

Interactions fonctionnelles entre la voie de signalisation du TGF- β par les Smads et le TNF- α : implications dans la régulation de l'expression du collagène de type I

par Franck Verrecchia

INSERM U697, Hôpital Saint-Louis, Pavillon Bazin, 1, avenue Claude Vellefaux, 75010 Paris. Tél. : 01 53 72 20 76. Fax : 01 53 72 20 51. E-mail : franck.verrecchia@stlouis.inserm.fr

Reçu le 19 octobre 2005

RÉSUMÉ

L'équilibre entre la production et la synthèse du collagène de type I joue un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie tissulaire et dans le contrôle de la réparation tissulaire. Le TGF- β , qui joue un rôle essentiel dans le remodelage matriciel, augmente l'expression du collagène de type I. A l'opposé, le TNF- α , dont l'action sur le remodelage matriciel est

opposée à celle du TGF- β , réprime l'expression du collagène de type I. Cette revue résume les connaissances actuelles sur la régulation transcriptionnelle du collagène de type I par le TGF- β et le TNF- α , et sur les mécanismes moléculaires gouvernant les interactions fonctionnelles entre la voie de signalisation du TGF- β et du TNF- α .

SUMMARY TGF- β and TNF- α : antagonistic cytokines controlling type I collagen gene expression

The balance between production and degradation of type I collagen plays a critical role in the development and maintenance of organ and tissue integrity. Its also represents the most crucial element governing the process of tissue repair. TGF- β , a key player in the physiopathology of tissue repair, enhances type I collagen gene expression. In contrast, TNF- α ,

whose matrix-remodelling function is opposite to that of TGF- β , reduces type I collagen gene expression. This review focuses on transcriptional regulation of type I collagen by TGF- β and TNF- α , and on the molecular mechanisms that control the antagonistic activity of TNF- α against TGF- β -driven type I collagen gene expression.

INTRODUCTION

La fibrose tissulaire résulte d'un processus complexe dont une des principales conséquences est le dépôt excessif de composants de la matrice extracellulaire (MEC), en particulier de collagènes fibrillaires, constituants majeurs de la MEC. Ce dépôt excessif de fibres de collagène provient non seulement d'une augmentation de la synthèse mais aussi d'une diminution de la dégradation des composants de la MEC (Trojanowska *et al.*, 1998 ; Verrecchia & Mauviel, 2002a, b). De nombreux facteurs de croissance comme les cytokines, sécrétées par plusieurs types cellulaires comme certaines cellules sanguines, les cellules mésenchymateuses ou épithéliales, régulent la synthèse et la dégradation des fibres de collagène (Uitto & Kouba, 2000).

Dans la peau, les fibres de collagène sont constituées principalement de collagène de type I qui représente 80 % du poids sec du derme. Les fibres de collagène de type I sont constituées par l'assemblage de trois sous-

unités : deux chaînes codées par le même gène, le gène de collagène $\alpha 1$ (I), et une chaîne codée par un autre gène, le gène de collagène $\alpha 2$ (I). Chacune des trois chaînes, de façon concomitante à sa traduction, est transférée dans le lumen du réticulum endoplasmique. A cette étape, chaque chaîne consiste en un peptide immature, constituée d'une région centrale, la région hélicale, flanquée d'un peptide signal, d'un propeptide N-terminal et d'un propeptide C-terminal. Ces deux dernières régions aideront à la maturation de la protéine. Une fois dans le réticulum endoplasmique, plusieurs modifications sont effectuées ; le peptide signal est coupé, plusieurs résidus proline et lysine sont hydroxylés, le propeptide C-terminal est N-glycosylé, et certaines hydroxylysines sont O-glycosylées. Ces modifications et la formation de ponts disulfures entre les propeptides C-terminaux des trois chaînes permettent leur alignement. Une fois alignée, la triple hélice s'enroule sur elle-même en direction de la partie N-terminale. Dans l'appareil de Golgi, la triple hélice est flanquée de part et d'autre de régions non-

hélicales. Le propeptide est alors expulsé par exocytose dans l'espace extracellulaire où des procollagène-peptidases coupent les propeptides N- et C-terminaux et libèrent une triple hélice mature de tropocollagène. Les molécules de tropocollagène s'assemblent alors côte à côte avec un décalage de quelques nanomètres grâce à des liaisons covalentes entre des résidus lysines de la partie N-terminale d'une molécule avec d'autres lysines de la partie C-terminale d'une molécule voisine. Cela permet aux molécules de tropocollagène de s'assembler en fibrilles de 50 nm de diamètre. Ces fibrilles s'agrègent alors en fibrilles d'ordre supérieur (500 nm de diamètre) qui forment à leur tour des fibres de collagène de 1 à 10 mm de diamètre (Bornstein & Sage, 1989). De nombreuses études ont démontré que le dépôt excessif des fibres de collagène de type I observé lors des fibroses tissulaires était essentiellement dû à des dérégulations de la

modulation transcriptionnelle de l'expression des sous-unités $\alpha 1$ et $\alpha 2$ du collagène de type I (respectivement COL1A1 et COL1A2) (Trojanowska *et al.*, 1998; Uitto & Kouba, 2000; Ghosh, 2002). Ainsi, l'identification des facteurs impliqués dans cette régulation transcriptionnelle est essentielle pour mieux comprendre ces dérégulations.

RÉGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DU COLLAGÈNE DE TYPE 1 PAR LE TGF- β

Le Transforming Growth Factor- β (TGF- β) stimule la formation du tissu conjonctif durant le développement et lors des processus de réparation tissulaire en augmentant la synthèse des composants de la MEC et en inhibant l'activité des enzymes de dégradation, les MMPs (*Matrix*

