

Ski, SnoN, TGIF et protéasome : **halte à l'activation de la voie TGF β /Smad !**

Les membres de la superfamille de cytokines comprenant les TGF β (*transforming growth factor β*), les activines et les BMP (*bone morphogenic proteins*) exercent de nombreuses et complexes actions physiologiques lors du développement de l'embryon et du maintien de l'homéostasie des organismes multicellulaires. Les TGF β sont en particulier impliqués dans la morphogenèse et la différenciation de certaines cellules, la production de matrice extracellulaire et l'immunorégulation. Ils sont de plus d'importants régulateurs de la croissance cellulaire, inhibant la prolifération de certains types cellulaires (cellules épithéliales, kératinocytes, lymphocytes...) mais induisant celle d'autres cellules, comme les fibroblastes. De nombreux travaux ont permis de mieux comprendre la transduction du signal des membres de la famille des TGF β depuis la découverte des protéines Smad il y a maintenant 4 ans. Les récepteurs membranaires du TGF β , activés par la liaison de la cytokine, phosphorylent les protéines Smad2 et Smad3. Ces dernières forment alors des oligomères avec Smad4 et migrent vers le noyau où elles participent à la régulation de la transcription de nombreux gènes cibles en agissant comme des facteurs de transcription ou des co-activateurs (*m/s* 1999, n° 4, p. 535). La voie de transduction Smad/TGF β est finement contrôlée à différents niveaux, entre autres par des interactions avec d'autres voies intracellulaires, comme celles des MAP-kinases ou de l'interféron γ (*m/s* 1999, n° 8-9, p. 1039). Jusqu'à présent, la plupart des résultats décrivaient comment la voie Smad/TGF β était activée bien qu'il soit évident

qu'une telle activation ne peut être permanente. C'est cet aspect des choses qu'éclairent des études récentes indiquant comment l'activité transcriptionnelle des protéines Smad peut être bloquée.

En réalisant un criblage par double-hybride utilisant Smad2 ou des expériences de co-purification visant à isoler les protéines présentant une affinité pour Smad3 et Smad4, trois équipes différentes rapportent dans une série de 5 articles que les protéines Ski et SnoN s'associent physiquement avec les protéines Smad et inhibent les effets biologiques induits par le TGF β [1-5]. Ski et SnoN ne sont pas inconnus dans le monde de la carcinogenèse. En effet, *c-ski* est le proto-oncogène cellulaire homologue de l'oncogène *v-ski* identifié il y a près de vingt ans dans le génome du rétrovirus Sloan-Kettering et responsable de cancers chez le poulet. La surexpression de Ski provoque la croissance non contrôlée et la transformation morphologique de fibroblastes aviaires et cause une différenciation musculaire anormale. Un niveau élevé de Ski a été détecté dans plusieurs lignées tumorales humaines provenant de neuroblastomes, mélanomes ou de cancers de la prostate. SnoN (*Ski-related novel protein*) possède une très forte homologie avec Ski, est aussi impliqué dans certains cancers humains de l'estomac, de la thyroïde et du poumon et, comme Ski, sa surexpression transforme les fibroblastes de poulet. Malgré ces observations indiquant un rôle important de ces deux protéines dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaires, les connaissances sur SnoN et Ski avaient stagné ces 10 dernières années. Mais récemment, un progrès a été accompli

quand il a été montré que SnoN et Ski sont des co-répresseurs transcriptionnels [6]. A travers leur association physique avec le co-répresseur des récepteurs des hormones nucléaires N-CoR, ils sont en effet membres du complexe histone désacétylase-HDAC1. Ces résultats couplés aux dernières données liant SnoN et Ski et la transmission du signal TGF β permettent enfin d'attribuer une fonction à ces deux oncoprotéines.

