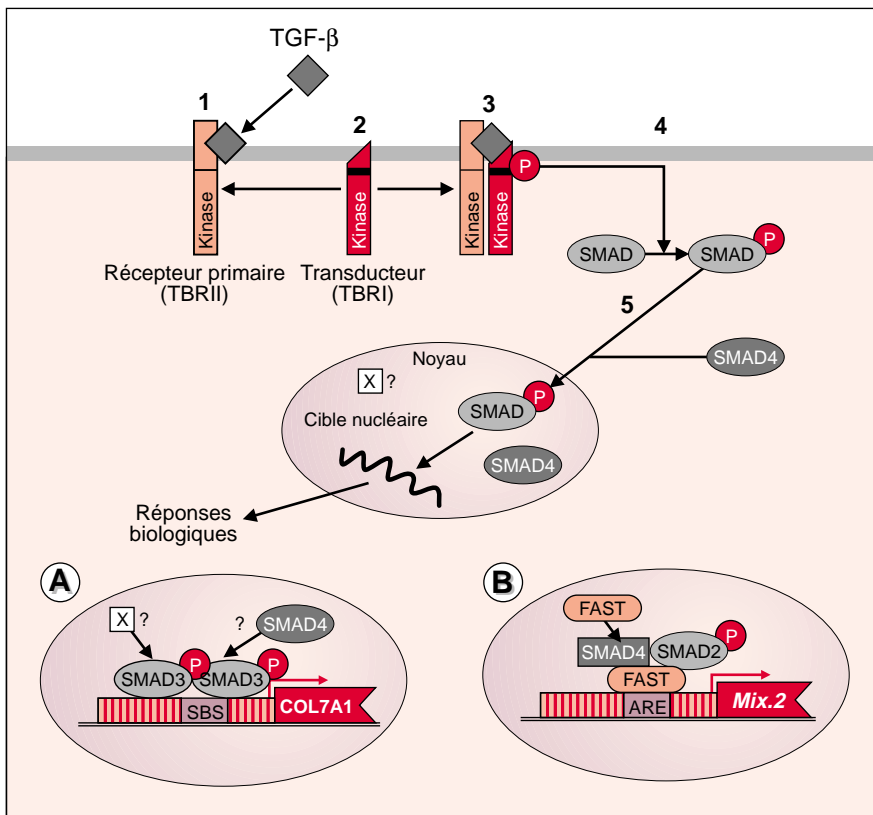


Figure 1. **Transmission du signal TGF-β.** Les membres de la famille du TGF-β transmettent leur signaux en contactant simultanément deux récepteurs à activité sérine/thréonine kinase (TBRI et TBR1) (1-3). Le signal est transmis en aval par les protéines Smad (4); certaines sont phosphorylées par le récepteur activé (Smad1, 2, 3 et 5). Elles sont spécifiques du ligand et forment un complexe avec Smad4, complexe qui est transloqué dans le noyau où il va activer la transcription des gènes cibles de TGF-β (5). **A.** activation du gène COL7A1. Le promoteur du gène COL7A1 contient une séquence qui lie une protéine Smad et active ainsi la transcription du gène. Pour le moment, seule Smad3 (et non Smad4) a été identifiée dans le complexe liant la SBS (Smad binding sequence). **B.** activation du gène Mix.2 du xénope par l'activine. Il se forme un complexe ternaire comprenant Smad2 phosphorylée, Smad4 et Fast1 qui se lie à l'ARE (activine response element) du promoteur [3].

Notre exploration systématique par délétion en 5' des régions régulatrices (promoteurs) de plusieurs gènes liés à la matrice conjonctive et connus pour être modulés par le TGF-β, nous a permis de découvrir une séquence qui accroche un Smad (*Smad binding sequence*, SBS), responsable de l'activation du gène du collagène de type VII (COL7A1) par le TGF-β [5]. Cette SBS, dans laquelle nous avons identifié une répétition du motif CAGA ainsi qu'un motif similaire au site de liaison de Smad sur le gène *vestigial* de la drosophile, fut la première décrite dans un gène humain. Depuis, des séquences accrochant Smad et conte-