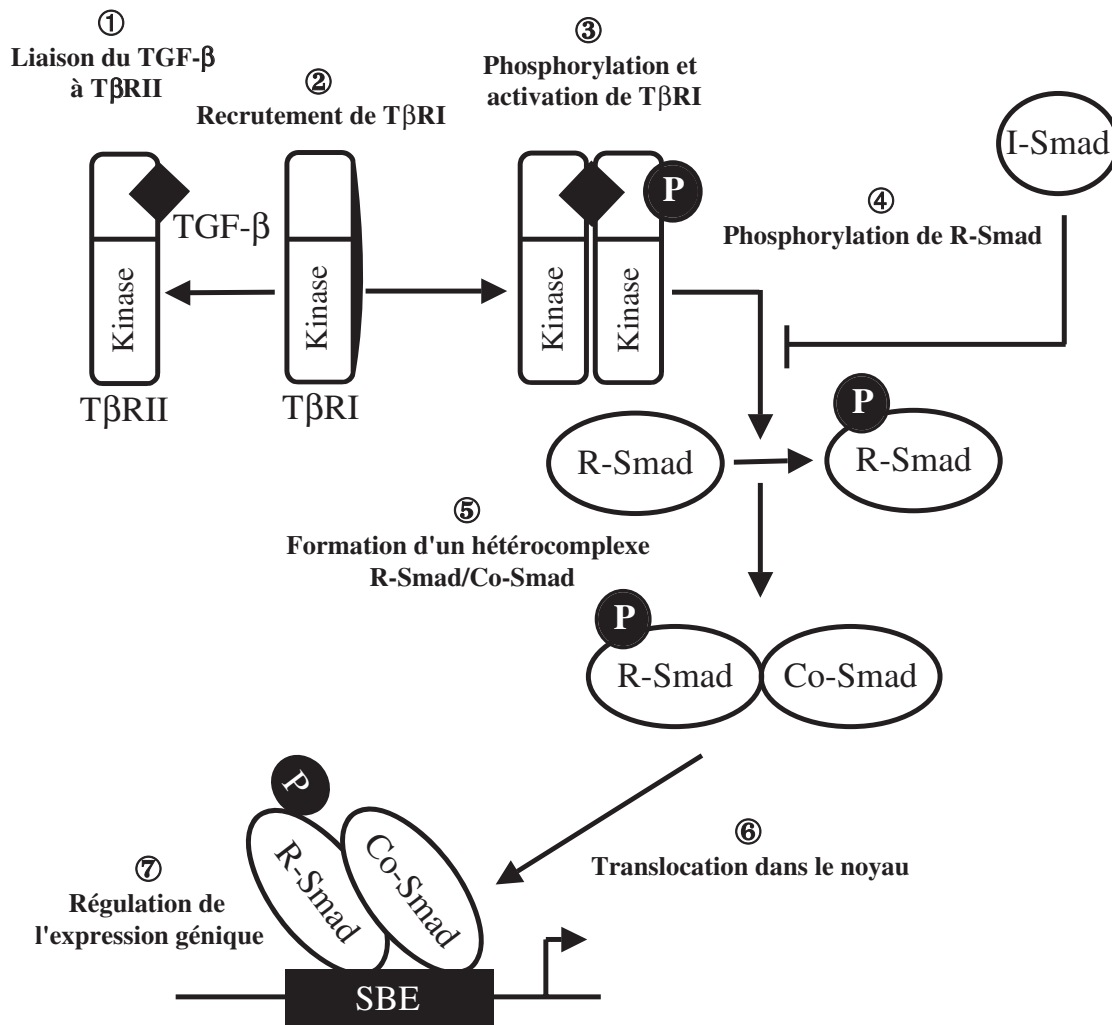


FIG. 1. – Voie de signalisation du TGF- β par les protéines Smads.

La fixation du ligand (TGF- β) sur le récepteur primaire (T β RII) induit le recrutement et l'activation par phosphorylation du récepteur secondaire (T β RI). T β RI activé va phosphoryler les protéines R-Smad (Smad2 ou Smad3) et induire la formation d'un hétérocomplexe R-Smad/Co-Smad. Ce complexe protéique va alors être transloqué dans le noyau où il va pouvoir agir comme facteur transcriptionnel. Les protéines I-Smad (Smad6 ou Smad7) bloquent cette voie de signalisation.

MetalloProteinases). Cette diminution de l'activité des MMPs induite par le TGF- β s'effectue à la fois en diminuant leur expression et en augmentant celle de leurs inhibiteurs naturels, les TIMPs (*Tissue Inhibitor MetalloProteinases*). L'essentiel des effets du TGF- β sur la MEC, en particulier sur le collagène de type I, résulte de régulations transcriptionnelles (Verrecchia & Mauviel, 2002a, b; Verrecchia & Mauviel, 2004). Ainsi, dans le contexte de la fibrose tissulaire, il apparaît crucial de bien comprendre les mécanismes moléculaires par lesquels le TGF- β régule la transcription de COL1A1 et COL1A2.

La voie de signalisation du TGF- β par les Smads

(pour revues Derynck & Zhang, 2003; Shi & Massague, 2003; ten Dijke & Hill, 2004; Feng & Derynck, 2005)

La cascade de signalisation intracellulaire des membres de la superfamille du TGF- β (Fig. 1) est initiée par la liaison de la cytokine à un complexe de récepteurs membranaires composé de deux types de récepteurs à activité sérine/thréonine kinase, les récepteurs de type I (T β RI) et les récepteurs de type II (T β RII) (Wrana *et al.*, 1994). La fixation de la cytokine à T β RII induit le recrutement et la phosphorylation de T β RI au niveau d'une séquence de trente acides aminés fortement conservée, directement voisine du domaine kinase de la protéine, appelée domaine GS du fait de sa séquence TTS β SGSG riche en glycines et sérines (Huse *et al.*, 1999). La transduction du signal depuis la membrane jusqu'au noyau s'effectue alors grâce à une famille de protéines, les Smads. Selon des critères structuraux et fonctionnels, la famille des Smads peut être divisée en trois sous-familles. Les R-Smads (*Receptor-regulated Smad*), spécifiquement activées par les récepteurs de type I, comprennent d'une part Smad 1, Smad 5 et Smad 8 spécifiques de la voie des BMPs, et d'autre part Smad2 et Smad 3 spécifiques de la voie des TGF- β /activines. L'accrochage des R-Smads au récepteur de type 1, facilité par des protéines auxiliaires, les *Smad Anchor for Receptor Activation* (SARA) (Tsukazaki *et al.*, 1998), entraîne la phosphorylation des R-Smads au niveau de résidus sérines situés à l'extrémité C-terminale de la

