



HAL
open science

TIF1gamma, nouveau régulateur négatif de la voie de signalisation du TGFbeta

Laurent Fattet

► **To cite this version:**

Laurent Fattet. TIF1gamma, nouveau régulateur négatif de la voie de signalisation du TGFbeta. Biologie cellulaire. Université Claude Bernard - Lyon I, 2013. Français. NNT: 2013LYO10038 . tel-01169709

HAL Id: tel-01169709

<https://theses.hal.science/tel-01169709>

Submitted on 30 Jun 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° Ordre : 38 - 2013
Année 2013

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE BMIC

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 28 mars 2013

par

Laurent FATTET

TITRE :

**TIF1 γ , NOUVEAU REGULATEUR NEGATIF DE LA VOIE
DE SIGNALISATION DU TGF β**

JURY :

Pr Alain PUISIEUX (Président du Jury)
Dr Marc PIECHACZYK (Rapporteur)
Dr Célio POUPONNOT (Rapporteur)
Dr Jean-Jacques FEIGE (Examineur)
Dr Paul-Henri ROMEO (Examineur)
Dr Ruth RIMOKH (Directrice de thèse)

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Vice-président du Conseil Scientifique

Secrétaire Général

M. François-Noël GILLY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Philippe LALLE

M. le Professeur Germain GILLET

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Administrateur provisoire : M. le Professeur G. KIRKORIAN

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

Département Sciences de la Terre

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. le Professeur F. De MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Directeur : Mme le Professeur H. PARROT

Directeur : M. N. SIAUVE

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : Mme S. FLECK

Directeur : Mme la Professeure I. DANIEL

Directeur : M. C. COLLIGNON

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. P. FOURNIER

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. C. VITON

Directeur : M. R. BERNARD

Directeur : Mme la Professeure V. MAUME-DESCHAMPS

Remerciements

Avant que vous ne commenciez à lire ma thèse (parce que si vous en êtes aux remerciements c'est que vous allez enchaîner sur les quelques 200 pages qui suivent !!!), je tiens à vous remercier tous et en particulier...

... **les membres du Jury**, dont le Pr Alain Puisieux pour avoir accepté de présider mon jury, ainsi que Dr Paul-Henri Roméo, Dr Marc Piechaczyk et Dr Célio Pouponnot pour avoir accepté de juger mon travail de thèse. Je tiens à remercier tout particulièrement le Dr Jean-Jacques Feige pour avoir suivi l'avancée de ma thèse, pour avoir accepté de juger mon travail de thèse et pour m'avoir grandement aidé dans ma recherche de Postdoc.

... **Ruth** bien sûr, pour m'avoir encadré et pour m'avoir permis de participer à plusieurs projets, collaborations qui m'ont permis de me diversifier et d'ouvrir ma vision au delà de TIF1γ. Tu auras été ma « maman » scientifique pendant ces 5 années au cours desquelles je me suis construit en tant que chercheur même s'il me reste beaucoup de travail ! Merci pour toutes ces discussions, scientifiques ou pas, et pour tous tes conseils qui m'ont beaucoup apporté depuis mon M2. J'espère t'avoir rendu la pareille en te dépannant quand tu avais des soucis avec ton iPhone ou ton Mac ! Merci aussi de m'avoir laissé faire du monitorat, en prenant du temps sur ma thèse, j'ai pu ainsi me rendre compte par moi-même que je ne voulais faire QUE de la recherche.

... toute **la nouvelle équipe RRGG**, et oui il n'y a plus de RR et de GG, il n'y a plus de rouges et de jaunes, il n'y a plus de Kanak et de Mowak, la réunification a eu lieu il y a 2 ans ! Il ne reste plus beaucoup d'ex-RR, mais merci à Cédric, dit le brésilien de Clermont, pour ton expertise murine ainsi que pour tes théories et explications rocambolesques mais passionnantes. Merci Thibaut pour toutes tes vanes encore plus pourries que les miennes et pour m'avoir fait découvrir le monde de l'ovaire ! Merci à Stéphane pour ton aide précieuse et merci de t'être acharné sur feu-RBPMS, je ne pensais pas qu'une énigme pouvait te résister ! Merci Ivan pour les multiples fois où je t'ai demandé des conseils ou des outils. Merci Rudy, le king de la migration, pour la petite blague du matin qui donne bien envie de vomir, j'oublierai jamais tes « tu veux des bisous ? » ! Merci les gars Ben et Julien, les biochimistes de l'extrême, pour vos conseils et vos connaissances impressionnantes. Vous êtes vraiment cools pour des gens qui travaillent sur le Zébra ! et je suis sûr que vous irez loin comme on dit. C'est bave hein ? ! Et j'oubliais AN qui m'a fait découvrir les pizzas de Lorenzo. Merci aussi à Philippe, Jonathan et Germain, bref une belle équipe. Mathieu, tu m'as bien fait rire pendant cette période de rédaction tu es de loin mon meilleur M2 (rien à voir avec le fait que tu sois mon premier) et en plus tu gères les présentations en anglais comme personne ! Je ne sais pas si je serai là quand tu passeras la *** mais en tout cas je te souhaite de faire partie des *** winners (à prononcer à la Soleilmane)

... **les Corbo** avec qui on forme un peu aussi une grande équipe (mais chacun garde ses plaques de WB !). Vous êtes toujours serviables et sympathiques, à l'image de votre italienne de chef. Merci Laura d'être toujours souriante, tes « Et alorrrrs ? » vont me manquer !

... **les « 2013, année de la thèse »** dont Coralie la fouine, future compatriote, et fournisseur officiel de conseils duolink, merci d'être toujours aussi gaffeuse et curieuse ! Oui Dr Chapi je te mets dans cette section parce qu'on a commencé tout ça tous ensemble ! Et Clément qui m'impressionne aussi bien dans un labo que dans la neige la nuit en asics. Merci grâce à toi j'ai appris à souffrir et à me dépasser, je tenterai la croqueuse un de ces jours !

... **l'ISPB** et surtout Stéphanie, Caroline et Marie, vous m'avez permis de tester mes aspirations pédagogiques pendant 3 années au cours desquelles j'ai pu apprécier vos qualités humaines et pédagogiques.

... **les meilleurs du Cheney A** dont Dardenne, tu m'as appris plein de choses sur l'éssipage...euh non l'épissage ! Tu es vraiment quelqu'un de bien, je te souhaite une grande carrière. J'espère qu'on aura rapidement l'occasion de golfer avec l'océan Pacifique comme obstacle d'eau ! Marion toi aussi tu mérites une belle thèse aussi remplie que ton dressing, et je te remercie pour tous les films pourris que je n'aurai jamais découverts sans toi ! Du Cheney A au CMU il n'y a qu'un pas, merci mon ami suisse d'être là, d'être toi, une personne sur qui je peux compter, bref je te souhaite plein de bonnes choses mon p'tit Joey. J'ai qu'une chose à dire : prenez vos billets d'avion !

... ceux que j'ai côtoyés, au 4^{ème} et ailleurs, qui m'ont aidé, que j'ai aidés, comme Cécile, Muriel, Farida, Juliette, Soleilmane, Thibault (ou l'homme qui dit « Salut » 15 fois par jour !), Elo, Rémi, Chloé, Ribogab, tous les moutons, Julie, Paul, Evelyne, Sophie, Christophe, Annabelle...et Marie pour m'avoir fait découvrir les joies des ateliers de l'IHOP... et les anciens Anne-So, Alexia, Karen, Didine, Guigui...

... ma p'tite **Kolytch**, on a partagé de bons moments quand tu étais encore ici, et de bonnes pintes et du bon sauc' quand tu es devenue Dr ! Merci de toujours me soutenir et de toujours avoir les mots qui vont bien, les Hauts-Savoyards sont quand même géniaux !

... mes deux grosses **peutates**, dont Berth, ma grimpeuse préférée, avec qui on passe toujours de bons moments depuis les bancs de la fac, et Flo qui m'a montré la voie de la sagesse en bouclant magistralement une thèse de GlucNac ! Bravo mon ami je te rejoins bientôt. Et surtout ne changez pas, je vous kiffe !

... tous ceux qui ne comprennent pas trop pourquoi je viens de passer 5 ans à mélanger des Sumos et des cellules mais qui sont heureux de me voir heureux, je vous aime tous et je vous remercie de m'encourager jour après jour, maman, papa, Cyril et toute ma famille, ainsi que toute ma belle-famille, la confiance team et leur super-sucre !

... et bien sûr **Emilie**, je te remercie d'être là depuis 5 ans, de me supporter même pendant cette période de stress et sache que « la distance rend toute chose infiniment plus précieuse ».

La thèse c'est comme le golf,
« le golf n'est pas un jeu où il faut se presser, il faut laisser entrer en soi la richesse du sport » (Catherine Lacoste)

RÉSUMÉ

Le TGF β intervient dans la régulation de nombreux processus cellulaires comme la prolifération, la différenciation, la migration, l'apoptose, du développement embryonnaire jusqu'à la vie adulte. Le TGF β est aujourd'hui bien décrit pour son rôle de suppresseur de tumeur de par ses activités anti-prolifératives et pro-apoptotiques, en particulier sur les cellules épithéliales. Cependant, au cours de la progression tumorale, le TGF β devient un promoteur de tumeur en favorisant l'angiogenèse, l'échappement de la tumeur vis-à-vis du système immunitaire et en induisant la transition épithélio-mésenchymateuse.

Après fixation du ligand TGF β , le complexe de récepteurs active les protéines cytoplasmiques Smad2 et Smad3 qui s'associent à Smad4 pour former le complexe transcriptionnel qui se transloque alors dans le noyau pour réguler la transcription de nombreux gènes cibles. Récemment, la protéine TIF1 γ a été décrite pour intervenir dans la régulation négative de la voie du TGF β , en monoubiquitinant Smad4 ou en interagissant avec Smad2/3 en compétition avec Smad4.

Cette voie de signalisation devant être finement contrôlée pour cibler son action en fonction du contexte cellulaire, nous analysons ici la régulation des interactions fonctionnelles entre la voie canonique du TGF β et la protéine TIF1 γ . Dans cette étude, nous montrons que TIF1 γ agit comme un régulateur négatif des fonctions de Smad4 dans la voie de signalisation du TGF β au cours du processus de transition épithélio-mésenchymateuse et au cours de la différenciation terminale des cellules épithéliales mammaires et de la lactation. Nous étudions également la SUMOylation de TIF1 γ comme nouveau niveau de régulation de la réponse cellulaire au TGF β . Nous avons ainsi caractérisé les sites fonctionnels de SUMOylation de TIF1 γ et montré que cette modification post-traductionnelle inhibe la formation du complexe transcriptionnel Smad et est nécessaire pour réguler temporellement la résidence de Smad4 au niveau du promoteur de gènes cibles du TGF β . Nos résultats montrent le rôle important de la SUMOylation de TIF1 γ dans la régulation de la transition épithélio-mésenchymateuse induite par le TGF β .

En conclusion, notre travail met en avant le rôle majeur de TIF1 γ dans la régulation de la réponse transcriptionnelle au TGF β . De plus, nous montrons que la SUMOylation de TIF1 γ est nécessaire à son activité répressive sur Smad4.

ABSTRACT

TIF1 γ , a new negative regulator of TGF β signaling

The cytokine TGF β regulates several cellular processes such as proliferation, differentiation, migration and apoptosis, from embryonic development to adulthood. TGF β is well described for its tumor suppressor role through antiproliferative and proapoptotic activities, in particular in epithelial cells. During tumor progression however, TGF β becomes a tumor promotor, favoring angiogenesis, immune suppression and inducing the epithelio-mesenchymal transition.

Binding of TGF β ligand to its receptors activate cytoplasmic messenger Smad2 and Smad3 to complex with Smad4 and shuttle into the nucleus to regulate TGF β target genes expression. Recently, TIF1 γ has been described as a new negative regulator of TGF β signaling, through monoubiquitination of Smad4 or direct competition with Smad4 to bind activated Smad2/3.

