Transforming Growth Factor- β s: signalisation et rôles physiopathologiques

Delphine Javelaud et Alain Mauviel*

INSERM U532, Institut de recherche sur la Peau, Université PARIS VII, Hôpital Saint-Louis,
1 avenue Claude Vellefaux, 75010 Paris, France.

Tel 01 53 72 20 69 ; Fax 01 53 72 20 51

Adresse E-mail : mauviel@chu-stlouis.fr

Résumé

Depuis sa découverte au début des années 80, le Transforming Growth Factor- β (TGF- β) est apparu comme un facteur de croissance impliqué dans des processus physiologiques essentiels comme le développement embryonnaire, la réparation tissulaire, la différenciation et le contrôle de la croissance cellulaire. Les expériences d'inactivation des allèles codant pour les trois isoformes différentes du TGF- β chez la souris ont montré leur rôle majeur dans la régulation de l'inflammation et la réparation tissulaire. Le TGF- β est aussi impliqué dans certaines pathologies humaines, comme la fibrose tissulaire et la carcinogenèse, où il peut exercer à la fois un rôle de suppresseur de tumeur et des activités pro-oncogéniques, selon le stade de développement de la tumeur. La réponse cellulaire au TGF- β est initiée par sa fixation à des récepteurs membranaires de type sérine/thréonine kinase qui activent en aval les facteurs de transcription de la famille Smad.

Transforming Growth Factor- β s: signaling and physio-pathological roles

Summary

Transforming Growth Factor- β (TGF- β) family members are multifunctional peptide growth factors that regulate cell growth, differentiation, extracellular matrix production and cell migration and embryonic development. Knock-out experiments for the three mammalian isoforms of TGF- β s in mice have demonstrated their importance in regulating inflammation and tissue repair. Also, TGF- β has been implicated in the pathogenesis of human diseases, including tissue fibrosis and carcinogenesis. In the latter case, it may exert both tumor suppressor and pro-oncogenic activities depending on the stage of the tumor. Smads proteins constitute the core components of the intracellular signaling cascade initiated by TGF- β receptors; as they carry signals from the cell surface directly to the nucleus, where they act as transcription factors.

Introduction

La famille du TGF- β est composée d'une trentaine de membres que l'on retrouve dans tout le règne animal, dont les TGF- β s, les Activines et les BMPs (*Bone Morphogenic Proteins*). Ces cytokines jouent un rôle primordial dans la détermination du devenir cellulaire au cours de l'embryogenèse et contrôlent un large spectre de réponses biologiques chez l'adulte [1]. Le TGF- β peut inhiber ou stimuler la prolifération selon le contexte cellulaire, contrôler le turnover de la matrice extracellulaire (MEC) ainsi que les interactions épithélio-mésenchymateuses au cours de l'embryogenèse. Ses activités pleïotropes sont impliquées dans la réparation tissulaire et la modulation de la réponse immunitaire. Une dérégulation de la signalisation du TGF- β induit des anomalies au cours du développement embryonnaire et intervient dans différentes pathologies humaines, telles que le cancer, la fibrose tissulaire ou encore des maladies auto-immunes.

Structure et signalisation

Il existe trois isoformes humaines du TGF- β , TGF- β 1, TGF- β 2 et TGF- β 3, codées par trois gènes distincts. Ces isoformes sont du point de vue structural très similaires (neuf résidus cystéines conservés, 76 à 80% d'identité entre les séquences protéiques). Elles sont synthétisées par de nombreux types cellulaires dont les plaquettes, les macrophages, les fibroblastes ou encore les cellules tumorales, sous forme d'un précurseur latent (LTGF- β pour *Latent TGF- β*) qui requiert une maturation pour se fixer au récepteur et induire une réponse cellulaire (Figure 1, pour revue [2]). Le LTGF- β est composé de 390 à 414 acides aminés, selon l'isoforme. Il est constitué d'un peptide signal de sécrétion dans sa région amino-terminale, d'une région centrale appelée LAP (pour *Latency-Associated Peptide*), et d'une région carboxy-terminale constituant le TGF- β bioactif après maturation. Les différentes isoformes du TGF- β sont caractérisées par un noeud de six cystéines qui forment trois ponts disulfures rigidifiant ainsi la structure protéique. La dimérisation du TGF- β requiert l'engagement d'une septième cystéine dans un pont disulfure reliant les deux monomères. Le LTGF- β peut être sécrété sous forme d'un petit complexe latent (SLC pour *Small Latent Complex*) ou sous forme d'un large complexe latent (LLC pour *Large Latent Complex*) lorsque le LAP est associé de façon covalente au LTBP (pour *LTGF- β -binding protein*). Les peptides LAPs confèrent la latence du complexe alors que les LTBPs permettent la fixation du