Les protéines Ski et SnoN sont toutes deux capables d'interagir physiquement avec Smad2, Smad3 et Smad4, mais uniquement lorsque la voie TGF β est activée par la présence de la cytokine [1-5]. Ski et SnoN fixent le domaine MH2 de Smad2 et Smad3, qui est situé à leur extrémité carboxy-terminale et contient les résidus phosphorylés par les récepteurs du TGF β . Cette interaction est très spécifique des Smad de la voie du TGF β puisque Ski ne s'associe pas aux protéines Smad1, Smad5, Smad6 ou Smad7 qui transmettent le signal des BMP, ou sont des Smad inhibiteurs [5]. De manière remarquable, l'interaction de Ski et de SnoN avec les Smad de la voie du TGF β conduit à une inhibition des effets biologiques du TGF β . Ainsi, la surexpression de Ski inhibe l'effet antiprolifératif du TGF β sur plusieurs lignées cellulaires [1, 2]. Cette observation pourrait en partie expliquer le potentiel oncogénique de Ski et de SnoN qui entraînent une prolifération cellulaire normalement bloquée par le TGF β . De plus, l'activité transcriptionnelle de Smad2/Smad3/Smad4 est fortement diminuée par les facteurs Ski et SnoN [1-5] dont la surexpression réprime par exemple l'activation par le TGF β de promoteurs

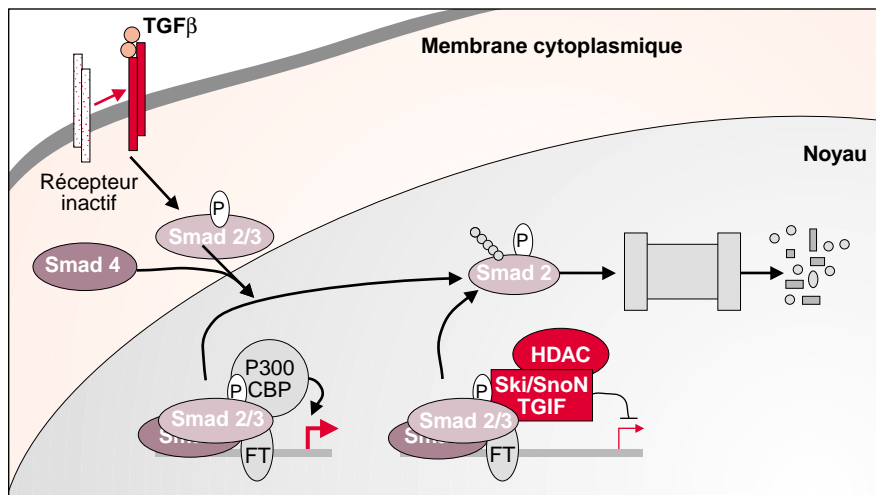


Figure 1. **Mécanismes permettant de bloquer l'activité de la voie de transduction TGFβ/Smad.** Les protéines Smad2 et Smad3, phosphorylées par les récepteurs membranaires activés du TGFβ, forment un complexe avec Smad4 puis migrent dans le noyau où elles se fixent sur les promoteurs de gènes cibles. Leur association avec les co-activateurs CBP/p300 et la synergie avec d'autres facteurs de transcription (FT) permettent l'activation de la transcription. L'interaction de Smad2/3 avec les protéines co-répresseurs Ski, SnoN ou TGIF permet le recrutement d'un complexe HDAC dont l'activité désacétylase inhibe l'activation transcriptionnelle. L'équilibre entre les co-activateurs et les co-répresseurs contrôle le niveau de transcription. Dans le noyau, plusieurs molécules d'ubiquitine sont ajoutées à Smad2, provoquant sa dégradation protéolytique par le protéasome. Le schéma n'est pas représentatif de la stœchiométrie, encore mal définie, des différents complexes.