nant également le motif CAGA ont été décrites dans les promoteurs des gènes du PAI (*plasminogen activator inhibitor-1*) [6] et de Jun-B [7]. L'association d'un complexe contenant Smad à la SBS de COL7A1 requiert sa phosphorylation. Un tandem de SBS confère la réponse au TGF-β à un promoteur hétérologue normalement insensible au facteur. L'activité transcriptionnelle *via* la SBS n'est pas possible dans des cellules *Smad4*^{-/-} (lignée d'adénocarcinome de poumon MDA-MB-464) mais elle peut être restaurée par un vecteur d'expression de Smad4 [8]. A l'aide de vecteurs d'expression de Smad

marqués, nous avons déterminé qu'un complexe, dont la migration est similaire à celle du complexe induit par le TGF-β dans les fibroblastes, se formait dans les cellules COS-1 transfectées avec un vecteur d'expression de *Smad3*, mais pas avec des vecteurs exprimant d'autres *Smad*. Ainsi, nous n'avons pas pu identifier Smad4, mais seulement Smad3, dans le complexe qui se forme avec le SBS de COL7A1 sous l'effet du TGF-β. La co-expression de Smad3 et Smad4 dans les cellules COS-1 conduit à la formation d'un autre complexe qui contient à la fois Smad3 et Smad4 mais a une mobilité réduite par rapport au complexe Smad/ADN induit par le TGF-β dans les fibroblastes [8]; sa signification physiologique est donc discutable puisqu'il n'apparaît que dans des expériences de surexpression et en aucun cas sous l'effet du TGF-β. Ces découvertes tempèrent les conclusions de beaucoup des résultats publiés au cours de ces trois dernières années à l'aide de systèmes complexes de surexpression de Smad et impliquant Smad4 comme un élément incontournable pour la formation de complexes Smad/ADN. Nos résultats sont renforcés par la récente démonstration de l'existence d'homodimères de Smad3 *in vivo* [9].

Une production accrue de TGF-β couplée à la résistance à ses effets inhibiteurs sur la croissance cellulaire sont la caractéristique de nombreux types de néoplasmes, y compris les mélanomes. Dans certaines tumeurs épithéliales, l'absence d'inhibition de la croissance cellulaire par le TGF-β est associée à une interruption de la transcription liée à la voie de transmission du signal par les Smad. Récemment, grâce aux outils spécifiques développés dans notre groupe à partir du SBS du COL7A1, nous avons montré que la cascade des Smad est intacte dans les mélanomes humains, primaires ou métastatiques, et qu'il n'existe pas de corrélation entre l'activité transcriptionnelle liée aux Smad et le degré d'inhibition de la prolifération induit par le TGF-β [10]. Nous avons également révélé l'existence d'une activation constitutive de la voie des Smad, due en partie à la sécrétion autocrine de TGF-β par les cellules de mélanome. Ces résultats indiquent que la

résistance des mélanomes à l'inhibition de prolifération par le TGF- β se produit de façon indépendante de la voie des TBR/Smad, intacte dans ces cellules. Ils suggèrent également que le TGF- β produit par les mélanomes peut engendrer une activité transcriptionnelle sur les gènes cibles des Smad [10].

L'analyse des mécanismes d'activation génique par la voie des Smad dans des contextes physiologiques devrait conduire à une meilleure compréhension des processus pathologiques impliquant des Smad, qu'il s'agisse des phénomènes de fibrose tissulaire ou de la progression tumorale ■

RÉFÉRENCES

1. Massagué J. TGF- β signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 753-91.
2. Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through Smad proteins. *Nature* 1997; 390: 465-71.
3. Markowitz SD, Roberts AB. Tumor suppressor activity of the TGF- β pathway in human cancers. *Cytokine Growth Factor Rev* 1996; 7: 93-102.
4. Yingling JM, Datto MB, Wong C, Frederick JP, Liberati NT, Wang XF. Tumor suppressor Smad4 is a TGF- β -inducible DNA binding protein. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 7019-28.
5. Vindevoghel L, Kon A, Lechleider RJ, Uitto J, Roberts AB, Mauviel A. Smad-dependent transcriptional activation of human type VII collagen gene (COL7A1) promoter by TGF- β . *J Biol Chem* 1998; 273: 13053-7.
6. Dennler S, Itoh S, Vivien D, ten Dijke P, Huet S, Gauthier JM. Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF- β -inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *EMBO J* 1998; 17: 3091-100.
7. Jonk LJ, Itoh S, Heldin CH, ten Dijke P, Kruijer W. Identification and functional characterization of a Smad binding element (SBE) in the JunB promoter that acts as a transforming growth factor- β , activin, and bone morphogenetic protein-inducible enhancer. *J Biol Chem* 1998; 273: 21145-52.
8. Vindevoghel L, Lechleider RJ, Kon A, de Caestecker MP, Uitto J, Roberts AB, Mauviel A. Smad3/4-dependent transcriptional activation of the human type VII collagen gene (COL7A1) promoter by TGF- β . *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 14769-74.
9. Kawabata M, Inoue H, Hanyu A, Imamura T, Miyazono K. Smad proteins exist as monomers *in vivo* and undergo homo- and hetero-oligomerization upon activation by serine/threonine kinase receptors. *EMBO J* 1998; 17: 4056-65.
10. Rodeck U, Nishiyama T, Mauviel A. Independent regulation of growth and SMAD-mediated transcription by transforming growth factor beta in human melanoma cells. *Cancer Res* 1999; 59: 547-50.