This signaling pathway has to be finely tuned to target an action dependent on a cellular context, which is why we analyze here the regulation of functional interactions between the TGF β canonical signaling and TIF1 γ . In this study, we show that TIF1 γ acts as a negative regulator of Smad4 functions in TGF β signaling during the epithelio-mesenchymal transition and during terminal differentiation of mammary epithelial cells and lactation. We are also interested in studying TIF1 γ SUMOylation as additional level of regulation of cell response to TGF β . Thus we characterized four functional SUMOylation sites in TIF1 γ and we found that this post-translational modification inhibits the formation of Smads transcriptional complex and is needed to temporally restrict Smad4 residence on the promoter of TGF β target genes. Our results show the critical role of TIF1 γ SUMOylation in the regulation of TGF β -induced epithelio-mesenchymal transition.

As a conclusion, our study unveils the major role of TIF1 γ in the regulation of TGF β transcriptional responses. Moreover, we show that TIF1 γ requires SUMOylation to exert its repressive activity on TGF β signaling.

Mots-clés

TGF β

TIF1 γ

Smad4

SUMOylation

Signalisation

Transition épithélio-mésenchymateuse

Progression tumorale

Lactation

Key words

TGF β

TIF1 γ

Smad4

SUMOylation

Signaling

Epithelio-mesenchymal transition

Tumor progression

Lactation

Abbréviations

A

ADAM : *A disintegrin and metalloproteinase*

ADN : Acide désoxyribonucléique

ALK : *Activin receptor-like kinase*

AMH : *Anti-müllerian hormone*

APL : *Acute promyelocytic leukemia*

ARE : *Activin response element*

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ARNpolIII : ARN polymérase II

B

BMP : *Bone morphogenetic protein*

C

C/EBP : *CCAAT/Enhancer binding protein*

cAMP : *cyclic Adenosin monophosphate*

CBP : *CREB binding protein*

CDK : *Cyclin-dependent kinase*

ChIP : *Chromatin immunoprecipitation*

CMML : *Chronic myelomonocytic leukemia*

c-Myc : *Myelocytomatosis oncogene*

CRC : *Colorectal cancer*

D

DNMT : *DNA methyl-transferase*

Dpp : *Decapentaplegic*

E

E2F : *E2F transcription factor 1*

EGF : *Epidermal growth factor*

ER : *Estrogen receptor*

F

FGF : *Fibroblast growth factor*

FGFR : *Fibroblast growth factor receptor*

G

GADD : *Growth arrest and DNA damage protein*

GDF : *Growth and differentiation factor*

GDNF : *Glial cell-derived neurotrophic factor*

GTP : *Guanosine tri-phosphate*

H

HA : *Hemagglutinine*

HAT : *Histone acetyl-transferase*

HCC : *Hepatocellular carcinoma*

HDAC : *Histone deacetylase*

HMT : *Histone methyl-transferase*

HP : *Heterochromatin protein*

J

JNK : *cJun N-terminal kinase*

K

KAP-1 : *KRAB-ZFP associated protein 1*

KRAB-ZFP : *Krüppel associated box*

L

LAP : *Latency associated peptide*

LKB1 : *Liver kinase B1*

LTBP : *Latent TGF β 1-binding protein*

M

MAD : *Mother against Dpp*

MAPK : *Mitogen activated protein kinase*

MDM2 : *Mouse double minute chromosome 2*

MH : *Mad homology*

miRNA : *microRNA*

MMP : *Matrix metalloproteinase*

MMTV : *Mouse mammary tumor virus*

N

N-CoR : Nuclear hormone receptor corepressor

NK : Natural killer

NLS : Nuclear localization signal

O

ORF : Open reading frame

P

PAI : Plasminogen activator inhibitor

P/CAF : p300/CBP associated factor complex

PDAC : Pancreatic ductal adenocarcinoma

PDGF : Platelet derived growth factor

PHD : Plant homeodomain

PI3K : Phosphoinositide 3-kinase

PIAS : Protein inhibitor of activated STAT

PML : Promyelocytic leukemia

PR : Progesterone receptor

PRL : Prolactine

PTEN : Phosphatase and tensin homolog

R

RAR : Retinoic acid receptor

Ras : Rat Sarcoma viral oncogene homologue

RBCC : RING, B boxes, Coiled Coil

RET : Rearranged during transfection

RFG : Ret-fused gene

RING : Really interesting new gene

ROS : Reactive oxygen species

RXR : Retinoid X receptor

S

SARA : Smad anchor for receptor activation

SBE : Smad binding element

SH : Src homology

shARN : Small hairpin ARN

siARN : Small interfering ARN

SIK : Salt-inducible kinase

Smad : Sma / Mothers against decapentaplegic

SOCS : Suppressor of cytokine signaling

SUMO : Small ubiquitin-like modifier

T

TAK1 : TGF β activated kinase 1

T β RI(-II) : Type I(-II) TGF β receptor

TEM : Transition épithélio-mésenchymateuse

TERT : Telomerase reverse transcriptase

TGF : Transforming growth factor

TIF : Transcription intermediary factor

TME : Transition mésenchymato-épithéliale

TOR : Target of rapamycin

TRAF : TNF-receptor-associated factor

TRIM : Tripartite motif

TRAP : TNF receptor associated protein

TRIP : TGF β receptor interacting protein

TSP : Thrombospondine

TSS : TIF1 signature sequence

U

USP : Ubiquitin-specific processing protease

UTR : Untranslated

V

VEGF : Vascular endothelial growth factor

W

WAP : Whey acidic protein

Wnt : Wingless

WWP : WW domain-containing protein

Table des matières

RESUME	5
ABSTRACT	6
INTRODUCTION	12
I - LA SUPERFAMILLE DU TGFβ.....	12
<i>A - Les différents membres</i>	<i>12</i>
A – 1 - La famille du TGF β	13
A – 2 - Le TGF β 1	14
<i>B - La voie canonique du TGFβ.....</i>	<i>17</i>
B – 1 - Les récepteurs au TGF β	17
B – 2 - Les différentes Smads.....	18
B – 3 - Structure des protéines Smad.....	18
B – 4 - Activation, translocation nucléaire et activité transcriptionnelle.....	20
<i>C - Les voies indépendantes des Smads.....</i>	<i>23</i>
II - REGULATION DE LA VOIE DE SIGNALISATION DU TGFβ.....	25
<i>A - Les différents niveaux de régulation.....</i>	<i>25</i>
A – 1 - Régulation extracellulaire	25
A – 2 - Régulation au niveau des récepteurs	25
Phosphorylation des récepteurs au TGF β	25
Ubiquitination des récepteurs au TGF β	26
Formation de l'hétérocomplexe et recrutement des Smads	27
La dynamique membranaire régule l'activité des récepteurs	29
A – 3 - Régulation de l'activation des Smads	30
Après phosphorylation canonique	30
Par phosphorylation réversible du domaine Linker.....	31
Par acétylation	32
Par les Smad inhibitrices.....	33
Par l'ubiquitination.....	33
Par la SUMOylation.....	34
Les cofacteurs transcriptionnels	36
<i>B - Le régulateur TIF1γ.....</i>	<i>38</i>
B – 1 - La famille TRIM/RBCC	38
B – 2 - La famille des protéines TIF1	39
Une structure conservée.....	39
Régulation de la transcription	39
B – 3 - Implication de TIF1 γ dans la voie de signalisation du TGF β	41
B – 4 - Implication de TIF1 γ dans l'hématopoïèse.....	45
B – 5 - Implication de TIF1 γ dans la tumorigenèse	48
B – 6 - Implication de TIF1 γ en virologie et immunologie	51

III - LE TGF β ET LE DEVELOPPEMENT TUMORAL	53
<i>A - Effets supresseurs de tumeur</i>	53
A – 1 - Effet cytostatique	54
A – 2 - Induction de l'apoptose.....	56
A – 3 - Effets sur le stroma.....	56
<i>B - Effets promoteurs de tumeur</i>	58
B – 1 - Effets sur le stroma tumoral.....	59
B – 2 - Echappement à la surveillance immunitaire.....	59
B – 3 – Angiogenèse.....	60
B – 4 - Transition épithélio-mésenchymateuse.....	62
IV - CONCLUSION	67
V - ÉTAT DE LA QUESTION ET OBJECTIFS DE TRAVAIL	69
RESULTATS ET DISCUSSION	71
I - PUBLICATIONS	71
<i>Article 1 : Antagonistic regulation of EMT by TIF1γ and Smad4 in mammary epithelial cells ...</i>	71
Résumé.....	71
Article	73
<i>Article 2 : Dynamic regulation of TGFβ signaling by TIF1γ : a computational approach.....</i>	98
Résumé.....	98
Article	100
<i>Article 3 : TIF1γ requires SUMOylation to exert its repressive activity on TGFβ signaling</i>	118
Résumé.....	118
Article	120
<i>Article 4 : TIF1γ is essential for the terminal differentiation of mammary alveolar epithelial cells and for lactation through Smad4 inhibition.....</i>	152
Résumé.....	152
Article	156
II - DISCUSSION.....	169
BIBLIOGRAPHIE	181

INTRODUCTION

I - La superfamille du TGF β

Depuis la découverte du premier membre de la superfamille du Transforming Growth Factor β au début des années 1980, de très nombreux autres membres ont été identifiés et caractérisés chez les Vertébrés et les Invertébrés. Chez les Mammifères, la famille du TGF β régule différentes fonctions cellulaires telles que la croissance cellulaire, la différenciation, l'adhésion, la migration et l'apoptose. Le TGF β joue un rôle essentiel durant le développement embryonnaire, notamment pour la spécification des différents feuilletts ectodermique, mésodermique et endodermique, et également un rôle important pendant la vie adulte. Les rôles pléiotropes des membres de la superfamille du TGF β font que ces molécules sont associées à de nombreuses pathologies comme la fibrose rénale ou hépatique, des maladies auto-immunes, différents syndromes et jouent un rôle majeur dans le développement de cancers.

A - Les différents membres

La superfamille du TGF β regroupe un grand nombre de facteurs présentant des homologies de séquence et de structure, qui agissent comme des régulateurs multifonctionnels d'une pléiade de processus biologiques. Le premier membre, identifié en 1982, a été appelé TGF β pour sa capacité à induire (ou « transformer ») la croissance de colonies de fibroblastes murins NIH3T3 en culture en agar mou (Anzano *et al*, 1982). Depuis, plus de 40 membres de cette famille ont été décrits (Figure 1), avec leur structure commune caractéristique composée de sept résidus Cystéine au sein de leur domaine actif, ce qui correspond à la région carboxy-terminale. Cet arrangement d'acides aminés permet la formation d'une structure secondaire caractéristique : trois ponts disulfure au sein du peptide et un autre pont disulfure permettant la dimérisation.

La comparaison des séquences des domaines biologiquement actifs des différents membres a permis de réaliser une classification de la superfamille du TGF β (Tableau 1) qui inclut les Bone Morphogenetic Protein BMP4 et BMP2 (ainsi que son homologue chez la Drosophile, Dpp) et tous les autres membres qui divergent de cette sous-famille. La sous-

famille BMP5 est impliquée dans le développement et la neurogenèse, la sous-famille GDF5 (Growth and Differentiation Factor 5) régule la formation des cartilages, la sous-famille Vg1 régule l'induction du mésoderme (Kingsley, 1994), la sous-famille BMP3 est impliquée dans la différenciation et la formation des os, les membres intermédiaires qui comprennent Nodal joueraient un rôle complémentaire aux BMPs durant l'embryogenèse (Hogan, 1996), la sous-famille des Activines et celle des TGF β auraient plutôt un rôle tardif durant l'embryogenèse et dans l'organisme mature. Les membres de la famille TGF β agiraient comme inhibiteurs de la prolifération des cellules épithéliales, mais aussi comme modulateurs de la réponse immunitaire, des fonctions hématopoïétiques et d'autres processus biologiques (Massague, 1998). Les Activines, découvertes pour leur rôle dans le développement de l'axe endocrinien et reproductif, sont aussi impliquées dans la prolifération cellulaire, l'apoptose et la carcinogenèse (Chen *et al*, 2006b). La superfamille du TGF β comprend également la famille des membres distants comprenant l'AMH (Anti-Müllerian Hormone ou MIS pour Müllerian Inhibiting Substance), l'inhibine α et le GDNF (Glial cell-Derived Neurotrophic Factor), impliqués respectivement dans la régulation de l'axe reproductif ou de la survie neuronale.