TGF- β à la matrice extracellulaire et son stockage. Les changements de conformation du LLC ou SLC sont induits soit par un clivage protéolytique des LAPs par différentes protéases comme la plasmine, la thrombine, les transglutaminases plasmiqes ou encore des endoglycases, soit par des interactions physiques des LAPs avec d'autres protéines, telles que la thrombospondine-1, ce qui aboutit à la libération d'une forme bioactive, mature du TGF- β .

Après son activation, le TGF- β induit une réponse cellulaire en se fixant à des récepteurs spécifiques ayant une activité de type serine/thréonine kinase [3,4]. La famille des récepteurs au TGF- β est constituée de deux sous-familles similaires du point de vue structurale, les récepteurs de type I et de type II (T β RI et T β RII). Ces récepteurs sont composés d'une petite région extracellulaire riche en cystéine et d'un domaine intracellulaire dans lequel est situé leur domaine kinase. T β RII a une activité kinase intrinsèque alors que T β RI doit être phosphorylé pour être actif. Le TGF- β se fixe à T β RII, formant ainsi un complexe hétérodimérique qui peut alors recruter T β RI et l'activer par la phosphorylation de résidus serines et thréonines dans son domaine GS. Ce domaine, riche en glycine et sérine est voisin du domaine kinase de T β RI et contrôle son activité catalytique et la spécificité de ses substrats. Le betâglycane, un protéoglycane transmembranaire connu aussi sous le nom de T β RIII, permet la fixation du TGF- β au T β RII avec une meilleure affinité, cependant il n'a pas été montré que cette molécule puisse initier par elle-même la transduction d'un signal cellulaire. Dans les cellules non stimulées, T β RI est maintenu inactif par son association avec la protéine FKBP12 (*FK506-binding protein 12*).

La transduction du signal des récepteurs jusqu'au noyau est assurée principalement par la phosphorylation d'une famille de protéines cytoplasmiques conservées au cours de l'évolution, les Smads [3] (Figure 2). Cette famille est divisée en trois groupes fonctionnels différents : les Smads associés au récepteur ou R-Smad, qui interagissent de façon spécifique directement avec le T β RI activé et sont spécifiques d'un ligand, les co-Smads, médiateurs communs pour tous les membre de la famille du TGF- β , et les Smads inhibiteurs ou I-Smad [5].

Les R-Smads, Smad2 et Smad3, sont caractérisés par deux domaines hautement conservés au cours de l'évolution, les domaines d'homologie à Mad (MH). MH1 est présent dans la région amino-terminal et MH2 dans la région carboxy-terminale, ces deux domaines sont reliés par une région intermédiaire variable riche en proline. En réponse au TGF- β , T β RI phosphoryle