Alain Mauviel

Institut de recherche sur la peau, Inserm U. 312, Hôpital Saint-Louis, 1, avenue Claude-Vellefaux, 75475 Paris Cedex 10, France.
e-mail: mauviel@chu-stlouis.fr

TIRÉS À PART

A. Mauviel.



Enseignement organisé dans le cadre de la Faculté de Médecine Paris-Sud, et de l'Université Paris XI.

- **Début** : 3 novembre 1999
- **Enseignement de 2 ans à temps plein**, destiné aux jeunes oncologues diplômés, titulaires par ailleurs d'un DEA ou équivalent, et désireux de recevoir un enseignement de haut niveau en recherche clinique en cancérologie. Ouvert aux spécialistes, Docteurs en médecine, Oncologues médicaux et pédiatres, Chirurgiens, Radiothérapeutes, Radiologues, Pathologistes, Biologistes, Statisticiens, etc., et aux Docteurs en Pharmacie.
- **De toutes nationalités**, mais une très bonne connaissance du français et de l'anglais est indispensable. Cours en Français, certains exposés et mémoires pourront être présentés en Anglais.
- **Une formation approfondie** dans le domaine de la recherche clinique en cancérologie est offerte, comportant un enseignement théorique, et des stages cliniques ou de laboratoire.
- > **Fonctions effectives avec responsabilités pendant 2 ans à plein temps**, dans sa spécialité d'origine, et 6 mois au minimum dans une autre, à l'institut Gustave-ROUSSY. Option : 1 année sur les 2 consacrée à un travail personnel dans un laboratoire de recherche de l'IGR.
- > **Enseignement théorique, obligatoire et commun à tous, de 340 heures en 2 ans. Il comporte : 8 modules de 5 jours** (cours, discussions de dossiers, de documents ou de techniques, avec forte participation des élèves), les uns généraux, les autres spécialisés : 1 enseignement de statistiques, épidémiologie et santé publique réparti sur les 2 ans ; 1 séminaire de 2 à 3 h tous les 15 jours sur un sujet limité.
- > **Travail personnel de recherche clinique ou biologique** aboutissant en 2 ans à la rédaction et la soutenance de 1 ou 2 mémoires.
- > **Formation individualisée**, reposant sur un encadrement très proche : tuteur, directeur de stage et de mémoire.
- **L'attribution du Diplôme** fait suite à une évaluation finale portant sur les notes des examens suivant chaque module, l'évaluation des mémoires, l'avis du « tuteur » de chaque étudiant et celui des responsables de ses stages.
- **Les promotions sont limitées à 15 élèves chaque année.**
- **Les candidats pourront éventuellement bénéficier d'une bourse ou d'un salaire** de 2000 Euros par mois pour leur première année (# 2 350 \$ US). Ils sont invités à se procurer une bourse pour la 2^e année.

Renseignements et dossier de candidature à demander à Mme Anne-Marie RIVIÈRE par courrier ou E-mail : arivière@igr.fr.

Candidatures par écrit avant le 1^{er} avril 1999, adressées au Professeur Jean LEMERLE, Directeur du D.U.E.R.C.C. (E-mail : lemerle@igr.fr.)

ou au Professeur Martin SCHLUMBERGER, Directeur des Études

(E-mail : schlumbg@igr.fr) - INSTITUT GUSTAVE-ROUSSY, 94805 VILLEJUIF (France)