A – 1 - La famille du TGF β

À ce jour six membres ont été décrits (TGF β 1 à 6) et présentent un degré d'homologie variable (de 70 à 80%). Seules les isoformes TGF β 1, TGF β 2 et TGF β 3 sont exprimées chez les Mammifères, le TGF β 1 étant le plus commun et exprimé de manière ubiquitaire, alors que les autres isoformes présentent une expression plus restreinte. Par exemple, le TGF β 4 serait spécifiquement exprimé chez le poulet et TGF β 5 chez le Xénope (Kondaiah *et al*, 1990), ce qui suggère que ces deux isoformes seraient des orthologues du TGF β 1 humain (Burt & Law, 1994; Halper *et al*, 2004). Le TGF β 6 a récemment été identifié chez le Poisson, son expression dans le muscle squelettique étant régulée par l'état de nutrition (Funkenstein *et al*, 2010).

Les différentes isoformes sont encodées par des gènes distincts et leurs expressions sont régulées à la fois suivant le stade de développement et suivant le tissu. Le gène *TGF β 1* est localisé au niveau du locus 19q13 (Fujii *et al*, 1986), le *TGF β 2* au niveau du locus 1q41 (Barton *et al*, 1988) et le *TGF β 3* au niveau du locus 14q24 (Barton *et al*, 1988; Dijke *et al*, 1988). L'ARN messager (ARNm) du TGF β 1 est exprimé dans les cellules endothéliales, les cellules hématopoïétiques et les cellules du tissu conjonctif ; l'ARNm du TGF β 2 est

exprimé dans les cellules épithéliales et neuronales ; et l'ARNm du TGF β 3 est surtout exprimé dans les cellules mésenchymateuses. Pendant le développement, les TGF β 1 et TGF β 3 sont exprimés rapidement dans les structures subissant la morphogenèse, et le TGF β 2 est exprimé plus tardivement dans les épithélia différenciés et matures (Taipale *et al*, 1998). Ces trois isoformes sont fortement conservées chez les Mammifères, ce qui suggère une fonction biologique importante pour chacune des isoformes. Ces isoformes diffèrent dans leur affinité de liaison pour les récepteurs au TGF β , et la délétion des différentes isoformes chez la souris se traduit par différents phénotypes. L'inactivation du gène *tgfb1* est embryonnaire létale ou conduit à l'apparition de syndromes auto-immuns et multi-inflammatoire au niveau du cœur, des poumons et de l'estomac, induisant la mort des embryons dans les trois semaines après leur naissance (Shull *et al*, 1992). L'inactivation du gène *tgfb2* est également embryonnaire létale ou provoque des cyanoses ou des malformations sévères et fatales des organes vitaux (Sanford *et al*, 1997). L'inactivation du gène *tgfb3* induit de sérieuses malformations cranio-faciales et pulmonaires et se traduit par une mort rapide des souriceaux (Kartinen *et al*, 1995). De plus, des polymorphismes dans le gène *tgfb3* sont liés à des malformations du palais chez l'Homme (Lidral *et al*, 1998).

A – 2 - Le TGF β 1

L'ADN complémentaire du TGF β 1 a été cloné puis séquencé par l'équipe de Derynck en 1985 à partir de plaquettes sanguines (Derynck *et al*, 1985). Le gène *TGF β 1*, localisé au niveau du locus 19q13, est constitué de 7 exons et 6 introns (Derynck *et al*, 1987). L'étude des régions promotrices du gène *TGF β 1* a montré l'implication du facteur de transcription dimérique AP-1 (composé des protéines c-Fos et c-Jun) dans la régulation de la boucle d'auto-induction du TGF β 1 (Kim *et al*, 1990). De plus, les niveaux intracellulaires d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) réguleraient l'activité d'AP-1, notamment pour le contrôle des niveaux de TGF β 1 (González-Ramos *et al*, 2012). Récemment, l'équipe de Fraser a identifié un mécanisme de régulation post-transcriptionnel médié par un microARN (miR-744) qui ciblerait la partie 3'-non-traduite (3'-UTR) de l'ARNm du TGF β 1 (Martin *et al*, 2011).

Comme tous les autres membres de la famille, le TGF β 1 est synthétisé en tant que domaine carboxy-terminal d'une forme précurseur qui est clivée, avant sécrétion, dans la cellule (Figure 2). Ainsi, la plupart des cellules sécrètent un TGF β 1 sous une forme

biologiquement inerte : le pré-pro-TGF β 1. Ce propeptide de 390 acides aminés est rapidement clivé et séparé de la séquence signal de 29 acides aminés (Figure 2). Ensuite, la N-glycosylation de trois sites (résidus 82, 136 et 176) permet la sécrétion du propeptide de 361 acides aminés. Dans l'appareil de Golgi, une endopeptidase de type furine convertase réalise le clivage entre les résidus 278 et 279 (motif de clivage R-H-R-R) pour donner le monomère de TGF β 1 de 112 acides aminés qui est capable de se dimériser pour former l'homodimère actif de 25kDa (Dubois *et al*, 1995). La partie N-terminale clivée est également capable de s'homodimériser, grâce à la formation de ponts disulfure, pour former le LAP (Latency Associated Peptide). L'association du dimère de TGF β 1 et du LAP par des liaisons hydrogènes non-covalentes permet la mise en place du petit complexe latent (Figure 2), nécessaire à la sécrétion, au transport et à la protection du TGF β 1 (Lopez *et al*, 1992; Sha *et al*, 1991). Bien que LAP soit détruit dans le processus d'activation du TGF β 1, cette protéine conserve son effet de piéger le TGF β 1, comme le montre l'expression de protéine LAP recombinante ou son injection dans la souris qui inhibe l'action endogène du TGF β 1 (Böttinger *et al*, 1996).

Le troisième composant du complexe latent est une glycoprotéine soluble de haut poids moléculaire nommée LTBP (Latent TGF β 1-Binding Protein) liée à LAP ; l'ensemble forme le grand complexe latent. La LTBP n'est pas requise pour la latence du complexe mais serait importante pour le repliement du TGF β 1, la sécrétion, le stockage et l'ancrage dans la matrice extracellulaire et l'activation du complexe latent (Annes *et al*, 2003; Miyazono *et al*, 1991). La LTBP existe sous différentes formes générées par épissage alternatif de deux gènes : les formes courte et longue de LTBP-1 (Olofsson *et al*, 1995) et LTBP-2 (Moren *et al*, 1994). La LTBP se structure en répétitions EGF (Epidermal Growth Factor) et en motifs riches en résidus Cystéines (8 résidus Cystéine) organisés de manière à former des structures fibrillaires permettant la liaison à LAP par ponts disulfure (Lack *et al*, 2003) et à d'autres protéines de la matrice extracellulaire (Figure 3) telles que le collagène, la fibronectine, l'élastine ou la fibrilline (Saharinen *et al*, 1996; Isogai *et al*, 2003; Unsöld *et al*, 2001; Zilberberg *et al*, 2012).

Les mécanismes d'activation du TGF β latent, qui est une étape cruciale pour permettre à cette cytokine d'exercer son rôle biologique, sont encore mal définis. Plusieurs facteurs ont été impliqués dans ce processus, comme la cascade d'activation des plasminogènes, la thrombospondine (TSP-1) ou l'addition de mannose-6-phosphate (Man-6-P) (Ghahary *et al*, 1999). Récemment, cette dernière voie a été mise en doute par une étude biochimique

montrant que l'activation du TGF β 1 latent n'est pas liée directement à l'addition de Man-6-P (Barnes *et al*, 2012). La voie de la TSP-1 semble être privilégiée ; il s'agit d'une protéine homotrimérique sécrétée capable d'activer *in vitro* et *in vivo* le TGF β latent grâce à des modifications conformationnelles de LAP (Schultz-Cherry & Murphy-Ullrich, 1993; Crawford *et al*, 1998). La voie des intégrines serait également importante pour l'activation de la cytokine. En effet, une étude biophysique montre que la force cellulaire permettrait l'activation du TGF β latent grâce à la transmission mécanique entre LAP, la matrice extracellulaire et les intégrines de forte affinité pour LAP (Buscemi *et al*, 2011). Enfin, la libération du dimère de TGF β 1 actif peut aussi être réalisée par l'action d'enzymes de type plasmines (Lyons *et al*, 1990) ou de métalloprotéinases de type MMP2 ou MMP9 (Yu & Stamenkovic, 2000).

L'expression ubiquitaire des récepteurs au TGF β nécessite un contrôle fin des mécanismes d'activation du TGF β . Ces données assurent le maintien d'un pool de TGF β inactif dans la matrice extracellulaire, qui peut facilement être activé pour permettre une réponse rapide des cellules sans synthèse *de novo*.

B - La voie canonique du TGFβ

La voie classique permettant la transduction du signal apporté par le ligand TGFβ jusque dans le noyau, appelée voie de signalisation canonique du TGFβ, fait intervenir les protéines Smad. Dès 1995, il a été montré que la mutation du gène *mad* chez la Drosophile réprimait le morphogène Dpp (Decapentaplegic), homologue du TGFβ, chez l'embryon. Ce gène code pour la protéine MAD (Mother Against Dpp) qui est requise pour transmettre l'information en aval des récepteurs à Dpp (Sekelsky *et al*, 1995). Parallèlement des études chez le Nématode *Caenorhabditis elegans* ont permis d'identifier des mutants *sma* présentant le même phénotype que les mutants *daf-4* (codant pour l'homologue du récepteur au TGFβ de type 1). Il a ainsi été suggéré que les protéines Sma interviennent dans la cascade de signalisation en aval des récepteurs (Savage *et al*, 1996). Par la suite, au moins huit gènes homologues à *Mad* et *sma* ont été identifiés chez le Xénope, la Souris et l'Homme. Le nom « Smad » a alors été introduit pour désigner les homologues de *Mad* et *sma* chez les Vertébrés. Les 8 membres de la famille de protéines Smad identifiés chez les Mammifères ont été organisés en trois groupes suivant leur structure et leurs fonctions.

B – 1 - Les récepteurs au TGFβ

La transduction du signal TGFβ nécessite la collaboration de deux types de récepteurs. Il existe donc le récepteur de type I ou TβRI, également appelé ALK5 (Activin receptor-Like Kinase 5) et le récepteur de type II (TβRII). Il existe différentes isoformes pour chacun des récepteurs (7 isoformes pour TβRI et 5 isoformes pour TβRII), ayant toutes une structure commune composée d'un domaine N-terminal extracellulaire riche en résidus Cystéine, une région transmembranaire et un domaine C-terminal intracellulaire possédant l'activité Sérine/Thréonine kinase caractéristique. La transduction du signal TGFβ est également régulée par différents co-récepteurs tels que le récepteur de type III (TβRIII ou β-glycan) ou l'Endogline qui modulent la disponibilité du ligand et la réponse des récepteurs.