protéine (motif SSXS). L'activation de ces R-Smads permet la formation d'un hétérocomplexe avec un autre membre de la famille des Smads, commun aux différents R-Smads, Smad4. Cette protéine également appelée Co-Smad (*Common-partner Smad*) est dépourvue de la séquence SSXS et permet la translocation dans le noyau du complexe R-Smad/Smad4 qui peut alors agir comme facteur de transcription (Xiao *et al.*, 2000). La troisième sous-famille des Smads est constituée de Smad6 et Smad7 appelées I-Smads (*Inhibitory-Smads*), qui empêchent la phosphorylation des R-Smads et ainsi leur association avec Smad4 dans le noyau en interagissant directement avec Smad4 (Imamura *et al.*, 1997). De plus, Smad7 peut recruter deux ubiquitine-ligases E3, Smurf1 et Smurf2, au niveau du récepteur de type I activé, ce qui entraîne la dégradation par le protéasome du complexe des récepteurs (Ebisawa *et al.*, 2001). Les mécanismes grâce auxquels les protéines Smads régulent la transcription ont fait l'objet de nombreuses recherches au cours de ces dernières années. Les Smads peuvent agir comme facteur de transcription soit seuls, soit en association avec d'autres facteurs transcriptionnels ou cofacteurs (Shi & Massague, 2003; ten Dijke & Hill, 2004; Feng & Derynck, 2005).

Liaison directe de Smad à l'ADN. – Les protéines Smads possèdent un domaine de liaison à l'ADN appelé domaine MH1 (Mad Homolog-1) localisé au niveau de l'extrémité N-terminale de la protéine. Smad3 et Smad4 se lient à une séquence spécifique de l'ADN, la séquence CAGA, appelée SBE pour "Smad Binding Element". Cette séquence a été retrouvée sur plusieurs promoteurs de gènes chez les mammifères, tels que les promoteurs des gènes de la sous-unité $\alpha 1$ du collagène de type VII (Vindeoghel *et al.*, 1998), de PAI-1 (*Plasminogen activator inhibitor* de type-1) (Dennler *et al.*, 1998), de JunB (Jonk *et al.*, 1998) et de cJun (Wong *et al.*, 1999). Par contre, bien que pourvu d'un domaine MH1, Smad2 ne se lie pas directement à l'ADN en raison de l'insertion d'une séquence de trente acides aminés au niveau du domaine MH1 (Fig. 2) (Yagi *et al.*, 1999). L'ensemble des études sur les sites de liaison de Smad3/Smad4 à

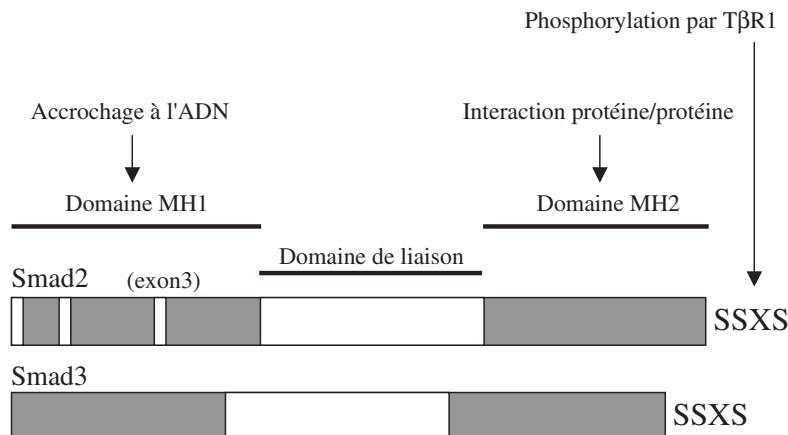


FIG. 2. – Structure comparée des protéines Smad3 et Smad2.

Les protéines Smad2 et Smad3 possèdent deux domaines très conservés, le domaine MH1 et le domaine MH2. Le domaine MH1 est responsable de l'accrochage de Smad3 à l'ADN. L'insertion d'une séquence de 30 acides aminés dans ce domaine empêche l'accrochage de Smad2 à l'ADN. Le domaine MH2 est en particulier responsable des interactions de Smad2 et Smad3 avec d'autres protéines comme par exemple Smad4. Chaque protéine possède un site de phosphorylation par T β RI sur son extrémité C-terminale.

l'ADN révèle qu'un complexe unique Smad3/Smad4 ne peut à lui seul induire la transcription en réponse au TGF- β . Plusieurs copies de ces sites de liaison à l'ADN ou l'association avec d'autres facteurs transcriptionnels ou cofacteurs semblent nécessaires à la réponse au TGF- β (Zawel *et al.*, 1998).

Interaction des Smads avec d'autres facteurs transcriptionnels. – Les protéines Smads peuvent interagir avec de nombreux facteurs transcriptionnels. Par exemple, en réponse à l'activine A, le complexe Smad2/Smad4 interagit avec FAST1 et FAST2 pour activer la transcription respectivement du gène Mix2 chez le Xénope et du gène goosecoid chez la Souris (Chen *et al.*, 1997; Labbe *et al.*, 1998). De façon similaire, Smad3 interagit avec le récepteur à la vitamine D3 et favorise l'expression de c-Jun (Yanagisawa *et al.*, 1999). Smad3 interagit également avec TFE3 pour activer la transcription du gène PAI-1 (Hua *et al.*, 1998), et avec Sp1 pour induire la transactivation du gène p21^{CIP} en réponse au TGF- β (Moustakas & Kardassis, 1998).

Interaction des Smads avec des cofacteurs. – L'extrémité C-terminale des R-Smads interagit directement avec CBP ou p300. Ces protéines agissent au niveau transcriptionnel en altérant la structure de la chromatine et ainsi en favorisant l'exposition des régions promotrices des gènes transcrits aux complexes transcriptionnels, ou directement en recrutant la RNA polymérase II. Ainsi, ces interactions entre CBP/p300 et Smad2, Smad3 ou Smad4 sont nécessaires à la transactivation de nombreux gènes en réponse au TGF- β (Nishihara *et al.*, 1998). L'association entre Smad3/Smad4 et CBP/p300 peut être inhibée par compétition avec d'autres facteurs, tels que l'oncoprotéine E1A (Nishihara *et al.*, 1999), les proto-oncogènes c-ski et SnoN (Akiyoshi *et al.*, 1999), et TGIF (Wotton *et al.*, 1999).