Smad2 et Smad3 sur deux résidus sérines présents dans un motif conservé de type –SSXS- situé à l'extrémité carboxy-terminale du domaine MH2. Les R-Smads sont ciblés à la membrane plasmique par les microtubules, où une protéine à domaine FYVE, SARA (*Smad-Anchor for Receptor Activation*), les présente au récepteur. Les protéines Hrs, Dab2 et Axin peuvent aussi faciliter l'association des R-Smads avec les récepteurs activés et ainsi favoriser la propagation du signal [6]. Après phosphorylation par T β RI, les R-Smads s'associent à l'unique co-Smad mis en évidence, Smad4, et ce nouveau complexe migre alors dans le noyau où il joue le rôle de facteur de transcription. L'importation nucléaire de ce complexe est un processus actif, contrôlé par Ran et les importines. Smad4 est importé dans le noyau uniquement lorsqu'il est associé aux R-Smads, alors que Smad2 et Smad3 peuvent être importés dans le noyau de façon indépendante de Smad4 [7]. Cependant, en l'absence de Smad4, ni Smad2 ni Smad3 ne peuvent avoir une activité transcriptionnelle, ce qui suggère que la fonction principale de Smad4 est de réguler la transcription plutôt que de transmettre les signaux d'activation du cytoplasme au noyau.

Les complexes R-Smad/Smad4 se lient à l'ADN directement ou en association avec d'autres protéines pouvant se fixer à l'ADN [3]. L'affinité optimale des protéines recombinantes Smad3/Smad4 est observée pour la séquence nucléotidique CAGAC, via leur domaine MH-1. Une insertion de 30 acides aminés dans le domaine MH1 de Smad2 empêche sa fixation directe à l'ADN. Pour activer la transcription en réponse au TGF- β , le complexe Smad2/Smad4 doit s'associer à des protéines nucléaires se liant à l'ADN de la famille Fast. L'activité de transactivateur des protéines Smad est médié par leur domaine MH2. L'activation transcriptionnelle spécifique et optimale des promoteurs de leurs gènes cibles requiert le recrutement de facteurs supplémentaires comme des facteurs de transcription (AP-1, TFE3 ou CBFA/AML, YY1), des adaptateurs comme FAST-1, ou encore des co-activateurs tel que CBP (*CREB-binding Protein*) et p300 [3,8]. Ainsi, en s'associant à des partenaires différents, les Smads peuvent établir des interactions de haute affinité et très sélectives avec les séquences promotrices de leurs gènes cibles. L'association des Smads avec des répresseurs transcriptionnels comme TGIF (*TG-Interacting Factor*), Ski et SnoN [9], module leur interaction avec les co-activateurs transcriptionnels p300/CBP ; ces répresseurs transcriptionnels recrutent des histones dé-acétylases, ce qui conduit aussi à l'inhibition de la transcription génique.

Le I-Smad, Smad7 s'associe au T β RI activé, empêchant alors la phosphorylation de Smad2 et

Smad3 [10]. De plus, Smad7 peut recruter deux ubiquitine ligases E3, Smurf1 et Smurf2, au niveau du T β RI activé, ce qui entraîne la dégradation par le protéasome du complexe des récepteurs. L'effet inhibiteur de Smad7 peut être renforcé par la stabilisation de son interaction avec T β RI par les protéines STRAP (*Serine-Threonine kinase Receptor-Associated Protein*) ou YAP-65 (*Yes-Associated Protein 65*) [11,12]. L'action inhibitrice de Smad7 pourrait fonctionner comme une boucle de rétrocontrôle négatif, l'expression de Smad7 étant induite par le TGF- β de façon dépendante des Smads [3] .

La famille des protéines Smads représente les messagers hautement spécifiques du TGF- β , cependant d'autres voies de signalisation peuvent être activées par le TGF- β selon le contexte et le type cellulaires étudiés. Ainsi, il a été montré que le TGF- β pouvait activer les voies des MAPK (p38, JNK et ERK), de la PI-3K et de PP2A/P70s6K, sans que les mécanismes impliqués soient clairement définis [13,14]. L'importance relative et l'effet de ces différentes voies de signalisation dans la modification des réponses cellulaires au TGF- β sont en cours d'étude.

Fonctions biologiques

Actif sur tous les types cellulaires, le TGF- β contrôle la prolifération, la différenciation, la motilité, l'adhésion ou la mort, selon le type cellulaire et l'état de différenciation. Ces fonctions participent au contrôle du développement et de l'homéostasie des tissus dans des situations normales et pathologiques [1].