Le ligand TGFβ va pouvoir initier un signal intracellulaire en liant un complexe hétérotétramérique constitué de deux récepteurs TβRI et deux récepteurs TβRII. Pour cela, la liaison du ligand TGFβ sous forme dimérique stabilise l'interaction d'un dimère de TβRII avec deux molécules de TβRI. Ce rapprochement permet aux domaines kinase de TβRII de phosphoryler les domaines GS (domaine riche en résidus Glycine et Sérine)

juxtamembranaires de T β RI. À l'état basal, l'inhibiteur FKBP12 (FK506 Binding Protein) est associé au domaine GS du récepteur T β RI et le maintient dans un état inactif (Chen *et al*, 1997). La trans-phosphorylation de T β RI par T β RII déclenche un changement conformationnel de T β RI, qui active le domaine kinase de T β RI et parallèlement relève l'inhibition par FKBP12. Le domaine GS de T β RI ainsi phosphorylé définit alors une surface d'interaction avec le domaine MH2 des protéines Smad2 et Smad3 (Figure 4).

B – 2 - Les différentes Smads

Le sous-groupe des protéines Smad régulées par les récepteurs (R-Smad) comprend les protéines Smad2 et Smad3 pour la voie de signalisation du TGF β et les protéines Smad1, Smad5 et Smad8 pour la voie des BMP qui sont respectivement les substrats des récepteurs T β RI et BMPRI (Type I BMP Receptor). Les récepteurs de type I activés par le ligand extracellulaire recrutent les R-Smads et, grâce à leur activité kinase, phosphorylent leur extrémité C-terminale pour permettre la transduction du signal (Attisano & Wrana, 1998; Massague, 1998).

La protéine Smad4 constitue un sous-groupe appelé Co-Smad (Common-Smad) et est commune à la signalisation du TGF β , des Activines et des BMP. Structuralement proche des R-Smads, la protéine Smad4 ne possède pas la séquence située en C-terminal nécessaire à la phosphorylation par les récepteurs. Smad4 sert de partenaire protéique aux R-Smads activées en formant un complexe hétéro-trimérique stable responsable de la transduction du signal dans le noyau (Zhang *et al*, 1996; Lagna *et al*, 1996).

Enfin, les protéines Smad6 et Smad7 appartiennent au sous-groupe des I-Smads (Inhibitory-Smad). Ces protéines divergent des autres Smads, tant au niveau de la structure de leurs régions N-terminales que de leurs fonctions dans la signalisation. En effet, les protéines Smad6 et Smad7 inhibent les voies des BMP, des Activines et du TGF β en empêchant notamment le recrutement et l'activation des R-Smads par les récepteurs (Imamura *et al*, 1997; Nakao *et al*, 1997a).

B – 3 - Structure des protéines Smad

Les protéines Smad sont structurées en deux domaines d'homologie en N-terminal et en C-terminal, appelés respectivement domaines MH1 et MH2 (Mad-Homology), reliés par un domaine *Linker*, riche en résidus Proline, peu conservé (Figure 5). Ces domaines, qui ne

présentent aucun module protéique déjà caractérisé, n'ont pas d'activité enzymatique intrinsèque mais fonctionnent en contrôlant les interactions entre les protéines et/ou avec l'ADN.

Le domaine MH1, très conservé mais absent des protéines I-Smad, confère aux R-Smads leur capacité à lier l'ADN. Par exemple, la structure tridimensionnelle du domaine MH1 de la protéine Smad3 révèle 4 hélices α , 6 feuillets β et 5 boucles qui permettent un repli globulaire compact capable de fixer le grand sillon de l'ADN (Shi *et al*, 1998). Ainsi, le complexe R-Smads/Co-Smad activé peut reconnaître au niveau des promoteurs de gènes cibles du TGF β des éléments de réponses spécifiques appelés SBE (Smad Binding Element), composés de cinq paires de bases (CAGAC). Il a cependant été montré que la protéine Smad2, bien que possédant le domaine MH1, ne peut pas lier directement l'ADN, du fait de la présence d'une courte séquence de 30 acides aminés qui empêche la formation de la structure en épingle à cheveux à la liaison à l'ADN (Dennler *et al*, 1999). Cette différence entre Smad2 et Smad3 pourrait expliquer les effets pléiotropes du TGF β . Le domaine MH1 permet également aux R-Smads d'interagir avec des co-régulateurs transcriptionnels, ce qui pourraient leur permettre de réguler des gènes cibles différents selon le contexte. Le domaine MH1 est enfin caractérisé par la présence du NLS (Nuclear Localization Signal) qui est responsable de la translocation nucléaire du complexe R-Smads/Co-Smad activé pour réguler la transcription de gènes cibles (Reguly & Wrana, 2003). De plus, une caractéristique intéressante du domaine MH1 est son rôle d'inhibition de la transduction du signal à l'état basal. En effet, il a été rapporté qu'en absence de TGF β , les domaines MH1 et MH2 peuvent interagir, ce qui provoque un repliement des R-Smads, empêchant la formation d'hétéro-oligomères avec Smad4 (Hata *et al*, 1997). La phosphorylation par T β RI serait nécessaire et suffisante pour relever cette inhibition (Massague, 1998).

Le domaine MH2 est le domaine effecteur de la transduction du signal puisqu'il est responsable de l'activité d'activation de la transcription des Smads (Liu *et al*, 1996). Ce domaine régit également les interactions avec de nombreuses protéines comme le récepteur au TGF β de type I, la protéine adaptatrice SARA ou des co-régulateurs transcriptionnels tels que P300/CBP ou Ski. Une caractéristique importante du domaine MH2 est qu'il comprend le site de phosphorylation par le récepteur T β RI à l'extrémité C-terminale (Nakao *et al*, 1997b). La phosphorylation du motif SSXS des R-Smads par T β RI est le déclencheur de la transduction du signal jusque dans le noyau. Ce motif SXSS, spécifique des R-Smads, est absent de la séquence de Smad4 et des I-Smads, qui ne peuvent pas être phosphorylées par T β RI. Les R-

Smads alors activées peuvent, grâce à leur domaine MH2, former un hétéro-oligomère avec la Co-Smad Smad4 qui pénètre dans le noyau.

Enfin, le domaine *Linker*, peu conservé entre les différentes Smads, contient plusieurs sites de phosphorylation par les protéines des voies non-canoniques telles que des MAPK, responsables de l'inhibition de l'activité des Smads. Un motif riche en résidus Proline, appelé motif PY, est cependant conservé entre différentes Smads et permet l'interaction avec des protéines régulatrices telles que l'ubiquitine ligase Smurf1 (Zhu *et al*, 1999).

B – 4 - Activation, translocation nucléaire et activité transcriptionnelle

La présence du ligand TGF β dans le milieu extracellulaire entraîne le recrutement et la phosphorylation de T β RI par T β RII. Le signal apporté par le TGF β doit alors être transduit jusqu'au noyau grâce à une cascade d'évènements qui nécessite la coopération entre R-Smads et Co-Smad (Figure 6). Dans un premier temps, la phosphorylation du motif SXSS par T β RI activé déclenche le dépliement des domaines N-terminal et C-terminal des R-Smads qui, ainsi activées, peuvent se complexer à Smad4 pour former un complexe hétéro-trimérique (Chacko *et al*, 2004). Il y a alors translocation du complexe actif dans le noyau grâce à la collaboration directe de protéines constituant les pores de l'enveloppe nucléaire telles que des nucléoporines (Xu *et al*, 2002).

Dans le noyau, le complexe actif va cibler les promoteurs des gènes cibles. La liaison directe des Smads à l'ADN a été montrée pour Smad3 et Smad4 (Dennler *et al*, 1998). Cependant, les protéines Smad lient l'ADN avec une faible affinité et une faible spécificité, c'est pourquoi elles ont de nombreux partenaires nucléaires pour réguler de manière spécifique et efficace la transcription des gènes cibles du TGF β . Il semble de plus en plus évident que la régulation de la transcription d'un gène dépend d'un code promoteur, lu par plusieurs co-régulateurs qui interagissent. Ainsi, à proximité des SBE, on retrouve fréquemment des séquences conservées qui sont ciblées par des protéines appartenant au complexe de régulation transcriptionnelle comprenant les Smads. Ainsi, parmi les centaines de gènes cibles du TGF β dans une cellule donnée, seulement quelques uns peuvent être régulés par une combinaison entre le complexe Smad et un partenaire particulier. Les partenaires des Smads apportent donc quatre niveaux de spécificité au complexe transcriptionnel : la spécificité du gène cible, la spécificité de la voie de signalisation, la

spécificité du type cellulaire et la spécificité de l'effet transcriptionnel (activation ou répression) (Tableau 2).

Le premier co-régulateur identifié est la protéine FoxH1 (ou FAST-1 Forkhead Activin Signal Transducer) qui interagit de manière spécifique, grâce à une séquence riche en résidus Proline appelée SIM et un motif spécifique, avec le domaine MH2 des protéines Smad2 et Smad3 (Germain *et al*, 2000). Au sein du complexe, la protéine FoxH1 est indispensable pour la liaison au niveau du promoteur du gène *mix2* en réponse à l'Activine pendant la formation du mésoderme chez le Xénope (Chen *et al*, 1998b; Liu *et al*, 1997). De manière intéressante, la protéine FoxH1 n'aurait aucune activité transcriptionnelle intrinsèque mais serait un adaptateur essentiel à la transcription de gènes cibles impliqués dans le développement embryonnaire (Zhou *et al*, 1998). Trois autres membres de la famille Forkhead (FoxO1, FoxO3 et FoxO4) servent également de partenaires transcriptionnels de Smad3 pour activer la transcription des inhibiteurs des CDK (Cyclin-Dependent Kinase) tels que p21^{CIP1} (Seoane *et al*, 2004). Dans ce cas, l'interaction se fait grâce au domaine MH1 de Smad3.

Depuis, la liste des partenaires des Smads s'est rapidement allongée, notamment avec des protéines qui possèdent une activité transcriptionnelle propre et pouvant s'associer à l'ADN de manière indépendante des Smads. Par exemple, la famille RUNX de facteurs de liaison à l'ADN, comprenant Runx1, Runx2 et Runx3, permet de former un complexe transcriptionnel avec Smad2, Smad3 et Smad4 pour activer spécifiquement le promoteur du gène *IgC α* dans les lymphocytes B (Hanai *et al*, 1999) ou le promoteur du gène *osteocalcin* dans les ostéoblastes (Alliston *et al*, 2001). En plus de la variété de facteurs disponibles pour le complexe Smads actif, le contexte cellulaire est essentiel. Le complexe AP-1 (comportant les protéines c-Jun et c-Fos) peut interagir avec les Smads pour réguler la transcription de plusieurs gènes dont *c-jun*. De manière intéressante, alors que les complexes AP-1 et Smads doivent lier des sites adjacents sur l'ADN pour réguler les gènes *collagenase-1/MMP1* ou *interleukin-11*, ils peuvent agir en synergie à partir de sites promoteurs distants pour le gène *c-jun* (Wong *et al*, 1999). Dans ce cas, l'interaction physique entre les complexes AP-1 et Smads ne serait pas requise.

La régulation transcriptionnelle dépendante du TGF β nécessiterait donc le recrutement de différents partenaires par le complexe Smad activé comme les membres de la famille E2F pour la répression de *c-myc* dans les cellules épithéliales (Chen *et al*, 2002) ou le facteur Sp1 pour l'induction des inhibiteurs des CDK p15^{INK4A} ou p21^{CIP1} (Pardali *et al*, 2000). Il existe cependant quelques gènes possédant assez de copies de SBE dans leur promoteur pour que

leur transcription soit activée par le complexe Smad seul. C'est le cas de *smad7* et de *PAI-1* dont les promoteur contiennent respectivement deux et trois SBE palindromiques (Denissova *et al*, 2000; Dennler *et al*, 1998). Bien que l'activation complète du promoteur de *smad7* nécessite des co-facteurs des Smads tels que AP-1 ou Sp1, l'idée que les protéines Smads activées puissent faire naître, seules, la boucle de rétrocontrôle négatif de la voie du TGF β , apportée par Smad7, est intéressante. Il est à noter que certains promoteurs, comme le promoteur de p21^{CIP1}, peuvent contenir jusqu'à quatre copies de SBE dans la région de réponse au TGF β mais nécessitent toutefois la participation de FoxO et des Smads activées (Seoane *et al*, 2004).