Régulation transcriptionnelle de COL1A1 et COL1A2 par le TGF- β

COL1A1. – Par transfection transitoire de fibroblastes NIH/3T3 avec une série de délétions en 5' (– 5300 à – 84 paires de base, pb) du promoteur humain de COL1A1, Jimenez *et al.* ont démontré que l'élément de réponse au TGF- β de COL1A1 était situé entre les positions – 174 pb et – 84 pb par rapport au site d'initiation (+ 1) (Jimenez *et al.*, 1994). Cette région promotrice contient un site Sp1 en position – 84 pb et un site NF-1 en position – 95 pb. Ce dernier site a été également identifié comme jouant un rôle essentiel dans l'expression basale de COL1A1 chez le Rat et la Souris. Sur le promoteur humain, un site AP-1 en position – 165 pb et une séquence semblable à un site Sp1 ("*Sp1-like*") en position – 148 pb ont également été identifiés. Par des expériences de retard sur gel (EMSA) le groupe de Jimenez a démontré que le TGF- β induit la fixation d'un complexe protéique sur le promoteur humain de COL1A1 entre les positions – 164 pb et – 142 pb suggérant que le site "*Sp1-like*", et non le site NF-1 identifié comme étant l'élément de réponse au

TGF- β de COL1A1 chez le Rat, était impliqué dans la régulation de la transcription de COL1A1 par le TGF- β chez l'Homme (Jimenez *et al.*, 1994). Dans la continuité de ces premiers travaux, Gaidarova et Jimenez ont démontré que la mithoxantrone ou le WP631, connus pour prévenir l'accrochage du facteur transcriptionnel Sp1 à l'ADN, inhibent la réponse de COL1A1 au TGF- β dans des fibroblastes dermiques humains (Gaidarova & Jimenez, 2002).

COL1A2. – Concernant le promoteur de COL1A2, les travaux originaux ont montré qu'une région de 135 pb située en position – 330 pb par rapport au site d'initiation (+ 1) était essentielle à la régulation de l'expression de COL1A2 par le TGF- β (Rossi *et al.*, 1988). Cette région promotrice contient deux régions, la boîte A entre les positions – 330 pb et – 286 pb et la boîte B entre les positions – 271 pb et – 255 pb. Un site Sp1 dans la boîte A, responsable en grande partie de l'activité basale du promoteur, et un site AP-1 et un site NF κ B dans la boîte B ont été identifiés (Inagaki *et al.*, 1994; Inagaki *et al.*, 1995).

Par transfection transitoire de fibroblastes dermiques humains avec une série de délétions en 5' (– 3500 à – 108 pb) du promoteur humain de COL1A2, Chung *et al.* ont démontré que l'élément de réponse au TGF- β de COL1A2 était situé entre les positions – 265 pb et – 241 pb par rapport au site d'initiation (+ 1) (Chung *et al.*, 1996). La transfection des cellules avec une construction sur laquelle le site AP-1 était muté a démontré le rôle crucial de ce site dans la réponse du promoteur humain de COL1A2 au TGF- β .

Plus récemment, Chen *et al.* ont montré que les protéines Smad3 et Smad4 étaient essentielles à la réponse du promoteur humain de COL1A2 au TGF- β (Chen *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2000). Par transfection transitoire de fibroblastes dermiques humains avec une série de délétions en 5' du promoteur humain de COL1A2, ces auteurs ont identifié une séquence consensus fonctionnelle pour le complexe protéique Smad3/4 entre les positions – 353 pb et – 148 pb par rapport au site d'initiation (Chen *et al.*, 2000). La coopération entre les facteurs transcriptionnels Sp1 et Smad3 a également été rapportée mais le site d'accrochage du complexe Sp1/Smad3 n'a pas été clairement identifié dans cette étude (Zhang *et al.*, 2000). La coopération entre Sp1 et Smad3 a été auparavant évoquée dans la régulation par le TGF- β du promoteur de p21. Dans ce contexte, Smad3 coopère avec Sp1 pour favoriser la fixation de Sp1 sur son site spécifique sans que Smad3 se fixe directement à l'ADN (Moustakas & Kardassis, 1998). De façon similaire, dans le contexte du promoteur de COL1A2, Poncelet et Schnaper (2001) ont démontré la formation d'un hétérocomplexe Sp1/Smad sur l'ADN entre les positions – 283 pb et – 250 pb, sur une séquence possédant à la fois un site Sp1 et la séquence CAGACA consensus pour Smad3/4. Le rôle majeur du co-activateur p300 a également été démontré dans la régulation de COL1A2 par le TGF- β (Ghosh *et al.*, 2000).

RÉGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DU COLLAGÈNE DE TYPE 1 PAR LE TNF- α

Le TNF- α , synthétisé par les macrophages activés, joue un rôle crucial dans les maladies inflammatoires comme la polyarthrite rhumatoïde ou l'ostéoarthrite (Tracey & Cerami, 1993). Le TNF- α diminue le dépôt des composants de la MEC à la fois en augmentant la synthèse de collagénases interstitielles (MMPs) et en diminuant la synthèse de protéines de structure comme le collagène de type I. Ainsi, le TNF- α s'oppose aux effets du TGF- β dans le contexte de la régulation de l'expression des gènes de la MEC.

Les voies de signalisation du TNF- α

(pour revues Dempsey *et al.*, 2003 ; Gaur & Aggarwal, 2003 ; Papa *et al.*, 2004 ; Chen, 2005 ; Liu, 2005)

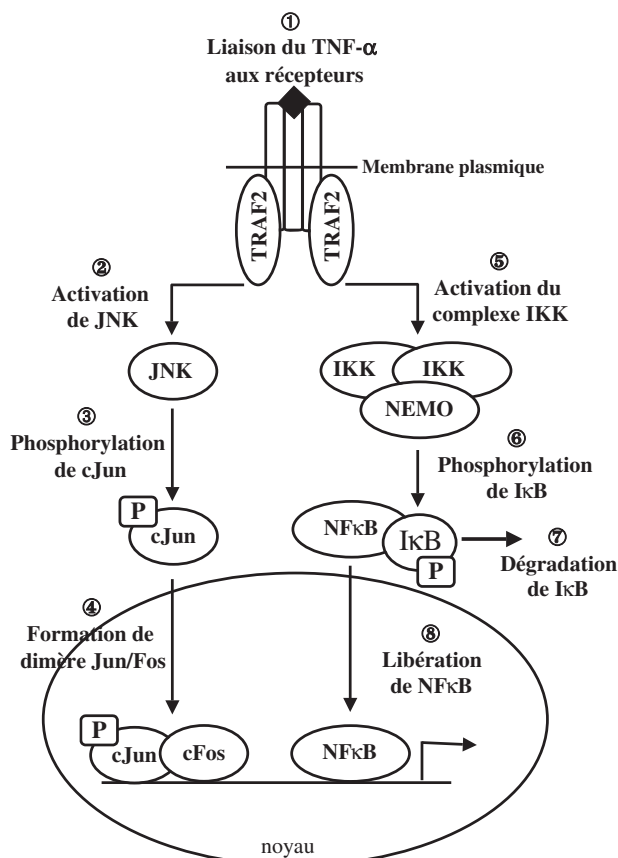


FIG. 3. – Voie de signalisation du TNF- α par les protéines NF κ B ou JNK.

