

## Les protéines Smad et TGF $\beta$ : l'heure est à l'intégration...

Les membres de la superfamille du TGF $\beta$  (TGF $\beta$ 1 et les isoformes TGF $\beta$ 2 et TGF $\beta$ 3, activines et BMP, *bone morphogenic protein*) jouent un rôle très important dans les communications intercellulaires. Le TGF $\beta$ , en particulier, est une des cytokines les plus étudiées en raison de ses effets dans plusieurs processus biologiques tels que la régulation du cycle cellulaire, la formation de la matrice extracellulaire, la réponse immunitaire ou le développement embryonnaire. La dérégulation de la transduction du signal du TGF $\beta$  conduit à différentes maladies incluant des fibroses tissulaires et est associée à divers cancers. Les protéines Smad sont les médiateurs intracellulaires de la voie du TGF $\beta$  et des autres membres de la superfamille du TGF $\beta$  (*m/s* 1999, n° 4, p. 535 et 1999, n° 8/9, p. 1041). En présence de TGF $\beta$ , des sérines situées dans la partie carboxyterminale de Smad2 et Smad3 sont directement phosphorylées par T $\beta$ RI, le récepteur membranaire du TGF $\beta$  de type I. Une fois phosphorylées, Smad2 et Smad3 peuvent former des hétéro-oligomères avec le facteur Smad4 et migrer dans le noyau où elles règlent la transcription de gènes cibles [1]. Ainsi, Smad3 est un facteur de transcription qui reconnaît spécifiquement et directement une séquence d'ADN appelée boîte CAGA, présente dans les promoteurs de gènes cibles induits par le TGF $\beta$  comme PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor*), le collagène VII (*m/s* 1999, n° 4, p. 535), c-Jun ou JunB. Il existe enfin des Smad inhibiteurs de la transduction du signal du TGF- $\beta$ , comme Smad7 qui, en bloquant la phosphorylation de Smad2 et Smad3 par le T $\beta$ RI, empêche la translocat

tion nucléaire de Smad2 et Smad3 et donc leurs effets transcriptionnels. Jusqu'ici, les protéines Smad s'intègrent dans un schéma relativement simple contrôlé uniquement par le TGF $\beta$ . Cependant, des rapports récents indiquent que la voie des Smad est réglée par d'autres signaux que ceux provenant du TGF $\beta$ . D'autres travaux montrent également que les Smad interagissent avec des facteurs qui ne sont pas connus pour dépendre du TGF $\beta$ .

Peu de temps après l'identification des protéines Smad comme médiateurs intracellulaires des voies de TGF $\beta$ /activines/BMP, il avait été montré que Smad2 pouvait agir comme co-activateur transcriptionnel. Dans le cas du promoteur *Mix2* chez le xénope, en présence d'activine, Smad2 interagit avec le facteur de transcription FAST-1 qui se fixe directement sur une séquence d'ADN consensus de réponse aux activines [2]. De même, Smad2 peut interagir avec le facteur de transcription FAST-2 fixé sur un élément de réponse aux activines du promoteur *goosecoid* de la souris [3]. Dans ces deux cas, Smad2 n'est pas capable de reconnaître directement une séquence d'ADN, mais est indirectement ciblé sur le promoteur activé du fait de son interaction avec un facteur de transcription de la famille FAST. Smad2 peut alors recruter Smad4 et former un complexe FAST/Smad2/Smad4 activant la transcription. Plusieurs exemples récents montrent que ce mode d'activation est plus général et que les protéines Smad agissent comme co-activateurs en établissant des interactions fonctionnelles spécifiques avec d'autres facteurs de transcription tels

que Sp1, c-Jun ou VDR (*vitamin D receptor*). Par exemple, de telles interactions peuvent en partie expliquer les effets antiprolifératifs du TGF $\beta$  sur certaines cellules comme les hépatocytes. En effet, le TGF $\beta$  est connu pour activer la transcription du promoteur de l'inhibiteur du cycle cellulaire p21. Or, il ne semble pas exister de séquence de type CAGA qui permettent aux Smad de se fixer directement sur le promoteur p21. En revanche, ce promoteur contient plusieurs sites pour le facteur de transcription Sp1 avec lequel Smad3 peut spécifiquement interagir de manière fonctionnelle [4]. En présence de TGF $\beta$ , Sp1 permet alors de recruter un complexe Smad3/Smad4 qui, transloqué dans le noyau, co-active le promoteur p21. Smad3 est aussi capable d'interagir directement avec l'oncoprotéine c-Jun qui forme avec c-Fos le facteur de transcription AP-1 [5]. Cette interaction dépend de la présence de TGF $\beta$  dans le milieu et permet une coopération entre Smad3/Smad4 et c-Jun/c-Fos sur le site AP-1 du promoteur de la collagénase I. Cela suggère que les voies de transduction MAP kinases et Jun kinases peuvent converger avec la voie TGF $\beta$  sur les sites AP-1 de certains promoteurs qui intègrent alors ces différents signaux. Enfin, un dernier exemple montre que Smad3 est capable d'augmenter l'activité transcriptionnelle de VDR qui se fixe sur les éléments de réponse à la vitamine D contenus dans certains promoteurs [6]. Cette interaction est spécifique puisque Smad3 n'augmente pas l'activité transcriptionnelle des autres récepteurs hormonaux nucléaires (œstrogènes, androgènes, glucocorticoïdes,