C - Les voies indépendantes des Smads

Le ligand TGF β peut également se détourner de la voie canonique et activer des voies de signalisation indépendantes des protéines Smads à partir du complexe tétramérique T β RI-T β RII (Figure 7).

Le récepteur au TGF β peut ainsi servir de plateforme pour l'initiation de la voie de signalisation Erk-MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase). L'autophosphorylation de trois résidus Tyrosine de T β RII activé par le TGF β permet le recrutement de différentes protéines adaptatrices impliquées dans l'activation de la voie Erk-MAPK, comme les protéines à domaine SH2 (Src Homology 2) telles que la kinase Src. La phosphorylation de la Tyrosine 284 par Src permet de recruter les protéines adaptatrices Shc (Sh2 domain containing protein) et Grb2 (Growth factor receptor binding protein 2) et de relier ainsi la voie du TGF β à l'activation de la voie p38 MAPK (Gallier & Schiemann, 2007). De manière intéressante, les niveaux d'expression et les ratios des tétramères T β RI/T β RII seraient importants pour déterminer la spécificité du complexe activé (Huang *et al*, 2011), comme cela a été démontré dans les cellules du derme et de l'épiderme qui ont des niveaux d'expression différents en T β RI et T β RII induisant des réponses différentes (Bandyopadhyay *et al*, 2011). Le récepteur de type I peut également utiliser son activité Tyrosine kinase intrinsèque pour phosphoryler directement Shc qui recrute Grb2 et SOS (Son Of Sevenless) pour activer la voie Erk-MAPK (Lee *et al*, 2007).

La protéine TAK1 (qui est une MAP Kinase Kinase Kinase) est un acteur important de l'activation de la voie p38 MAPK par le TGF β . Le TGF β active TAK1 par l'activation catalytique de l'ubiquitine ligase TRAF6 (TNF-Receptor-Associated Factor 6) (Landström, 2010). L'interaction entre T β RI activé et TRAF6 est requise pour l'autoubiquitination de TRAF6 induite par le TGF β et la poly-ubiquitination de TAK1 sur la Lysine 63 (Sorrentino *et al*, 2008). TAK1 ainsi activé va phosphoryler MKK3/6 (MAP Kinase Kinase 3/6), conduisant à l'activation de p38. TAK1 est également impliqué dans l'activation de la kinase LKB1 (Liver Kinase B1) qui inhibe la réponse cellulaire au TGF β en induisant la dégradation de T β RI et la phosphorylation de Smad4 sur la Thréonine 77 afin d'inhiber sa liaison à l'ADN (Moren *et al*, 2010).

Dans l'activation de ces voies non canoniques, Smad7 agit cependant comme une protéine adaptatrice en s'associant avec les protéines TAK1, MKK3 et p38 MAPK pour faciliter l'activation de la cascade TAK1-p38 MAPK dans les cellules de cancer de la prostate

conduisant à leur apoptose (Heldin *et al*, 2009). Smad7 peut aussi lier la β -caténine, qui est l'acteur clé de la voie de signalisation oncogénique Wnt, et dont la translocation nucléaire dépend de Smad7 et de p38 MAPK (Edlund *et al*, 2005).

Le TGF β est connu pour activer la voie PI3K-Akt (PhosphoInositide 3-Kinase). Les récepteurs de type I et II seraient requis pour cette activation, notamment grâce à l'interaction entre T β RI et la sous-unité p85 de PI3K (Yi *et al*, 2005). Il a été montré récemment que le TGF β régulerait la voie mTOR (Target Of Rapamycin), suggérant que le TGF β utilise cette voie de PI3K pour agir sur la survie, le métabolisme, la migration et l'invasion cellulaire (Lamouille & Derynck, 2011).

La petite GTPase RhoA permet de maintenir l'état épithélial des cellules en régulant le maintien des jonctions serrées. Le TGF β , via l'activation de T β RII et la phosphorylation directe de Par6, permet le recrutement de l'ubiquitine ligase Smurf1 qui cible RhoA au protéasome pour dégradation et régule ainsi la plasticité cellulaire (Ozdamar, 2005). La TEM induite par le TGF β , dépendante largement de la transcription des gènes clés par Smad4, serait donc également favorisée par cette voie dépendante de Par6 et de RhoA qui permet la perte des jonctions intercellulaires.

II - Régulation de la voie de signalisation du TGF β

A - Les différents niveaux de régulation

A – 1 - Régulation extracellulaire

Il existe un niveau de régulation supplémentaire aux phases de sécrétion et d'activation du TGF β latent décrites précédemment. Plusieurs molécules extracellulaires sont capables de contrôler l'activité du TGF β par liaison directe.

Les protéoglycanes (comprenant les protéoglycanes, la décorine, la fibromoduline et le biglycane) sont une classe de protéines extracellulaires pouvant lier le TGF β . En particulier, la décorine lie directement le TGF β activé et neutralise son action biologique suivant un processus qui serait à l'origine d'une forme majeure de maladie du rein chez l'Homme (Border *et al*, 1992). La fibromoduline peut aussi être un modulateur de l'activité du TGF β pendant la cicatrisation chez l'adulte (Soo *et al*, 2000).

Une glycoprotéine homotétramérique de haut poids moléculaire, appelée α_2 -Macroglobuline (α_2 -M), lie le TGF β actif avec une forte affinité et le piège (O'Connor-McCourt & Wakefield, 1987; Feige *et al*, 1996). Les souris invalidées pour l' α_2 -M présentent des réponses anormales à différents stimuli, récapitulant un effet de l' α_2 -M sur le TGF β *in vivo* (Umans *et al*, 1995). L' α_2 -M est également un antagoniste direct du TGF β et serait impliqué dans la modulation de la cinétique ligand/récepteur (Webb *et al*, 1996).

A – 2 - Régulation au niveau des récepteurs

Phosphorylation des récepteurs au TGF β

Outre le fait que ces protéines soient des kinases, les récepteurs au TGF β peuvent également être des substrats phosphorylés par d'autres facteurs qui régulent ainsi leurs activités (Wrighton *et al*, 2009).

Le récepteur T β RII est constitutivement actif mais peut toutefois subir une autophosphorylation ; la phosphorylation des résidus Sérine 213 et Sérine 409 étant

essentielle pour son activité kinase alors que la phosphorylation de la Sérine 416 aurait plutôt une action inhibitrice (Luo & Lodish, 1997).

L'activation du récepteur T β RI nécessite la phosphorylation par T β RII de son domaine GS (TTSGSGSG) ; la mutation de seulement deux résidus de ce motif inhibe l'activité kinase de T β RI et l'activation des Smads (Wieser *et al*, 1995). T β RI peut aussi être phosphorylé au niveau de la Sérine 165. De manière intéressante, la mutation de ce résidu Sérine n'a pas d'effet sur l'activité transcriptionnelle des Smads (expression de gènes rapporteurs) mais régule l'effet du TGF β sur la prolifération, l'apoptose et la formation de matrice extracellulaire (Souhelnyskyi *et al*, 1996). Cette étude a identifié plusieurs autres résidus Sérine capable d'être phosphorylés mais la fonction de ces phosphorylations n'est pas claire.

Les récepteurs au TGF β sont des Sérine/Thréonine kinases mais aussi des Tyrosine kinases. Il a été rapporté que T β RII peut être autophosphorylé sur les résidus Tyrosine 259, 336 et 424, et la phosphorylation de ces Tyrosines semble indispensable à l'activité kinase de T β RII (Lawler *et al*, 1997).

La phosphorylation étant un processus réversible, il existe des phosphatases, comme par exemple la sous-unité catalytique de la phosphatase 1 (PP1c), capable de déphosphoryler T β RI. PP1c, grâce à la collaboration de Smad7 et de la sous-unité régulatrice de PP1 GADD34 (Growth Arrest and DNA Damage protein 34), serait un moyen d'exercer un rétrocontrôle négatif pour inhiber le voie de signalisation du TGF β (Shi *et al*, 2004). T β RI peut aussi être déphosphorylé par la phosphatase PP2A ; la sous-unité régulatrice B α de PP2A stabiliserait T β RI alors que la sous-unité B δ inhiberait son activité kinase (Batut *et al*, 2008).

Ubiquitination des récepteurs au TGF β

Les récepteurs au TGF β sont substrats d'autres modifications post-traductionnelles comme l'ubiquitination, conduisant à la dégradation des récepteurs par le protéasome (Lönn *et al*, 2009). L'ubiquitination fait intervenir un set d'enzymes d'activation E1, de conjugaison E2 et de ligation E3 nécessaires à l'addition covalente de résidus Ubiquitine au niveau de sites spécifiques d'un substrat protéique. Dans le cas de T β RI, il semble que Smad7, un membre des Smads inhibitrices, soit requis pour recruter des ligases E3 telles que Smurf1, Smurf2, NEDD4-2 ou WWP1 (WW domain-containing Protein 1) au niveau du récepteur et induire

l'ubiquitination et la dégradation du récepteur (Ebisawa *et al*, 2001; Kavsak *et al*, 2000; Kuratomi *et al*, 2005; Komuro *et al*, 2004). L'ubiquitination de T β RI est contrôlée par de nombreuses protéines ; la kinase SIK (Salt-Inducible Kinase) active cette modification de T β RI en favorisant l'interaction avec Smad7, fonctionnant comme une boucle de rétrocontrôle négatif de la voie du TGF β (Kowanetz *et al*, 2008). Il en est de même pour les protéines AIP4 (Atrophin1-Interacting Protein 4) et YAP65 (Yes-Associated Protein 65) (Lallemand *et al*, 2005; Ferrigno *et al*, 2002). D'autres protéines au contraire, comme la protéine chaperonne Hsp90 (90-kDa Heat-Shock Protein), inhibent l'ubiquitination dépendante de Smad7 en s'associant à T β RI et T β RII (Wrighton *et al*, 2008). La régulation de la dégradation de T β RI est un aspect important pour la terminaison du signal TGF β . Très récemment, la déubiquitinase USP11 a été identifiée par double hybride comme pouvant interagir avec Smad7 et réguler la voie du TGF β . En effet, le complexe Smad7-USP11 pourrait déubiquitiner le récepteur de type I et ainsi assurer un signal TGF β continu (Al-Salihi *et al*, 2012). Smad7 présenterait ainsi une dualité fonctionnelle suivant les partenaires protéiques.

De plus, les récepteurs au TGF β peuvent être dégradés par une voie dépendante des lysosomes qui ne requiert pas d'ubiquitination. Par exemple, la protéine Dapper 2 est capable d'inhiber la voie du TGF β en facilitant le transport de T β RI au niveau de lysosomes pour dégradation (Su *et al*, 2007).

Formation de l'hétérocomplexe et recrutement des Smads

La formation du complexe hétéro-tétramérique est indispensable à la transduction du signal TGF β . Grâce à des techniques d'imagerie perfectionnées, il a été mis en évidence que les récepteurs au TGF β existent sous forme monomérique à la surface membranaire et que le ligand TGF β permettait leur dimérisation nécessaire à la formation du tétramère actif (Zhang *et al*, 2009). Il existe des co-récepteurs aux récepteurs au TGF β , comme le T β RIII ou betaglycan (récepteur au TGF β de type III), capable de faciliter la présentation du ligand TGF β au T β RII (López-Casillas *et al*, 1993). La protéine fusion entre ETV6 (Ets Variant gene 6) et NTRK3 (Neurotrophin-3 Receptor), retrouvée dans les fibrosarcomes, peut interagir avec T β RII et inhiber la formation du complexe avec T β RI, conduisant ainsi à la prolifération des cellules tumorales en inhibant l'effet anti-prolifératif du TGF β (Jin *et al*, 2005). Un

niveau différent de régulation fait intervenir la protéine FKBP12 qui lie le récepteur de type I et bloque la phosphorylation des sites du domaine GS par T β RII (Chen *et al*, 1997).