La liaison du TNF- α à ses récepteurs membranaires induit l'activation du complexe IKK qui va alors phosphoryler le complexe inhibiteur I κ B. Cette phosphorylation va induire la dégradation d'I κ B et la libération de NF κ B qui va pouvoir agir comme facteur transcriptionnel. La liaison du ligand à ses récepteurs membranaires permet aussi l'activation des protéines MKK4 et MKK7 qui vont alors activer par phosphorylation JNK. JNK va ensuite stimuler la phosphorylation de cJun et ainsi augmenter son activité transcriptionnelle.

Le TNF- α est capable d'activer deux grandes voies transcriptionnelles, la voie NF κ B et la voie JNK/AP-1 (Fig. 3). La cascade de signalisation du TNF- α est initiée par la fixation du ligand à ses récepteurs membranaires, récepteurs de type 1 ou de type 2 (TNFR1 ou TNFR2). Plusieurs protéines interagissant avec le domaine cytoplasmique de TNFR1 et TNFR2 ont été identifiées ces dernières années. En particulier, deux membres d'un groupe de protéines adaptatrices jouent un rôle essentiel dans la transduction du signal initié par l'activation des récepteurs au TNF, ou à l'IL-1, les protéines TRAF-1 et TRAF-2 (*TNF Receptor-Associated Factor*). TRAF-2, la protéine la mieux caractérisée, joue un rôle crucial dans la transduction du signal depuis TNFR1 jusqu'à NF κ B ou JNK (Dempsey *et al.*, 2003 ; Gaur & Aggarwal, 2003 ; Papa *et al.*, 2004 ; Chen, 2005 ; Liu, 2005).

Le complexe protéique NF κ B est un hétérodimère de facteurs transcriptionnels rendu inactif par sa liaison au complexe inhibiteur I κ B. La liaison du TNF- α à ses récepteurs induit l'activation du complexe IKK composé de IKK α , IKK β et NEMO. Le complexe IKK actif va alors phosphoryler I κ B et ainsi stimuler son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome. Le complexe NF κ B est ainsi libéré et peut agir comme facteur de transcription (Dempsey *et al.*, 2003 ; Gaur & Aggarwal, 2003 ; Papa *et al.*, 2004 ; Chen, 2005 ; Liu, 2005).

JNK est activé par de nombreux stimuli dont la TNF- α . JNK est la cible de deux kinases, MKK4 et MKK7 qui sont les cibles de plusieurs protéines comme TAK-1 (*TGF- β -Activating Kinase*) ou MEKK-1 (*MEK Kinase*). Toutes ces protéines interagissent avec TRAF-2. L'activation par le TNF- α de JNK permet la phosphorylation de cJun, ce qui augmente considérablement son activité transcriptionnelle. Par contre, peu de données existent concernant la capacité du TNF- α à activer d'autres MAP kinases (Dempsey *et al.*, 2003 ; Gaur & Aggarwal, 2003 ; Papa *et al.*, 2004 ; Chen, 2005 ; Liu, 2005).

Régulation transcriptionnelle de COL1A1 et COL1A2 par le TNF- α

COL1A1. – Par transfection transitoire de fibroblastes dermiques humains avec une série de délétions en 5' (– 5300 pb à – 84 pb) du promoteur humain de COL1A1, Mori *et al.* ont démontré que deux régions du promoteur situées respectivement entre – 101 pb et – 97 bp, et entre – 46 pb et – 38 pb par rapport au site d'initiation (+ 1) étaient responsables de la réponse de COL1A1 au TNF- α . Toutefois, les complexes transcriptionnels se fixant sur ces régions du promoteur n'ont pas été identifiés (Mori *et al.*, 1996).

COL1A2. – Les travaux originaux ont montré qu'une région de 135 pb située en position – 330 pb par rapport au site d'initiation était essentielle à la régulation de l'expression de COL1A2 par le TNF- α sans que les facteurs de transcription impliqués dans la réponse au TNF- α et le site de liaison à l'ADN de ces facteurs aient été identifiés (Inagaki *et al.*, 1994 ; Inagaki *et al.*, 1995).

Plus récemment, Kouba *et al.* ont précisément identifié l'élément de réponse au TNF- α du promoteur de COL1A2 (Kouba *et al.*, 1999). Cet élément, situé entre les positions - 271 pb et - 235 pb par rapport au site d'initiation de la transcription, permet la fixation du complexe transcriptionnel NF κ B en réponse au TNF- α . Le rôle crucial de NF κ B dans la réponse de COL1A2 au TNF- α a été confirmé par Verrecchia *et al.* qui ont montré une absence de réponse au TNF- α du promoteur humain de COL1A2 dans des fibroblastes murins KO pour NEMO (Verrecchia *et al.*, 2002).

INHIBITION PAR LE TNF- α DE LA RÉPONSE TRANSCRIPTIONNELLE DE COL1A2 AU TGF- β (Fig. 4)

Au cours de ces dernières années, deux hypothèses ont été émises pour expliquer les mécanismes moléculaires gouvernant l'effet antagoniste du TNF- α sur la réponse au TGF- β d'un promoteur spécifique de Smad3 :

1) le TNF- α *via* la voie de signalisation NF κ B induit l'expression de Smad7 qui bloque la voie de signalisation du TGF- β en empêchant la phosphorylation des R-

Smad par T β RI ou en activant la dégradation des récepteurs membranaires du TGF- β (Bitzer *et al.*, 2000);

2) le TNF- α active la voie JNK et ainsi stimule la phosphorylation de cJun. Cette phosphorylation favorise les interactions protéine/protéine entre Smad3 et cJun qui sont incompatibles avec la fixation de Smad3 sur son élément de réponse.