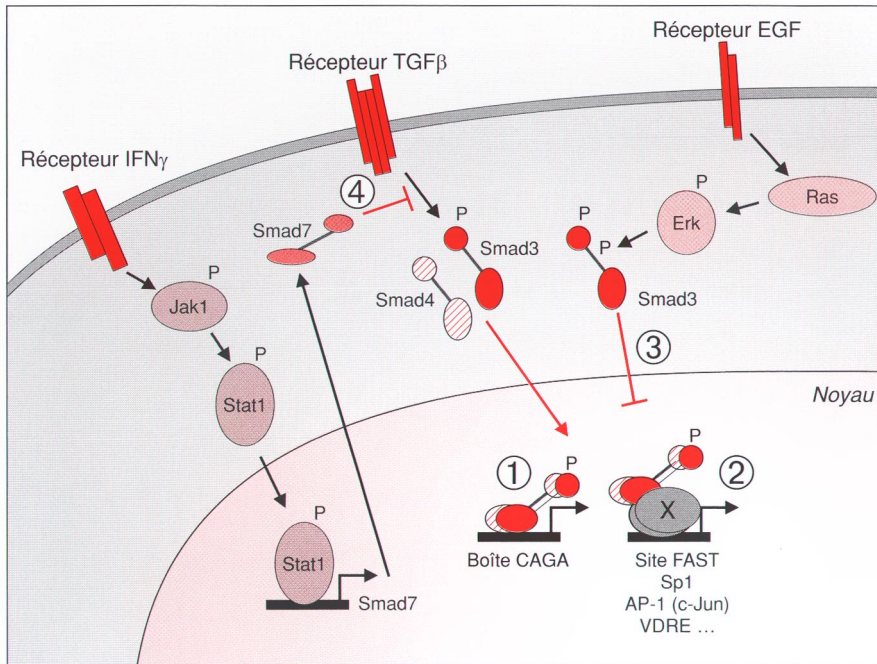


Figure 1. **Intégration de la voie Smad/TGF- $\beta$  aux autres voies de transduction de signaux.** Les protéines Smad2 ou Smad3 (seule Smad3 est représentée), après leur phosphorylation par le récepteur du TGF $\beta$  activé, s'associent avec Smad4 pour migrer dans le noyau où elles règlent la transcription de gènes cibles. Smad3 peut agir comme un facteur de transcription classique en se fixant directement à une boîte CAGA. Mais les Smad peuvent aussi servir de co-activateurs pour d'autres facteurs de transcription comme Sp1, c-Jun ou VDR. L'activation de la voie MAP kinase par l'EGF aboutit à une phosphorylation de Smad3 ou Smad2 dans le domaine linker et inhibe la translocation nucléaire des Smad. De même, l'activation de la voie interféron- $\gamma$  antagonise les effets transcriptionnels du TGF $\beta$ . En effet, Stat1 active la transcription de Smad7. Ce dernier inhibe la phosphorylation de Smad2 et Smad3 par le récepteur du TGF $\beta$ .

acide rétinolique). La partie aminoterminal de Smad3 est, en effet, capable d'interagir directement avec VDR aboutissant à la formation d'un complexe transcriptionnel stable entre VDR, Smad3 et SRC-1 (co-activateur des récepteurs stéroïdiens). Ainsi, Smad3 agit comme un véritable co-activateur du VDR, donc, là encore, fait converger les voies du signal du TGF $\beta$  et de la vitamine D au niveau transcriptionnel. Les Smad règlent donc la transcription en réponse au TGF $\beta$  en agissant soit comme des facteurs de transcription classiques se fixant directement sur des séquences spécifiques comme la boîte CAGA, soit comme des co-activateurs pour des facteurs de transcription réglés par une voie distincte, qui les ciblent sur des promoteurs ne contenant pas de boîte CAGA. Ces