Plusieurs protéines ont été rapportées pour s'associer aux récepteurs et réguler le recrutement des protéines Smad par le tétramère activé. En plus d'affecter la formation du tétramère (Onichtchouk *et al*, 1999), le pseudorécepteur BAMBI (Bone morphogenetic protein and Activin Membrane-Bound Inhibitor) est capable de former un complexe ternaire avec T β RI et Smad7 pour inhiber l'interaction entre T β RI et Smad3 et donc bloquer l'activation de Smad3 (Yan *et al*, 2009). La protéine TRIP-1 (TGF β Receptor Interacting Protein 1) entre en compétition avec les Smads pour lier le récepteur activé et être phosphorylé par T β RII, en place et lieu des Smads (Choy & Derynck, 1998). La protéine STRAP (Serine/Threonine kinase Receptor Associated Protein) stabilise l'association entre le récepteur et Smad7, inhibant l'activation des Smads et/ou permettant le recrutement de phosphatases pour déphosphoryler le récepteur (Datta & Moses, 2000). Une autre protéine, TRAP-1 (TNF Receptor Associated Protein 1), interagit seulement avec le récepteur activé pour inhiber la transduction du signal (Charng *et al*, 1998). De manière intéressante, TLP (TRAP-1-Like Protein) lie à la fois le T β RII actif ou déficient pour son activité kinase et Smad4 en présence de TGF β , et présente des effets opposés sur la voie dépendante de Smad2 ou celle dépendante de Smad3 (Felici *et al*, 2003). Un dernier exemple bien documenté est la protéine à domaine FYVE appelée SARA (Smad Anchor for Receptor Activation) qui s'associe au récepteur par l'intermédiaire de liaisons avec le PIP3 (Phosphatidylinositol-3-Phosphate) de la membrane plasmique. Il a été montré que SARA facilite le recrutement de Smad2 au niveau du T β RI en contrôlant la localisation subcellulaire de Smad2 et en interagissant avec le récepteur tétramérique. Puis la phosphorylation de Smad2 entraîne la dissociation de SARA et la translocation nucléaire du complexe Smad2/Smad4 activé (Tsukazaki *et al*, 1998).

Enfin, la SUMOylation, qui est un mécanisme analogue à l'ubiquitination, faisant intervenir des enzymes d'activation, de conjugaison (Ubc9) et des ligases E3 dans le but de greffer de manière covalente un ou plusieurs résidus SUMO (Small Ubiquitin-like MOdifier) sur le résidu Lysine d'un site consensus du substrat protéique, cible le récepteur au TGF β de type I. Cette modification post-traductionnelle de T β RI sur le résidu Lysine 389 favorise le recrutement et la liaison aux Smads, conduisant à l'activation de la voie du TGF β (Kang *et al*, 2008). De manière intéressante, l'analyse structurale des gènes *TGF β RI* et *TGF β RII* dans un panel de cancers du sein humains en 1998 a mis en évidence la mutation du résidu Sérine 387

(Ser387Tyr) dans le gène *TGFβRI* corrélée à un phénotype métastatique (Chen *et al*, 1998a). Dix ans plus tard, l'équipe de Derynck montre que cette mutation Ser387Tyr inhibe la phosphorylation de la Sérine 387, ce qui empêche la SUMOylation du résidu Lysine adjacent (Lys389). Cette étude met en lumière un lien entre la SUMOylation et le développement tumoral ; la mutation proche du site de SUMOylation de TβRI inhiberait l'activation du récepteur.

La dynamique membranaire régule l'activité des récepteurs

Comme la plupart des protéines de surface membranaire, les récepteurs au TGFβ subissent l'endocytose (Le Roy & Wrana, 2005). Il existe deux principales voies endocytiques qui médient l'internalisation des récepteurs de surface : l'endocytose médiée par la clathrine et l'endocytose non-médiée par la clathrine, cette dernière inclut l'endocytose dépendante des rafts lipidiques et l'endocytose dépendante de la cavéoline. L'endocytose, qui a longtemps été considérée comme un moyen d'éteindre un signal en dégradant les récepteurs, joue un rôle important dans le contrôle de la quantité de récepteurs à la surface membranaire, mais aussi dans la régulation du signal au sein des vésicules endocytiques (Figure 8). Les deux récepteurs TβRI et TβRII sont rapidement internalisés par endocytose, et l'activité kinase de TβRII, mais pas celle de TβRI, est requise pour une internalisation optimale du complexe hétérotétramérique (Anders *et al*, 1998). Les récepteurs au TGFβ sont principalement internalisés par endocytose dépendante de la clathrine, comme la plupart des récepteurs de surface. Ceci est confirmé par l'association de TβRI et TβRII avec la sous-unité β2 de la protéine adaptatrice AP2 associée à la clathrine (Yao *et al*, 2002). En absence du ligand TGFβ, les récepteurs internalisés seraient recyclés et retourneraient à la surface cellulaire (Doré *et al*, 2001).

Au niveau de la membrane plasmique, les récepteurs au TGFβ activés par le ligand sont distribués au niveau de microdomaines non-rafts (puits de clathrine) et au niveau des rafts lipidiques (puits de cavéoline) (Di Guglielmo *et al*, 2003), notamment grâce à des protéines comme l'interleukine-6 (Zhang *et al*, 2005) ou encore ADAM12 (A Disintegrin And Metalloproteinase 12) qui induit l'accumulation des récepteurs dans les endosomes précoces positif pour EEA-1 (Early Endosome Antigen 1) provenant des puits de clathrine (Atfi *et al*, 2007). Ce type d'internalisation conduit plutôt à une activation de la voie du TGFβ car ces endosomes précoces sont enrichis en régulateurs positifs comme la protéine SARA

(Itoh *et al*, 2002) ou la forme cytoplasmique du facteur Promyelocytic Leukemia cPML (Lin *et al*, 2004). Deux polysaccharides ont une influence négative sur la régulation de la voie du TGF β en distribuant les récepteurs au niveau des rafts lipidiques. L'héparate sulfate stimule l'endocytose des récepteurs, médiée par la cavéoline, et leur dégradation rapide par le lysosome (Chen *et al*, 2006a). De même, le hyaluronane, grâce à la reconnaissance de son récepteur CD44, est capable d'envoyer les récepteurs au TGF β dans les fractions membranaires cavéolaires et de favoriser l'interaction avec Smad7 ou Smurf2, conduisant à l'inhibition de la voie du TGF β (Ito *et al*, 2004).

A – 3 - Régulation de l'activation des Smads

Après phosphorylation canonique

La phosphorylation C-terminale des R-Smads par T β RI étant l'étape clé de la transduction du signal TGF β , un des moyens de limiter l'action des Smads est la déphosphorylation (Figure 9). Ainsi, il a été montré que l'export nucléaire des R-Smads dépend de la dissociation des complexes R-Smad/Co-Smad grâce à la déphosphorylation des R-Smads dans le noyau des cellules.

La Sérine/Thréonine phosphatase PPM1A/PP2C α a été identifiée comme une phosphatase spécifique du motif SXSS de Smad2 et Smad3. PPM1A interagit avec les R-Smads, régule leur phosphorylation sur le motif SXSS et facilite ainsi l'export nucléaire des R-Smads déphosphorylées vers le cytosol (Lin *et al*, 2006). De plus, il a été montré que la phosphatase PTEN (Phosphatase and TENsin homolog) peut se complexer à PPM1A pour le protéger de la dégradation induite par le TGF β et ainsi aider à la déphosphorylation des R-Smads (Bu *et al*, 2008).

Plus récemment, la protéine phosphatase MTMR4 (MyoTubularin-Related protein 4), qui contient un domaine FYVE comme la protéine adaptatrice SARA, a été décrite pour interférer avec les niveaux de phosphorylation des R-Smads au niveau des endosomes primaires et donc éviter la sur-activation des R-Smads. MTMR4 pourrait donc être un acteur supplémentaire pour réguler finement la navette des R-Smads activées entre le noyau et le cytoplasme. MTMR4 dans les endosomes primaires serait un premier point de contrôle dans la régulation de l'homéostasie de la voie du TGF β (Yu *et al*, 2010).

Par phosphorylation réversible du domaine Linker

Des protéines kinases autres que le récepteur au TGF β de type I peuvent aussi réguler positivement ou négativement les R-Smads, notamment dans le domaine *Linker* (Figure 9). Ce domaine riche en résidus Sérine et Thréonine peut être phosphorylé par les kinases de la famille MAPK ou par les CDK (Cyclin-Dependent Kinase).

Par exemple, Smad3 peut être phosphorylé dans son domaine *Linker* par CDK2/4 au niveau des résidus Thréonine 8, Thréonine 179 et Sérine 213, régulant négativement l'activité transcriptionnelle de Smad3 (Matsuura *et al*, 2004). Cette régulation de la phosphorylation des R-Smads par les CDK pourrait expliquer comment les CDK permettent de faire progresser les cellules dans leur cycle cellulaire et leur conférer des résistances aux effets antiprolifératifs du TGF β .

Il est également démontré que la voie MAPK peut phosphoryler les R-Smads. En effet, Erk peut phosphoryler Smad2 et Smad3 sur plusieurs résidus Sérine et Thréonine (respectivement Ser245/250/255-Thr220 et Ser204/208-Thr179) au sein du domaine *Linker*, avec un effet inhibiteur sur la transcription des gènes cibles (Kretzschmar *et al*, 1999). Cependant, Smad3 peut aussi être la cible d'autres kinases comme p38 MAPK, ROCK (phosphorylation des résidus Sérine 204/208/213) ou JNK (c-Jun N-terminal Kinase ; phosphorylation des résidus Sérine 208/213), dont la finalité est de réguler positivement l'activité transcriptionnelle de Smad3. Ces données suggèrent que les Smads et les voies de signalisation p38/ROCK/JNK pourraient coopérer pour générer une réponse au TGF β plus efficace (Mori *et al*, 2004; Kamaraju & Roberts, 2005).

Ces phosphorylations dans la région *Linker* des Smads peuvent engendrer des changements allostériques régulant les interactions intramoléculaires entre les domaines MH1 et MH2, et/ou les interactions avec d'autres molécules régulatrices. Les dynamiques spatio-temporelles de la phosphorylation des Smads sont une des principales clés pour comprendre la régulation de la voie du TGF β (Matsuzaki, 2011).

Récemment, des phosphatases spécifiques du domaine *Linker* ont été identifiées, ajoutant un niveau de complexité supplémentaire dans le contrôle des différentes phosphoformes des Smads. Les protéines SCP1, 2 et 3 (Small C-terminal domain Phosphatase) déphosphorylent spécifiquement les régions *Linker* et N-terminale de Smad2 (Ser245/250/255 et Thr8) et Smad3 (Ser204/208/213 et Thr8) sans affecter la phosphorylation canonique sur les sites SXSS en C-terminal (Wrighton *et al*, 2006). Le résultat de ces

déphosphorylations est une activation de la voie du TGF β , en accord avec les données des mutations des sites de phosphorylations du domaine *Linker* des R-Smads (Matsuura *et al*, 2004; Kretzschmar *et al*, 1999).

Un exemple décrit la phosphorylation de Smad4 par Erk sur le résidu Thréonine 276, responsable de la régulation des processus d'import/export nucléaire de Smad4. En effet, cette phosphorylation de Smad4 est importante pour l'accumulation nucléaire de Smad4, induite par le signal TGF β , et par conséquent pour l'activité transcriptionnelle de Smad4 (Roelen *et al*, 2003).

Par acétylation

La voie du TGF β peut également être régulée par une autre modification post-traductionnelle : l'acétylation.