Chacune de ces hypothèses a été étudiée dans le contexte du contrôle de la régulation de l'expression génique de COL1A2. Aucune augmentation de l'expression de Smad7 induite par le TNF- α n'a été détectée dans des fibroblastes dermiques. De plus, l'utilisation d'un vecteur antisens pour Smad7 ou d'un vecteur dominant négatif pour IKK- α n'a pas permis de bloquer l'inhibition, par le TNF- α , de la réponse au TGF- β de COL1A2 ou d'un promoteur spécifiquement Smad-dépendant. Ainsi, ces études démontrent que, dans des fibroblastes dermiques, l'antagonisme entre TGF- β et TNF- α ne résulte pas d'une augmentation de la production de Smad7 *via* NF κ B (Verrecchia *et al.*, 2000). L'utilisation de fibroblastes dermiques embryonnaires de souris KO pour NEMO a permis de confirmer cette observation et d'éliminer définitivement l'hypothèse d'une inhibition de la réponse au TGF- β induite par le TNF- α , par induction de Smad7 *via* NF κ B (Verrecchia *et al.*, 2003). Par contre, l'utilisation d'un vecteur dominant négatif pour MKK4 bloque l'effet inhibiteur du TNF- α sur la réponse au TGF- β de COL1A2 dans des fibroblastes dermiques. Cet effet est partiellement réversé par l'utilisation d'un vecteur d'expression pour MKK7 suggérant que ces deux MAP-kinases, dont JNK1 et JNK2 sont des substrats, jouent un rôle central dans l'effet inhibiteur du TNF- α sur la réponse de COL1A2 au TGF- β (Verrecchia *et al.*, 2002). L'utilisation de fibroblastes dermiques embryonnaires de souris KO pour JNK1 et JNK2 a permis de montrer qu'en absence de JNK, le TNF- α n'exerce plus son effet inhibiteur sur la réponse de COL1A2 au TGF- β . Cet effet est réversé par la surexpression de JNK1 suggérant un rôle central de JNK1 dans l'antagonisme TNF- α /TGF- β (Verrecchia *et al.*, 2002). Par ailleurs, l'effet du TNF- α sur la réponse au TGF- β est mimé par cJun et JunB mais pas ATF2 (activating transcription factor-2), trois substrats de JNK1 et JNK2 renforçant l'importance des interactions transcriptionnelles Smad/AP-1 dans le contrôle des interactions fonctionnelles TGF- β /TNF- α (Verrecchia *et al.*, 2003). En absence de cJun fonctionnel (fibroblastes JunAA), JunB se substitue à cJun et permet l'inhibition par le TNF- α de la réponse au TGF- β d'un promoteur Smad dépendant. Le TNF- α induit alors la phosphorylation de JunB *via* JNK et permet l'interaction avec Smad3 qui ne peut plus se fixer à son élément de réponse (Verrecchia *et al.*, 2003). L'ensemble de ces résultats a permis de montrer l'importance des interactions Smad/AP-1 et le rôle central de JNK dans l'antagonisme entre TGF- β et TNF- α sur le contrôle de l'expression génique de promoteurs Smad dépendants tel que COL1A2 (Verrecchia *et al.*, 2000; Verrecchia *et al.*, 2001a, b; Verrecchia & Mauviel, 2002a, b; Verrecchia *et al.*, 2002; Verrecchia *et al.*, 2003; Verrecchia & Mauviel, 2004).

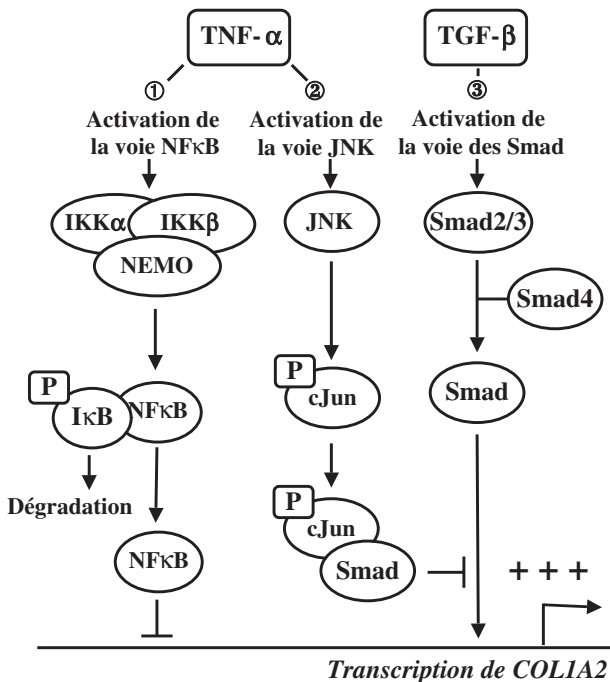


FIG. 4. – Interactions fonctionnelles entre le TNF- α et le TGF- β dans la régulation transcriptionnelle de COL1A2.

Une même cytokine, le TNF- α , peut réguler la transcription d'un même gène, COL1A2, par deux voies de signalisation différentes selon l'état d'activation des cellules. En absence de TGF- β , le TNF- α utilise la voie NF κ B pour réprimer l'expression basale de COL1A2. En présence de TGF- β , qui induit l'expression de COL1A2, le TNF- α utilise la voie JNK/AP-1 pour s'opposer aux effets du TGF- β .

PERSPECTIVES

L'accumulation excessive de composants de la MEC, en particulier de collagène de type I, est une des principales causes du développement des fibroses tissulaires. Plusieurs agents pharmacologiques ont été testés ces dernières années pour leur effet sur le métabolisme du collagène. Certains de ces agents sont actuellement testés en clinique, mais malheureusement aucun de ces agents n'a, à ce jour, prouvé son efficacité. Dans ce contexte, une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires gouvernant la modulation de l'expression du collagène de type I par le TGF- β devrait permettre à terme de définir de nouvelles stratégies thérapeutiques contre les effets délétères du TGF- β . Une approche pourrait consister à cibler JNK. En effet, JNK activé bloque la voie de signalisation du TGF- β par les Smads en favorisant les interactions entre Smad3 et cJun et empêche ainsi les protéines Smad3 de se fixer sur leur élément de réponse. Dans ce contexte, Wendling *et al.* (2003) ont pu montrer que le 5-fluorouracile, utilisé à titre d'essai dans le traitement des chéloïdes, inhibe la réponse de COL1A2 au TGF- β grâce à sa capacité à activer la voie de signalisation JNK/AP-1.