Le TGF- β exerce un effet anti-prolifératif important sur les cellules épithéliales, endothéliales, hématopoïétiques, neurales et dans certains types de cellules mésenchymateuses. L'arrêt de croissance induit par le TGF- β implique différents mécanismes, tels que l'induction transcriptionnelle des inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines, p21^{WAF1} et/ou p15^{INK4B}, ou encore l'inhibition de l'expression de c-Myc ou de la phosphatase Cdc25A [15]. Plus récemment, il a été montré que le TGF- β réprimait l'expression des protéines Id (*Inhibitor of Differentiation/ Inhibitor of DNA-binding 1-gene*), Id1, Id2 et Id3 [16]. Ces protéines contrôlent négativement la sortie du cycle cellulaire et l'entrée en différenciation de divers types cellulaires. Elles fonctionnent comme des inhibiteurs des facteurs de transcription à hélice-boucle-hélice (bHLH), essentiels pour la différenciation comme MyoD ou E1A et peuvent interagir avec la protéine Rb [17]. La répression de Id semble jouer une part importante dans l'action anti-proliférative du TGF- β sur les cellules épithéliales [14-18].

Une des autres fonctions-clé du TGF- β est de réguler l'expression des protéines de la MEC (Matrice Extracellulaire), incluant les collagènes fibrillaires et la fibronectine. Le TGF- β réprime aussi la dégradation de la MEC en inhibant l'expression de metalloprotéinases et de serine-protéases, et en augmentant l'expression d'inhibiteurs de protéases comme les TIMPS (*Tissue Inhibitor of Metalloproteinases*) ou PAI-1 (*Plasminogen Activator Inhibitor-1*). Le TGF- β est considéré comme un facteur anabolique puissant puisqu'il augmente le dépôt et la réparation du tissu conjonctif [19]. Le TGF- β 3, qui est exprimé principalement au cours de l'embryogenèse, induit une réparation tissulaire sans cicatrice, assimilé au mode de réparation de l'embryon alors que les embryons dont les allèles codant pour le TGF- β 3 ont été invalidés présentent des cicatrices après blessure [20].

Le TGF- β joue également un rôle important dans le maintien des fonctions immunitaires. Les souris dont les allèles codant pour le TGF- β 1 ont été invalidés meurent d'une nécrose tissulaire grave et d'une réponse inflammatoire généralisée, quelques semaines après la naissance. Dans ce contexte, le TGF- β a non seulement une action anti-proliférative sur les lymphocytes T et les thymocytes mais il contrôle aussi leur différenciation et leur activation [21].

TGF- β et pathologies

Fibrose :

Le TGF- β induit des réponses pro-fibrotiques *in vitro* et *in vivo*, en augmentant l'expression des composants de la MEC, en réprimant les enzymes cataboliques et en induisant la prolifération des fibroblastes ainsi que leur différenciation en myofibroblastes. La surexpression de TGF- β et la dérégulation de la voie de signalisation des Smads, impliquant l'augmentation de la phosphorylation des Smad2/3 ou/et leur accumulation nucléaire, ou encore la réduction d'expression de Smad7 ont été mises en évidence dans la fibrose [22].

Cancer :

La résistance aux effets anti-prolifératifs exercés par le TGF- β est une caractéristique de nombreuses cellules tumorales. Le rôle suppresseur de tumeur du TGF- β dans la carcinogenèse précoce se manifeste par la présence de mutations inactivatrices dans les gènes

codant pour les récepteurs au TGF- β et les protéines Smads dans les carcinomes humains, ainsi que par des études de développement tumoral dans des modèles murins [13]. En contraste, le TGF- β peut devenir un facteur pro-oncogénique dans les stades tardifs du développement tumoral, ce qui exacerbe le phénotype malin des cellules transformées. Le TGF- β sécrété par les cellules tumorales peut contribuer indirectement à la croissance tumorale en supprimant l'immuno-surveillance, ou en stimulant la production de facteurs angiogéniques. Sa capacité à induire la transition épithélio-mésenchymateuse dans de nombreuses cellules néoplasiques peut aussi participer à l'augmentation des activités invasives et métastatiques des cellules tumorales.