caractéristiques des Smad permettent sans nul doute au TGF $\beta$  de moduler la transcription de nombreux gènes, insistant ainsi sur les effets pléiotropiques de cette cytokine. L'ouverture de la voie Smad/TGF $\beta$  aux autres voies de transduction du signal ne s'arrête pas là. En effet, des travaux montrent que le devenir des Smad dans la cellule n'est pas contrôlé uniquement par le TGF $\beta$ . Il est connu que le TGF $\beta$  inhibe la prolifération de cellules épithéliales alors que l'EGF (*epithelial growth factor*), en activant la voie des MAP kinases, induit la prolifération de ces cellules. Des études récentes expliquent en partie cet antagonisme [7]. L'accumulation nucléaire des protéines Smad2 et Smad3, en présence de TGF $\beta$ , peut être inhibée par un mutant constitutivement suractivé de

la protéine Ras trouvé dans des cellules épithéliales cancéreuses. En fait, selon une cascade bien connue, l'activation de la voie des MAP kinases par l'EGF ou par le mutant de Ras conduit à l'activation des protéines MAP kinases Erk. Celles-ci peuvent alors phosphoryler les protéines Smad2 et Smad3 dans leur domaine linker, sur des résidus différents de ceux phosphorylés par le récepteur du TGF $\beta$  (T $\beta$ RI). Cette phosphorylation dans le domaine linker empêche la translocation nucléaire des Smad, et par conséquent leurs effets transcriptionnels. Ainsi, dans ces cellules épithéliales, selon le niveau d'activation de la voie TGF $\beta$  ou de la voie des MAP kinases, les protéines Smad2 et Smad3 s'accumulent ou non dans le noyau. Dans des cellules normales, Smad2 et Smad3 intègrent donc les effets antagonistes de la voie TGF $\beta$  et de la voie Ras/MAP kinases, conduisant à un blocage ou à une reprise du cycle cellulaire. De manière intéressante, dans les cellules cancéreuses dans lesquelles le TGF $\beta$  n'est plus capable de bloquer la prolifération, Smad2 et Smad3 sont phosphorylées de façon permanente dans leur domaine linker en raison de la présence du mutant suractivé de Ras. Ainsi sequestrées dans le cytoplasme, Smad2 et Smad3 ne peuvent engager le programme transcriptionnel menant à l'arrêt de la prolifération. Un autre exemple d'antagonisme faisant intervenir un mécanisme différent vient d'être décrit. Il est en effet établi que le TGF $\beta$  et l'IFN- $\gamma$  ont des effets opposés sur diverses fonctions cellulaires. Par exemple, le TGF $\beta$  inhibe les réponses inflammatoires et immunitaires alors que l'IFN- $\gamma$  est immuno-activateur. L'IFN- $\gamma$  est connu pour activer la voie Jak/Stat. En activant son récepteur membranaire, il conduit à l'activation de la protéine kinase Jak1 qui phosphoryle le facteur de transcription Stat1. Celui-ci est transloqué dans le noyau où il se fixe sur ses gènes cibles pour en activer la transcription. Il vient d'être montré que Smad7 est un des gènes cibles induits par l'IFN- $\gamma$ . Smad7 est un Smad inhibiteur qui, en empêchant la phosphorylation de Smad2 et Smad3 par le T $\beta$ RI, bloque la translocation nucléaire de ces fac-

teurs et donc les effets transcriptionnels du TGF $\beta$ . Ainsi, en activant la transcription de Smad7, l'IFN- $\gamma$  antagonise la voie du TGF $\beta$  en inhibant les effets nucléaires de Smad2 et Smad3. Qu'il s'agisse du fonctionnement des Smad comme co-activateurs de facteurs de transcription réglés par des signaux différents, ou de transmodulation de la voie TGF $\beta$  par d'autres voies comme celle des MAP kinases ou de l'IFN- $\gamma$ , ces études traduisent une vision plus générale d'intégration de la voie Smad/TGF $\beta$  aux autres voies de régulation cellulaire ■

1. Derynck R, Zhang Y, Feng XH. Smads: transcriptional activators of TGF- $\beta$  responses. *Cell* 1998 ; 95 : 737-40.
2. Chen X, Rubock M, Whitman M. A transcriptional partner for MAD proteins in TGF- $\beta$  signalling. *Nature* 1996 ; 383 : 691-6.
3. Labbe E, Silvestri C, Hoodless PA, Wrana JL, Attisano L. Smad2 and Smad3 positively and negatively regulate TGF beta-dependent transcription through the forkhead DNA-binding protein FAST2. *Mol Cell* 1998 ; 2 : 109-20.
4. Moustakas A, Kardassis D. Regulation of the human p21/WAF1/Cip1 promoter in hepatic cells by functional interactions between Sp1 and Smad family members. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 ; 95 : 6733-8.
5. Zhang Y, Feng XH, Derinck R. Smad3 and Smad4 cooperate with c-Jun/c-Fos to mediate TGF- $\beta$ -induced transcription. *Nature* 1998 ; 394 : 909-13.