L'ARNm de Smad2 peut donner, par épissage alternatif avec exclusion de l'exon 3, deux formes protéiques. L'acétylation du résidu Lysine 19 par le coactivateur p300/CBP (CREB-Binding Protein) de la forme épissée de Smad2 a pour conséquence une meilleure affinité de la protéine avec des séquences promotrices et une activation de la transcription de gènes cibles du TGF β . Le domaine MH1 de cette forme épissée serait le domaine de liaison à l'ADN (Tu & Luo, 2007). En effet, l'exon 3 de la forme longue de Smad2 bloquerait la liaison à l'ADN en changeant la conformation de la protéine voire même en créant une interaction avec le domaine MH2. Lorsque le récepteur activé par le TGF β phosphoryle Smad3 et la forme courte de Smad2, l'acétylation de la Lysine 19 rend le domaine MH1 de Smad2 plus affiné pour lier l'ADN (Simonsson *et al*, 2006). La forme longue de Smad2 peut également être acétylée sur la Lysine 19, sans affecter son affinité pour Smad4 et leur translocation nucléaire, et cela résulterait en un export nucléaire moins efficace (Tu & Luo, 2007). L'acétylation de Smad2, et les différentes fonctions qui en découlent seraient dépendants du contexte ; Smad2 étant exprimé chez l'adulte et l'embryon alors que la forme courte de Smad2 n'est exprimée que pendant le développement (Tu & Luo, 2007).

Dans un autre contexte, la protéine Smad2 activée peut recruter, grâce à Smad4, le coactivateur p300 pour acétyler les histones. De plus, cette activité de p300 semble être spécifique de la transcription dépendante de Smad2, p300 ayant la capacité d'acétyler l'Histone H3 des promoteurs cibles des Smads (Ross *et al*, 2006).

Par les Smad inhibitrices

Le premier mécanisme bloquant le voie du TGF β qui a été disséqué est la régulation par les Smads inhibitrices (I-Smads : Smad6 et Smad7). Les I-Smads participent à la boucle de rétrocontrôle négatif qui régulerait l'intensité ou la durée des réponses au TGF β . Les I-Smads ont été identifiées à l'origine comme des Smads tronquées du fait que leur région N-terminale contient seulement des courts segments homologues au domaine MH1 et surtout du fait du manque du motif de phosphorylation SXSS en extrémité C-terminale. Les effets inhibiteurs de Smad6 et Smad7 sont basés sur leur capacité à lier différents récepteurs de la famille du TGF β et à interférer avec la phosphorylation des R-Smads (Figure 9).

Smad7 exerce son action inhibitrice en s'associant à T β RI et ainsi en empêchant le recrutement, la phosphorylation des R-Smads et la formation du complexe R-Smads/Co-Smad (Hayashi *et al*, 1997). Après stimulation au TGF β , Smad7, qui est localisée dans le noyau à l'état basal, se transloque majoritairement dans le cytoplasme, où il peut interagir avec T β RI par son domaine MH2. De plus, Smad7 peut recruter la kinase SIK (dont l'expression est régulée positivement par le TGF β) qui permet la dégradation du récepteur de type I par le protéasome (Kowanetz *et al*, 2008). Smad7 peut aussi faire intervenir d'autres Ubiquitine ligases (comme WWP1 et NEDD4-2) ou des phosphatases comme la protéine adaptatrice FKBP12 qui peut recruter Smurf1 pour conduire à l'ubiquitination et à la dégradation de T β RI (Ebisawa *et al*, 2001; Kavsak *et al*, 2000; Kuratomi *et al*, 2005; Komuro *et al*, 2004).

Par l'ubiquitination

L'ubiquitination de substrats de la voie du TGF β est un mécanisme important pour le maintien de l'homéostasie de la signalisation. Outre l'ubiquitination du récepteur au TGF β décrit précédemment, cette modification affecte également les protéines Smads (Figure 9).

La polyubiquitination et la dégradation de la protéine Smad2 activée ont été démontrés pour la première fois par le laboratoire de Joan Massagué en 1999. Depuis, de nombreuses E3 ubiquitine ligases ont été impliquées dans l'ubiquitination de Smad2 et Smad3. Les protéines Smurf agissent grâce à la liaison avec le motif PY présent dans le domaine *Linker* des R-Smads et des I-Smads. Par exemple, la prolyl-cis-trans isomérase Pin1, qui interagit avec les protéines Smad2 et Smad3 phosphorylées dans leur domaine *Linker*, permet le recrutement de Smurf2 qui déclenche l'ubiquitination des Smads (Nakano *et al*, 2009). La ligase NEDD4-2 peut aussi agir sur les protéines Smad2 et Smad3 grâce à la reconnaissance du domaine *Linker*

phosphorylé (Gao *et al*, 2009). Ces événements permettent une régulation négative de la voie du TGF β . Cependant, la ligase Arkadia agit plus indirectement pour favoriser l'activité transcriptionnelle de Smad2 et Smad3. Les protéines SKI/SnoN sont des facteurs nucléaires qui interagissent avec les R-Smads phosphorylés et empêchent la formation du complexe R-Smads/Co-Smad nécessaire à l'activité transcriptionnelle dépendante du TGF β . Arkadia est capable d'ubiquitiner le corépresseur SnoN, conduisant à sa dégradation par le protéasome, et donc de favoriser la réponse transcriptionnelle canonique (Levy *et al*, 2007). De plus, Arkadia peut également être impliquée dans la dégradation de Smad7, ce qui permet de briser la boucle de rétrocontrôle négatif exercé par la Smad inhibitrice et montre un nouveau mécanisme qui active la voie de signalisation du TGF β (Koinuma *et al*, 2003).

La régulation de Smad4 par mono- ou polyubiquitination a été montrée pour dégrader Smad4 par le protéasome, ou pour empêcher son association avec les R-Smads ; se traduisant dans les deux cas par l'inhibition de la voie du TGF β . Bien que ne possédant pas de motifs PY intact dans son domaine *Linker*, Smad4 peut être polyubiquitiné par Smurf1, Smurf2, WWP1 ou encore NEDD4-2 par l'intermédiaire des R-Smads ou des I-Smads qui font office de protéines adaptatrices (Morén *et al*, 2005). La protéine Jab1, responsable de la dégradation de p27 ou p53, peut également interagir avec Smad4 grâce à un motif du domaine MH2 et entraîner indirectement sa polyubiquitination (Wan *et al*, 2002). Smad4 peut alors être dégradé par le protéasome, ce qui régule négativement la signalisation du TGF β . Il a également été démontré que la Co-Smad pouvait être monoubiquitinée, notamment au niveau de la Lysine 507 grâce à p300/CBP, et que cela entraînait plutôt la dissociation des complexes Smads de l'ADN pour terminer la transcription des gènes cibles du TGF β (Wang *et al*, 2008). L'autre E3 ligase spécifique de la monoubiquitination de Smad4 est la protéine TIF1 γ , qui contient un domaine RING nécessaire à son activité E3 ligase qui greffe un résidu Ubiquitine sur la Lysine 519 de Smad4. Cette modification inhibe la formation d'un complexe stable R-Smads/Smad4 indispensable à la réponse au signal TGF β et engendre un relargage de Smad4 dans le cytoplasme. La déubiquitinase FAM/USP9x est la seule décrite qui est capable de réverser la monoubiquitination de Smad4 médiée par TIF1 γ (Dupont *et al*, 2009).

Par la SUMOylation

Comme l'ubiquitination, la SUMOylation intervient tout au long de la signalisation du TGF β , depuis le récepteur de type I jusqu'aux effecteurs que sont les Smads (Figure 9).

Un article rapporte la SUMOylation de la protéine Smad3 et son rôle dans l'inhibition de la signalisation du TGF β . La protéine PIAS γ (Protein Inhibitor of Activated STAT γ) serait responsable de la SUMOylation de Smad3 par interaction directe et par l'intermédiaire de son domaine RING. Cette modification influencerait négativement la capacité de Smad3 à lier l'ADN. De plus, des expériences de fusion de protéines et de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) ont révélé que la SUMOylation de Smad3 par PIAS γ stimule l'export de Smad3 du noyau vers le cytoplasme après induction au TGF β (Imoto *et al*, 2008). La SUMOylation de Smad3 régulerait donc la voie de signalisation du TGF β en contrôlant la localisation subcellulaire de Smad3 et en modulant son activité de liaison à l'ADN.

Les points de vue divergent sur les conséquences de la SUMOylation de Smad4. La littérature sur Smad4 est en accord avec le fait que la SUMOylation touche les Lysine 159 et 113, mais deux visions existent quant au rôle de cette modification post-traductionnelle. Tout d'abord, plusieurs articles montrent que la SUMOylation de Smad4 régulerait la voie de signalisation du TGF β en contrôlant la localisation subcellulaire ou le métabolisme de Smad4. Jusque là, le fait que le TGF β puisse induire l'accumulation de Smad4 dans le noyau était connu, mais la SUMOylation de Smad4 augmenterait la rétention et/ou la stabilité de Smad4 dans le noyau (Lin *et al*, 2003a). La stabilisation de Smad4 par la SUMOylation s'expliquerait par la compétition possible avec l'ubiquitination (Lin *et al*, 2003b) et serait en accord avec le besoin de Smad4 d'être disponible de manière stable, ce qui est cohérent avec le va-et-vient de Smad4 entre le noyau et le cytoplasme (Lee *et al*, 2003). La SUMOylation de Smad4 par l'intermédiaire de la protéine PIAS1, dont l'interaction avec Smad4 est induite par le TGF β , agit comme un régulateur positif de la voie de signalisation du TGF β en stimulant fortement la transcription dépendante du TGF β (Liang *et al*, 2004). Par ailleurs, plusieurs travaux démontrent que la SUMOylation de Smad4 aurait plutôt un rôle répressif de l'activité transcriptionnelle de Smad4. En effet, l'observation que la SUMOylation de Smad4 entraîne sa redistribution dans des « speckles » nucléaires serait cohérente avec l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de Smad4 SUMOylé (Long *et al*, 2004). De plus, l'intervention d'un nouvel acteur, Daxx qui interagirait avec Smad4 sans altérer sa translocation nucléaire, serait un argument supplémentaire en faveur de la répression de son activité transcriptionnelle (Chang *et al*, 2005). Il se trouve que la SUMOylation de la Lysine K159 de Smad4 serait indispensable au recrutement de Daxx conduisant à la répression transcriptionnelle de Smad4. La protéine Daxx aurait ainsi un rôle physiologique en réprimant l'expression de gènes induits par le TGF β et la SUMOylation de Smad4 agirait comme un médiateur de cet effet de Daxx. Enfin, plus récemment, une étude chez la Drosophile montre que Smad4 (dont

l'orthologue est Med pour Medea) est SUMOylé dans le noyau et que cela déclencherait l'export nucléaire de Smad4. Ce travail montre que la SUMOylation régulerait négativement le domaine et le temps d'action du signal TGF β (dont l'orthologue chez la Drosophile est Dpp pour Decapentaplegic) dans l'embryon. Autrement dit, la SUMOylation de Smad4 fournirait un mécanisme par lequel le noyau continuerait à contrôler la présence du signal apporté par le TGF β extracellulaire dans le but de moduler l'expression de gènes cibles pour une durée appropriée (Miles *et al*, 2008).

Les cofacteurs transcriptionnels

Le complexe transcriptionnel R-Smads/Co-Smad activé et transloqué dans le noyau agit au niveau des promoteurs de gènes cibles grâce à la reconnaissance d'éléments de réponses spécifiques, mais aussi grâce à l'interaction avec de nombreux partenaires co-activateurs ou co-répresseurs de la transcription, permettant une régulation fine de la réponse au TGF β suivant le contexte cellulaire (Tableau 3).