Potentiel thérapeutique :

Comme le TGF- β joue des rôles antagonistes sur la tumorigénèse en fonction du stade de la progression tumorale, les approches thérapeutiques ciblant la voie de signalisation du TGF- β doivent être considérées au cas par cas. La chimioprévention pourrait cibler l'augmentation de la signalisation du TGF- β et promouvoir ainsi ses activités de suppresseur de tumeur, alors que le traitement de cancers avancés nécessiterait des stratégies permettant d'inactiver le TGF- β et ses voies de signalisation.

Parmi les approches thérapeutiques testées pour inhiber l'effet délétère du TGF- β dans la fibrose ou dans des stades de cancers avancés, on peut citer l'utilisation de protéines chimériques T β RII-IgG Fc, d'anticorps neutralisant le TGF- β , d'antagonistes naturels comme la décorine, ainsi que la surexpression de Smad7 ou de formes mutantes dominante négative des récepteurs [20,22-24]. De façon intéressante, il a été montré que l'effet anti-tumoral des drogues chimiopréventives comme les rétinoïdes ou le tamoxifène est corrélée à leur capacité à induire la production et l'activation du TGF- β dans les cellules épithéliales.

Les molécules capables d'augmenter la signalisation des Smads ou d'inhiber l'expression de Smad7 pourrait court-circuiter les anomalies de signalisation au niveau des récepteurs, et ainsi être utilisées comme agents chimiopréventifs. Cependant, une telle approche peut potentiellement accélérer le développement tumoral et doit donc être considérée avec précaution [13,23].

Conclusion

Avec ses activités pléiotropes, le TGF- β est impliqué dans de nombreux phénomènes physiologiques normaux et pathologiques. L'étude de sa signalisation a permis de mieux comprendre son rôle dans différentes pathologies humaines, comme la fibrose ou encore son rôle antagoniste dans le développement tumoral. La compréhension des interactions avec d'autres voies de signalisation permettra d'approfondir nos connaissances actuelles et de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques mieux adaptées à chaque pathologie impliquant le TGF- β .

Bibliographie

1. Roberts AB. Molecular and cell biology of TGF-beta. Miner Electrolyte Metab. 1998; 24 :111-119.
2. Barcellos-Hoff, M-H. Latency and activation in the control of TGF-beta. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 1996 ; 1 : 353-363.
3. Massague J, Chen YG. Controlling TGF-beta signaling. Genes Dev. 2000 ;14 :627-644.
4. Attisano L, Wrana JL. Signal transduction by TGF-beta superfamily. Curr Opin Cell Biol. 1998 ;10:188-194.
5. Miyazono K, ten Dijke P, Heldin CH. TGF-beta signaling by Smad proteins. Adv Immunol. 2000 ;75:115-157.
6. Moustakas A, Souchelnytskyi S, Heldin CH. Smad regulation in TGF-beta signal transduction. J Cell Sci. 2001 ;114:4359-4369.
7. Fink SP, Mikkola D, Willson JK, Markowitz S. TGF-beta-induced nuclear localization of Smad2 and Smad3 in Smad4 null cancer cell lines. Oncogene. 2003 ;22:1317-1323.
8. Kurisaki K, Kurisaki A, Valcourt U, Terentiev AA, Pardali K, Ten Dijke P, Heldin CH, Ericsson J, Moustakas A. Nuclear factor YY1 inhibits transforming growth factor beta- and bone morphogenetic protein-induced cell differentiation. Mol Cell Biol. 2003 23:4494-4510.
9. Liu X, Sun Y, Weinberg RA, Lodish HF. Ski/Sno and TGF-beta signaling. Cytokine Growth Factor Rev. 2001;12:1-8.
10. Miyazono K. TGF-beta signaling by Smad proteins. Cytokine Growth Factor Rev. 2000;11:15-22.
11. Datta PK, Chytil A, Gorska AE, Moses HL. Identification of STRAP, a novel WD domain protein in transforming growth factor-beta signaling. J Biol Chem. 1998 ;273 :34671-34674.
12. Ferrigno O, Lallemand F, Verrecchia F, L'Hoste S, Camonis J, Atfi A, Mauviel A. Yes-associated protein (YAP65) interacts with Smad7 and potentiates its inhibitory activity against TGF-beta/Smad signaling. Oncogene. 2002;21:4879-4884.
13. de Caestecker MP, Piek E, Roberts AB. Role of transforming growth factor-beta signaling in cancer. J Natl Cancer Inst. 2000 ;92 :1388-1402.