comme PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor*) ou JunB. Ski et SnoN n'inhibent pas la fixation de Smad3/Smad4 sur ces promoteurs mais forment un complexe avec les Smad fixés sur l'ADN. Le mécanisme d'action moléculaire de Ski et de SnoN est, en fait, lié à leurs effets sur la structure chromatinienne. Il a en effet été récemment montré que les protéines Smad interagissent avec les co-activateurs CBP et p300 [7] qui possèdent une activité histone acétyltransférase (HAT) capable de modifier la structure chromatinienne de manière à favoriser une augmentation de la transcription (*m/s* 1998, n° 4, p. 455-7). Le groupe de Miyazono démontre que Ski inhibe de façon compétitive l'interaction de Smad3 avec son co-activateur p300, diminuant d'autant l'activité transactivatrice de Smad3 [5]. De plus, Ski ou SnoN, fixé aux Smad, recrute le co-répresseur transcriptionnel N-CoR et le complexe histone désacétylase mSin3/HDAC1 qui lui est associé [1,

3, 5]. Ce dernier a un effet opposé à CBP/p300, il rigidifie la structure chromatinienne et inhibe donc la transcription. Les effets et les mécanismes d'action de Ski et SnoN sont tout à fait comparables à ceux de TGIF, une protéine totalement différente isolée par l'équipe de J. Massagué et qui agit comme co-répresseur transcriptionnel de Smad2 en recrutant aussi des désacétylases [8]. On peut donc penser qu'en réponse au TGFβ, l'activité transcriptionnelle des protéines Smad est modulable selon l'équilibre co-activateurs (CBP/p300) et co-répresseurs (Ski, SnoN et TGIF). Par ailleurs, le TGFβ peut aussi réprimer la transcription de plusieurs gènes, comme ceux codant pour c-Myc, cdc25A, la stromélysine ou la collagénase mais on ne sait pas encore si l'équilibre entre Smad/Ski/SnoN/TGIF peut aussi expliquer ces processus de répression purement active. Il apparaît en tout cas que le TGFβ lui-même contrôle en partie cet équilibre. En effet,

après une courte stimulation par le TGFβ (15-30 minutes), SnoN, et dans une moindre mesure Ski, sont dégradés par un mécanisme impliquant probablement les protéasomes cellulaires et lié à l'accumulation nucléaire de Smad3 dans le cas de SnoN [3, 4]. Dans un premier temps, le TGFβ favoriserait donc l'activité transcriptionnelle des Smad en induisant la dégradation des co-répresseurs Ski et SnoN. Mais après une plus longue incubation de 2 heures, le TGFβ stimule fortement l'expression de SnoN [3], ce qui permettrait de stopper l'activité de la voie Smad qu'il a lui-même activée. Cette boucle de régulation négative rappelle un autre mécanisme mis en jeu par le TGFβ pour bloquer la voie des Smad, à savoir la stimulation transcriptionnelle par Smad3/Smad4 de l'expression de la protéine Smad7 qui inhibe la phosphorylation de Smad2 et Smad3 par les récepteurs du TGFβ [9].

Une autre voie de régulation aboutissant aussi à l'arrêt de l'activité de la voie TGFβ/Smad vient d'être découverte. Comme nous l'avons déjà écrit, la phosphorylation de Smad2 et de Smad3 par les récepteurs du TGFβ permet leur activation, c'est-à-dire leur translocation nucléaire et leur activité transcriptionnelle. L'équipe de J. Massagué montre que la protéine Smad2 phosphorylée peut être inactivée non pas par déphosphorylation mais par dégradation protéolytique irréversible impliquant le protéasome 26S et induisant un arrêt de l'activité de la voie Smad2 [10]. Les protéines Smad2 non activées ne sont en revanche pas sensibles à cette dégradation. Ainsi, l'incubation de cellules avec des inhibiteurs du protéasome réduit la dégradation des protéines Smad2 phosphorylées et conduit à une stimulation persistante de gènes induits par le TGFβ. De manière classique, le signal de dégradation par le protéasome est donné par l'ajout de plusieurs molécules d'ubiquitine sur Smad2. Lo et Massagué montrent que cette ubiquitinylation et la dégradation consécutive se déroulent exclusivement dans le noyau. Il semble d'ailleurs que ce ne soit pas la phosphorylation *per se* mais la translocation nucléaire de Smad2