BIBLIOGRAPHIE

- Akiyoshi S., Inoue H., Hanai J., Kusanagi K., Nemoto N., Miyazono K. & Kawabata M., c-Ski acts as a transcriptional co-repressor in transforming growth factor- β signaling through interaction with smads. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274, 35269-35277.
- Bitzer M., von Gersdorff G., Liang D., Dominguez-Rosales A., Beg A. A., Rojkind M. & Bottinger E. P., A mechanism of suppression of TGF- β /SMAD signaling by NF- κ B/RelA. *Genes Dev.*, 2000, 14, 187-197.
- Bornstein P. & Sage H., Regulation of collagen gene expression. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 1989, 37, 67-106.
- Chen S. J., Yuan W., Lo S., Trojanowska M. & Varga J., Interaction of smad3 with a proximal smad-binding element of the human α 2(I) procollagen gene promoter required for transcriptional activation by TGF- β . *J. Cell Physiol.*, 2000, 183, 381-392.
- Chen S. J., Yuan W., Mori Y., Levenson A., Trojanowska M. & Varga J., Stimulation of type I collagen transcription in human skin fibroblasts by TGF- β : involvement of Smad3. *J. Invest. Dermatol.*, 1999, 112, 49-57.
- Chen X., Weisberg E., Fridmacher V., Watanabe M., Naco G. & Whitman M., Smad4 and FAST-1 in the assembly of activin-responsive factor. *Nature*, 1997, 389, 85-89.
- Chen Z. J., Ubiquitin signalling in the NF- κ B pathway. *Nat. Cell Biol.*, 2005, 7, 758-765.
- Chung K. Y., Agarwal A., Uitto J. & Mauviel A., An AP-1 binding sequence is essential for regulation of the human α 2(I) collagen (COL1A2) promoter activity by transforming growth factor- β . *J. Biol. Chem.*, 1996, 271, 3272-3278.
- Dempsey P. W., Doyle S. E., He J. Q. & Cheng G., The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2003, 14, 193-209.
- Dennler S., Itoh S., Vivien D., ten Dijke P., Huet S. & Gauthier J. M., 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, 3091-3100.
- Derynck R. & Zhang Y. E., Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling. *Nature*, 2003, 425, 577-584.
- Ebisawa T., Fukuchi M., Murakami G., Chiba T., Tanaka K., Imamura T. & Miyazono K., Smurf1 interacts with transforming growth factor- β type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 12477-12480.
- Feng X. H. & Derynck R., Specificity and Versatility in TGF- β Signaling through smads. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2005 (sous presse).
- Gaidarova S. & Jimenez S. A., Inhibition of basal and transforming growth factor- β -induced stimulation of COL1A1 transcription by the DNA intercalators, mitoxantrone and WP631, in cultured human dermal fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277, 38737-38745.
- Gaur U. & Aggarwal B. B., Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochem. Pharmacol.*, 2003, 66, 1403-1408.
- Ghosh A. K., Factors involved in the regulation of type I collagen gene expression: implication in fibrosis. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, 2002, 227, 301-314.
- Ghosh A. K., Yuan W., Mori Y. & Varga J., Smad-dependent stimulation of type I collagen gene expression in human skin fibroblasts by TGF- β involves functional cooperation with p300/CBP transcriptional coactivators. *Oncogene*, 2000, 19, 3546-3555.
- Hua X., Liu X., Ansari D. O. & Lodish H. F., Synergistic cooperation of TFE3 and smad proteins in TGF- β -induced transcription of the plasminogen activator inhibitor-1 gene. *Genes Dev.*, 1998, 12, 3084-3095.
- Huse M., Chen Y. G., Massague J. & Kuriyan J., Crystal structure of the cytoplasmic domain of the type I TGF- β receptor in complex with FKBP12. *Cell*, 1999, 96, 425-436.
- Imamura T., Takase M., Nishihara A., Oeda E., Hanai J., Kawabata M. & Miyazono K., Smad6 inhibits signalling by the TGF- β superfamily. *Nature*, 1997, 389, 622-626.
- Inagaki Y., Truter S. & Ramirez F., Transforming growth factor- β stimulates α 2(I) collagen gene expression through a cis-acting element that contains an Sp1-binding site. *J. Biol. Chem.*, 1994, 269, 14828-14834.
- Inagaki Y., Truter S., Tanaka S., Di Liberto M. & Ramirez F., Overlapping pathways mediate the opposing actions of tumor necrosis factor- α and transforming growth factor- β on α 2(I) collagen gene transcription. *J. Biol. Chem.*, 1995, 270, 3353-3358.
- Jimenez S. A., Varga J., Olsen A., Li L., Diaz A., Herhal J. & Koch J. Functional analysis of human α 1(I) procollagen gene promoter. Differential activity in collagen-producing and -nonproducing cells and response to transforming growth factor- β -1. *J. Biol. Chem.*, 1994, 269, 12684-12691.
- Jonk L. J., Itoh S., Heldin C. H., 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, 21145-21152.
- Kouba D. J., Chung K. Y., Nishiyama T., Vindevoghel L., Kon A., Klement J. F., Uitto J. & Mauviel A., Nuclear factor- κ B mediates TNF- α inhibitory effect on α 2(I) collagen (COL1A2) gene transcription in human dermal fibroblasts. *J. Immunol.*, 1999, 162, 4226-4234.
- Labbe E., Silvestri C., Hoodless P. A., Wrana J. L. & Attisano L., Smad2 and Smad3 positively and negatively regulate TGF- β -dependent transcription through the forkhead DNA-binding protein FAST2. *Mol. Cell*, 1998, 2, 109-120.
- Liu Z. G., Molecular mechanism of TNF signaling and beyond. *Cell Res.*, 2005, 15, 24-27.
- Mori K., Hatamochi A., Ueki H., Olsen A. & Jimenez S. A., The transcription of human α 1(I) procollagen gene (COL1A1) is