14. Mulder KM. Role of Ras and Mapks in TGFbeta signaling. Cytokine Growth Factor Rev. 2000 ;11 :23-35.
15. Ten Dijke P, Goumans MJ, Itoh F, Itoh S. Regulation of cell proliferation by Smad proteins. J Cell Physiol. 2002;191:1-16.
16. Kang Y, Chen CR, Massague J. A self-enabling TGFbeta response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells. Mol Cell. 2003 ;11:915-926.
17. Ruzinova MB, Benezra R. Id proteins in development, cell cycle and cancer. Trends Cell Biol. 2003 ;13:410-418.
18. Ling MT, Wang X, Tsao SW, Wong YC. Down-regulation of Id-1 expression is associated with TGF beta 1-induced growth arrest in prostate epithelial cells. Biochim Biophys Acta. 2002;1570:145-152.
19. Verrecchia F, Mauviel A. Transforming growth factor-Beta signaling through the smad pathway : role in extracellular matrix gene expression and regulation. J Invest Dermatol. 2002 ;118:211-215.
20. O'Kane S and Ferguson MW. Transforming Growth Factors-Beta s and wound healing. Int J Biochem Cell Biol., 1997 ; 29 : 63-78.
21. Chen W, Wahl SM. TGF-beta: receptors, signaling pathways and autoimmunity. Curr Dir Autoimmun. 2002;5:62-91.
22. Varga J. Scleroderma and Smads: dysfunctional Smad family dynamics culminating in fibrosis Arthritis Rheum. 2002;46:1703-1713.
23. Reiss M. TGF-beta and cancer. Microbes Infect. 1999;1:1327-1347.
24. Akhurst RJ. TGF-beta antagonists: why suppress a tumor suppressor? J Clin Invest. 2002 ;109:1533-1536.

Légendes

Figure 1 : La maturation du TGF- β

Le TGF- β est synthétisé comme un prépro- TGF- β , puis clivé par des endopeptidases de l'appareil de Golgi pour former un petit complexe latent (SLC) constitué du TGF- β mature, homodimère de 24 kDa, associé de façon non covalente à deux LAPs de 80 kDa. Le TGF- β est ensuite généralement sécrété sous forme d'un large complexe latent (LLC), associé de façon covalente avec les LTBP. L'activation extracellulaire, finale du TGF- β nécessite sa libération du LLC.

Figure 2 : La voie de signalisation des Smads.

T β RI est maintenu inactif par son interaction avec la protéine FKBP12. Après fixation du TGF- β à T β RII, T β RI est recruté et phosphorylé par l'hétérocomplexe TGF- β /T β RII. T β RI phosphoryle alors Smad2 et Smad3. Les protéines Smad2/3 sont acheminées à la membrane plasmique grâce aux microtubules, et présentées aux récepteurs activés par des protéines associées à la membrane comme SARA. Les R-Smads phosphorylés s'associent alors à Smad4 et ce nouveau complexe est transporté dans le noyau où il agit comme un facteur de transcription. L'activité transcriptionnelle des Smads est modulée par la présence de co-activateurs (co-A) et de co-represseurs (co-R). La protéine inhibitrice Smad7 peut empêcher la phosphorylation des R-Smads en s'associant à T β RI, empêchant ou initiant la dégradation par le protéasome des récepteurs activés en recrutant les ubiquitine-ligases Smurf1 et Smurf2.