qui permette de cibler la conjugaison de molécules d'ubiquitine grâce aux enzymes de conjugaison E2 UbcH5b, UbcH5c et, dans une moindre mesure, Ubc3 (*m/s* 1999, n° 8-9, p. 1008-14). Il reste maintenant à établir si d'autres protéines Smad, Smad3 en particulier, peuvent subir une dégradation protéolytique mettant en jeu le protéasome. Zhu *et al.* avaient déjà identifié, il y a quelques mois, une nouvelle protéine appelée Smurf1 (*Smad ubiquitination regulatory factor-1*) qui appartient à la famille des ligases d'ubiquitine E3 HECT [11] (*m/s* 1999, n° 8-9, p. 1008-14). Smurf1 est spécifique de la voie BMP, permet l'ubiquitinylation des protéines Smad1 et Smad5 et provoque leur dégradation, qu'elles soient inactives ou activées par les récepteurs des BMP. Nul doute que ces observations ouvrent un nouveau champ d'études sur la stabilité métabolique des Smad. Ces différents articles soulignent une morale bien claire. Qu'il s'agisse

d'inhiber l'activité transcriptionnelle des Smad par des co-répresseurs ou d'éliminer des Smad activés par les récepteurs membranaires, il semble capital pour une cellule de contrôler et, en particulier, de pouvoir « éteindre » un signal aussi important que celui du TGFβ.

1. Luo K, Stroschein S, Wang W, *et al.* The Ski oncoprotein interacts with the Smad proteins to repress TGFβ signaling. *Genes Dev* 1999; 13: 2196-206.
2. Sun Y, Liu X, Eaton E, Lane W, Lodish H, Weinberg R. Interaction of the Ski oncoprotein with Smad3 regulates TGFβ signaling. *Mol Cell* 1999; 4: 499-509.
3. Stroschein S, Wang W, Zhou S, Zhou Q, Luo K. Negative feedback regulation of TGFβ signaling by the SnoN oncoprotein. *Science* 1999; 286: 771-4.
4. Sun Y, Liu X, Eaton E, Lodish H, Weinberg R. SnoN and Ski protooncoproteins are rapidly degraded in response to TGFβ signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 12442-7.
5. Akiyoshi S, Inoue H, Hanai JI, *et al.* c-Ski acts as a transcriptional co-repressor in TGFβ signaling

through interactions with Smads. *J Biol Chem* 1999; 274: 35269-77.

6. Nomura T, Khan M, Kaul S, *et al.* Ski is a component of the histone deacetylase complex required for transcriptional repression by Mad and thyroid hormone receptor. *Genes Dev* 1999; 13: 412-23.
7. Derynck R, Zhang Y, Feng XH. Smads: transcriptional activators of TGFβ responses. *Cell* 1998; 95: 737-40.
8. Wotton D, Lo R, Lee S, Massagué J. A smad transcriptional corepressor. *Cell* 1999; 97: 29-39.
9. Nagarajan R, Zhang J, Li W, Chen Y. Regulation of Smad7 promoter by direct association with Smad3 and Smad4. *J Biol Chem* 1999; 274: 33412-8.
10. Lo R, Massagué J. Ubiquitin-dependent degradation of TGFβ-activated Smad2. *Nat Cell Biol* 1999; 1: 472-8.
11. Zhu H, Kavsak P, Abdollah S, Wrana J, Thomson G. A Smad ubiquitin ligase targets BMP pathway and affects embryonic pattern formation. *Nature* 1999; 400: 687-92.

Jean-Michel Gauthier

Laboratoire Glaxo Wellcome, 25-27, avenue du Québec, 91951 Les Ulis Cedex, France.

www.laffont.fr
2000-III / 129 F
19,67 € TTC FRANCE