- suppressed by tumour necrosis factor- α through proximal short promoter elements: evidence for suppression mechanisms mediated by two nuclear-factor-binding sites. *Biochem. J.*, 1996, 319, 811-816.
- 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, 6733-6738.
- Nishihara A., Hanai J., Imamura T., Miyazono K. & Kawabata M., E1A inhibits transforming growth factor- β signaling through binding to Smad proteins. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274, 28716-28723.
- Nishihara A., Hanai J. I., Okamoto N., Yanagisawa J., Kato S., Miyazono K. & Kawabata M., Role of p300, a transcriptional coactivator, in signalling of TGF- β . *Genes Cells*, 1998, 3, 613-623.
- Papa S., Zazzeroni F., Pham C. G., Bubici C. & Franzoso G., Linking JNK signaling to NF- κ B: a key to survival. *J. Cell Sci.*, 2004, 117, 5197-5208.
- Poncelet A. C. & Schnaper H. W., Sp1 and Smad proteins cooperate to mediate transforming growth factor- β 1-induced α 2(I) collagen expression in human glomerular mesangial cells. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 6983-6992.
- Rossi P., Karsenty G., Roberts A. B., Roche N. S., Sporn M. B. & de Crombrughe B., A nuclear factor 1 binding site mediates the transcriptional activation of a type I collagen promoter by transforming growth factor- β . *Cell*, 1998, 52, 405-414.
- Shi Y. & Massague J., Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, 2003, 113, 685-700.
- ten Dijke P. & Hill C. S., New insights into TGF- β -Smad signaling. *Trends Biochem. Sci.*, 2004, 29, 265-273.
- Tracey K. J. & Cerami A., Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 1993, 9, 317-343.
- Trojanowska M., LeRoy E. C., Eckes B. & Krieg T., Pathogenesis of fibrosis: type I collagen and the skin. *J. Mol. Med.*, 1998, 76, 266-274.
- Tsakazaki T., Chiang T. A., Davison A. F., Attisano L. & Wrana J. L., SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGF- β receptor. *Cell*, 1998, 95, 779-791.
- Uitto J. & Kouba D., Cytokine modulation of extracellular matrix gene expression: relevance to fibrotic skin diseases. *J. Dermatol. Sci.*, 2000, 24 (Suppl. 1), S60-S69.
- Verrecchia F. & Mauviel A., Control of connective tissue gene expression by TGF- β : role of Smad proteins in fibrosis. *Curr. Rheumatol. Rep.*, 2002a, 4, 143-149.
- Verrecchia F. & Mauviel A., Transforming growth factor- β signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation. *J. Invest. Dermatol.*, 2002b, 118, 211-215.
- Verrecchia F. & Mauviel A., TGF- β and TNF- α : antagonistic cytokines controlling type I collagen gene expression. *Cell Signal.*, 2004, 16, 873-880.
- Verrecchia F., Pessah M., Atfi A. & Mauviel A., Tumor necrosis factor- α inhibits transforming growth factor- β /Smad signaling in human dermal fibroblasts via AP-1 activation. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, 30226-30231.
- Verrecchia F., Tacheau C., Schorpp-Kistner M., Angel P. & Mauviel A., Induction of the AP-1 members c-Jun and JunB by TGF- β /Smad suppresses early Smad-driven gene activation. *Oncogene*, 2001a, 20, 2205-2211.
- Verrecchia F., Tacheau C., Wagner E. F. & Mauviel A., A central role for the JNK pathway in mediating the antagonistic activity of pro-inflammatory cytokines against transforming growth factor- β -driven SMAD3/4-specific gene expression. *J. Biol. Chem.*, 2003, 278, 1585-1593.
- Verrecchia F., Vindevoghel L., Lechleider R. J., Uitto J., Roberts A. B. & Mauviel A., Smad3/AP-1 interactions control transcriptional responses to TGF- β in a promoter-specific manner. *Oncogene*, 2001b, 20, 3332-3340.
- Verrecchia F., Wagner E. F. & Mauviel A., Distinct involvement of the Jun-N-terminal kinase and NF- κ B pathways in the repression of the human COL1A2 gene by TNF- α . *EMBO Rep.*, 2002, 3, 1069-1074.
- Vindevoghel L., Lechleider R. J., Kon A., de Caestecker M. P., Uitto J., Roberts A. B. & Mauviel A., SMAD3/4-dependent transcriptional activation of the human type VII collagen gene (COL7A1) promoter by transforming growth factor- β . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95, 14769-14774.
- Wendling J., Marchand A., Mauviel A., Verrecchia F., 5-fluorouracil blocks transforming growth factor- β -induced α 2 type I collagen gene (COL1A2) expression in human fibroblasts via c-Jun NH2-terminal kinase/activator protein-1 activation. *Mol. Pharmacol.*, 2003, 64, 707-713.
- Wong C., Rougier-Chapman E. M., Frederick J. P., Datto M. B., Liberati N. T., Li J. M. & Wang X. F., Smad3-Smad4 and AP-1 complexes synergize in transcriptional activation of the c-Jun promoter by transforming growth factor- β . *Mol. Cell Biol.*, 1999, 19, 1821-1830.
- Wotton D., Lo R. S., Swaby L. A. & Massague J., Multiple modes of repression by the Smad transcriptional corepressor TGIF. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274, 37105-37110.
- Wrana J. L., Attisano L., Wieser R., Ventura F. & Massague J., Mechanism of activation of the TGF- β receptor. *Nature*, 1994, 370, 341-347.
- Xiao Z., Liu X. & Lodish H. F., Importin β mediates nuclear translocation of Smad 3. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, 23425-23428.
- Yagi K., Goto D., Hamamoto T., Takenoshita S., Kato M. & Miyazono K., Alternatively spliced variant of Smad2 lacking exon 3. Comparison with wild-type Smad2 and Smad3. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274, 703-709.
- Yanagisawa J., Yanagi Y., Masuhiro Y., Suzawa M., Watanabe M., Kashiwagi K., Toriyabe T., Kawabata M., Miyazono K. & Kato S., Convergence of transforming growth factor- β and vitamin D signaling pathways on SMAD transcriptional coactivators. *Science*, 1999, 283, 1317-1321.
- Zawel L., Dai J. L., Buckhaults P., Zhou S., Kinzler K. W., Vogelstein B. & Kern S. E., Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators. *Mol. Cell*, 1998, 1, 611-617.
- Zhang W., Ou J., Inagaki Y., Greenwel P. & Ramirez F., Synergistic cooperation between Sp1 and Smad3/Smad4 mediates transforming growth factor- β -1 stimulation of α 2(I)-collagen (COL1A2) transcription. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, 39237-39245.