6. Yanagisawa J, Yanagi Y, Masuhiro Y, et al. Convergence of TGF- $\beta$  and vitamin D signalling pathways on SMAD transcriptional coactivators. *Science* 1999 ; 283 : 1317-21.
7. Kretschmar M, Doody J, Timokhina I, Massagué J. A mechanism of repression of TGF $\beta$ /Smad signalling by oncogenic Ras. *Genes Dev* 1999 ; 13 : 804-16.
8. Ulloa L, Doody J, Massagué J. Inhibition of TGF- $\beta$ /SMAD signalling by the interferon- $\gamma$ /STAT pathway. *Nature* 1999 ; 397 : 710-3.

### Jean-Michel Gauthier

Laboratoire Glaxo Wellcome, 25, avenue du Québec, 91941 Les Ulis Cedex, France.

## ■■■ BRÈVES ■■■

■■■ **Smad ne trouve pas son chemin tout seul...** On croyait tout savoir sur les Smad qui transmettent au noyau le message du TGF $\beta$  (voir [1]) (*m/s* 1999, n° 8/9, p. 1039) et voici SARA (*Smad anchor for receptor activation*), identifiée par une équipe canadienne, et dont la fonction est de guider Smad 2 et Smad 3 à proximité du récepteur du TGF $\beta$  [2, 3]. L'ADNc codé pour une protéine de 1 323 acides aminés qui contient un domaine dont la structure est proche de celle d'un double doigt de zinc ou domaine FYVE. Ces quatre lettres correspondent aux initiales des quatre premières protéines dans lesquelles FYVE a été identifié (Fab1, YOTB/ZK632.12, Vac1 chez la levure, et EEA1 chez les mammifères) [4]. Le domaine FYVE fixe le phosphatidylinositol 3-phosphate (PtdIns-3P) avec une grande spécificité et, par conséquent, pourrait assurer l'ancrage de protéines aux mem-

branes [5]. Le domaine FYVE de SARA est nécessaire à sa localisation exclusivement cytoplasmique, et SARA pourrait donc servir à maintenir la protéine Smad2 non activée dans le cytoplasme. En système acellulaire, SARA s'associe à Smad2 par un domaine SBD (*Smad binding domain*), situé sur la partie carboxy-terminale au-delà du domaine FYVE. Smad 2 et Smad 3, mais ni Smad 4 ni Smad 1, se lient à SARA par leur domaine MH2 (*Mad homology domain*). Indépendamment de sa liaison à Smad2, SARA interagit aussi par sa partie carboxy-terminale avec le complexe des récepteurs TGF $\beta$ . L'affinité pour SARA de la protéine Smad2 phosphorylée étant moindre que celle de Smad à l'état non phosphorylé, les constituants du complexe (récepteur du TGF $\beta$  - SARA - Smad 2) se dissocient après fixation du ligand. Smad2 phosphorylée s'associe alors avec Smad4 et migre dans le noyau,

et SARA libérée peut à nouveau recruter une protéine Smad2 non activée, réalisant ainsi un véritable cycle fonctionnel de SARA. SARA n'a aucune interaction avec Smad1. Or Smad1 est un relais essentiel de la voie de transmission du signal de la BMP (*bone morphogenetic protein*), proche du TGF $\beta$  (*m/s* 1998, n° 1, p. 101). On peut donc parier qu'un équivalent de SARA existe pour Smad1, et deux protéines candidates sont déjà sur les rangs...

- [1. Mauviel A. *Med Sci* 1999 ; 15 : 535-7.]
- [2. Tsukasaki T, et al. *Cell* 1998 ; 95 : 779-91.]
- [3. Ten Dijke P, Heldin CH. *Nature* 1999 ; 397 : 109-11.]
- [4. Stenmark H, et al. *J Biol Chem* 1996 ; 271 : 24048-54.]
- [5. Gaullier JM, et al. *Nature* 1998 ; 394 : 432-3.]