Les premiers co-activateurs des Smads décrits ont été les protéines p300 et CBP (Feng *et al*, 1998; Pouponnot *et al*, 1998; Janknecht *et al*, 1998; Nishihara *et al*, 1998; Topper *et al*, 1998). Le complexe p300/CBP possède une activité histone acétyltransférase, qui permet de décompacter la chromatine pour que la machinerie transcriptionnelle ait accès à l'ADN. Dans la voie du TGF β , p300/CBP est capable d'interagir avec les protéines Smad qui recrutent ce complexe activateur au niveau des promoteurs des gènes cibles du TGF β pour activer leur transcription. D'autres activateurs généraux de la transcription, comme les protéines P/CAF (Chromatin Assembly Factor) ou ARC105 (Activator-Recruited Co-factor 105), peuvent aussi être recrutées grâce au domaine MH2 des R-Smads pour activer la transcription de gènes cibles du TGF β (Itoh *et al*, 2000; Kato *et al*, 2002). Le complexe Smad activé peut également faire intervenir des co-activateurs plus spécifiques comme les protéines MSG1 ou SMIF qui s'associent à Smad4. Cependant, ces co-activateurs ont besoin de p300/CBP pour exercer leur activité transcriptionnelle, c'est pourquoi ils favorisent l'interaction fonctionnelle entre Smad4 et p300/CBP pour potentialiser l'activation transcriptionnelle des gènes cibles du TGF β (Yahata *et al*, 2000; Bai *et al*, 2002).

Le complexe Smad activé peut également induire la répression transcriptionnelle de certains gènes cibles du TGF β , soit par le recrutement direct de protéines HDAC (Histone DeAcetylase), au niveau des promoteurs des gènes cibles, qui inhibent leur transcription, soit par le recrutement de co-répresseurs de la transcription. Les premiers co-répresseurs identifiés

sont la protéine oncogénique Ski et son homologue SnoN (Ski-related novel gene N) qui sont capables d'interagir avec le complexe Smad activé (Liu *et al*, 2001; Luo, 2004). Ces protéines permettent la formation d'un complexe répresseur de haut poids moléculaire comprenant les protéines N-CoR (Nuclear hormone receptor Corepressor), mSin3 (mammalian Sin3) et HDAC, capable de rentrer en compétition avec le complexe activateur p300/CBP pour limiter son activité transcriptionnelle. De plus, Ski et SnoN peut directement empêcher la formation du complexe R-Smads/Co-Smad en se fixant au niveau du domaine MH2 de Smad4 (Wu *et al*, 2002). Bien que Ski et SnoN soient capables d'interagir avec les Smads indépendamment de l'activation par le TGF β , il semble que ces co-répresseurs protègent la voie du TGF β d'une activation indépendante du ligand, l'effet de répression étant rapidement levé après activation par le TGF β . La protéine Evi1 possède une série de domaines capables de lier l'ADN et peut inhiber la transcription par deux mécanismes. Evi1 peut lier Smad3 et l'empêcher de se lier à l'ADN, d'où l'inhibition partielle de la réponse transcriptionnelle au TGF β (Kurokawa *et al*, 1998), ou alors Evi1 peut s'associer au répresseur CtBP (C-terminal Binding Protein) pour recruter HDAC et réprimer la transcription des gènes cibles du TGF β (Izutsu *et al*, 2001). Enfin, le co-répresseur TGIF (TG Interacting Factor) peut lier les R-Smads activées et agir soit en recrutant HDAC directement ou par l'intermédiaire de mSin3, soit en recrutant CtBP pour inhiber la transcription des gènes cibles (Wotton *et al*, 1999), soit en interagissant avec l'Ubiquitine ligase Tiul1 (TGIF interacting ubiquitin ligase 1) qui peut entraîner la dégradation des récepteurs au TGF β ou de Smad2 (Seo *et al*, 2004). Enfin, TGIF peut s'associer à c-Jun et cPML pour empêcher la formation d'un complexe entre cPML et SARA fonctionnel nécessaire à la phosphorylation des R-Smads (Seo *et al*, 2006).

B - Le régulateur TIF1 γ

L'ADNc codant pour la protéine TIF1 γ humaine (Transcriptional Intermediary Factor 1 γ - également appelée RFG7, PTC7, TRIM33 et dont les orthologues chez le Xénope et le Zebrafish sont respectivement Ectodermine et Moonshine) a été identifié en 1999 par l'équipe de Régine Losson grâce au criblage d'une banque d'ADNc de foie en utilisant une portion d'ADNc fusion entre TIF1 α et B-raf (Venturini *et al*, 1999). L'analyse de la séquence a permis de mettre en évidence que le gène *TRIM33*, composé de 21 exons pour une longueur totale d'environ 120kb et localisé par FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) au locus 1p13.1, code pour une protéine qui existe sous deux isoformes provenant de l'épissage alternatif : on distingue une forme longue prédominante de 1127 acides aminés et une forme courte de 1110 acides aminés dont le rôle n'est pas connu. TIF1 γ est une protéine nucléaire exprimée de manière ubiquitaire. Chez la souris, l'inactivation du gène *trim33* provoque la mort des embryons pendant la somitogénèse précoce, ce qui démontre que TIF1 γ joue un rôle important et non redondant dans le développement embryonnaire (Kim & Kaartinen, 2008). La protéine TIF1 γ appartient à la sous-famille TIF1 au sein de la grande famille TRIM (Tripartite Motif).

B – 1 - La famille TRIM/RBCC

La famille TRIM/RBCC est composée d'au moins 70 membres qui partagent une région N-terminale commune composée d'un domaine RING, de deux domaines B-box et d'un domaine Coiled-Coil (RBCC). Ce domaine est également connu sous le nom de Tripartite Motif (TRIM). Les protéines TRIM sont classées en 12 sous-familles en fonction de la structure de leur motif RBCC (Figure 10). Les protéines de la famille TRIM/RBCC interviennent dans de nombreux processus biologiques et leurs altérations sont associées à diverses pathologies comme des problèmes de développement, des maladies neuro-dégénératives, des infections virales ou au cancer. La plupart des membres de la famille TRIM/RBCC sont des E3 Ubiquitine ligases et plusieurs d'entre eux sont impliqués dans des processus oncogéniques tels que la régulation de la transcription, la prolifération cellulaire ou l'apoptose. De plus, plusieurs membres sont directement impliqués dans la tumorigenèse par translocation chromosomique. Par exemple, le membre le plus décrit est la protéine TRIM19

ou PML (ProMyelocytic Leukemia), nécessaire à la formation des corps nucléaires du même nom (PML-NB) et impliquée dans divers processus cellulaires tels que la sénescence, l'apoptose ou la réparation de l'ADN. La leucémie promyélocytaire aigüe (APL) est caractérisée par la fusion entre la région N-terminale de PML et le récepteur à l'acide rétinoïque α (RAR α) : la translocation t(15 ;17) donne naissance à la protéine fusion PML-RAR α (de Thé *et al*, 1991). Il en est de même concernant les protéines TRIM24 et FGFR1 (Fibroblast Growth Factor Receptor 1) dont la fusion cause le syndrome myélo-prolifératif 8p11 (EMS) (Belloni *et al*, 2005). Les gènes *TRIM24* et *TRIM33* peuvent également subir des translocations pour donner des protéines fusions avec la protéine kinase oncogénique RET, conduisant au développement de carcinomes papillaires de la thyroïde (Klugbauer & Rabes, 1999).

B – 2 - La famille des protéines TIF1

Une structure conservée

La famille TIF1 regroupe les protéines TIF1 α (TRIM24), TIF1 β (TRIM28), TIF1 γ (TRIM33) et TIF1 δ (TRIM66) qui présentent environ 30% d'identité au niveau protéique, le plus fort degré d'identité étant de 50% entre TIF1 α et TIF1 γ . Les membres de cette famille sont caractérisés par une structure conservée avec en extrémité N-terminale le domaine TRIM/RBCC contenant le domaine RING responsable de l'activité ubiquitine ligase, deux domaines B-Box (B1 et B2) et un domaine Coiled-Coil d'oligomérisation. La séquence signature de la famille TIF1, TSS (TIF1 Signature Sequence), est localisée au sein du domaine *Middle*, qui est le domaine le moins conservé entre les membres de la famille. L'extrémité C-terminale contient les domaines PHD (Plant Homeobox Domain) et Bromodomaine importants pour la liaison des protéines TIF1 à l'ADN (Figure 11). Cette structure commune suggère que les membres TIF1 partagent des fonctions communes.

Régulation de la transcription

Il a été démontré que les protéines TIF1 α , TIF1 β , TIF1 γ et TIF1 δ fonctionnent comme des cofacteurs transcriptionnels lorsqu'ils sont liés à l'ADN, et cette fonction au niveau de la transcription dépendrait de leur motif commun TSS. Cependant, malgré une structure

similaire, les protéines de la famille TIF1 ont des fonctions de régulation de la transcription différentes.

La protéine TIF1 α est connue pour lier et réguler les domaines d'activation de la transcription de récepteurs hormonaux tels que RXR (Retinoid X Receptor), RAR (Retinoic Acid Receptor), VDR (Vitamin D3 Receptor), ER (Estrogen Receptor) ou encore PR (Progesterone Receptor) (Le Douarin *et al*, 1997), et induirait l'inhibition de l'expression de gènes cibles par le recrutement du répresseur HP1 (Heterochromatin Protein 1). De plus, TIF1 α est capable de former des hétérodimères avec TIF1 γ grâce à leurs domaines Coiled-Coil, entraînant l'inhibition de l'activité répressive de TIF1 α (Peng *et al*, 2002). Il a été rapporté que TIF1 α serait modifié par SUMOylation et que cela n'affecterait ni sa localisation nucléaire, ni son interaction avec HP1 (Seeler *et al*, 2001).

La protéine TIF1 β (également appelé KAP-1) serait plutôt un co-répresseur transcriptionnel universel. En effet, TIF1 β peut s'associer aux domaines KRAB (Krüppel Associated Box) de nombreux facteurs de transcription à doigts de Zinc impliqués dans la modulation de la transcription (Friedman *et al*, 1996). De plus, TIF1 β est un composant du complexe histone déacetylase N-CoR1/HDAC3 et peut lier et recruter le répresseur HP1 participant à la mise en place de complexes macromoléculaires dans la chromatine aboutissant à la répression transcriptionnelle (Sripathy *et al*, 2006). De manière intéressante, le domaine PHD de TIF1 β servirait de SUMO ligase intramoléculaire pour modifier par SUMOylation le Bromodomaine adjacent. La SUMOylation de TIF1 β est requise pour son activité répressive, permettant le recrutement d'HMT (Histone Methyl-Transferase) ou de protéines de remodelage de la chromatine (Ivanov *et al*, 2007).

La protéine TIF1 γ serait un répresseur transcriptionnel (Venturini *et al*, 1999), notamment en intervenant dans la voie de signalisation du TGF β dans laquelle la reconnaissance de modifications épigénétiques par son domaine PHD/Bromodomaine serait cruciale pour réguler les effets des protéines Smad. De manière intéressante, le domaine *Middle*, connu pour être le domaine d'interaction entre TIF1 γ et les protéines Smad2/3, est très peu conservé entre les différents membres de la famille, suggérant un rôle important de TIF1 γ dans la régulation de la voie du TGF β . De plus, il a été montré que TIF1 γ serait une Ubiquitine ligase ciblant Smad4 grâce à son domaine RING (Figure 12). Indépendamment de la voie du TGF β , TIF1 γ a été impliqué dans l'élongation de la transcription, dans la régulation de l'hématopoïèse ou dans la tumorigenèse.

Comme TIF1 α et TIF1 β , la protéine TIF1 δ contient un motif suffisant pour interagir avec HP1 et ainsi réguler de manière négative la transcription de gènes cibles. Ce qui différencie TIF1 δ des autres membres de la famille est son expression restreinte aux spermatides haploïdes en élongation où il s'associe préférentiellement à l'isoforme HP1 γ (Khetchoumian *et al*, 2004).

B – 3 - Implication de TIF1 γ dans la voie de signalisation du TGF β

Comme tous les membres de la famille TRIM, TIF1 γ possède un domaine RING qui est souvent associé à une activité ubiquitine ligase. Il a été démontré que TIF1 γ aurait un rôle dans l'inhibition de la voie de signalisation du TGF β , des Activines et des BMPs, en interagissant avec Smad4 : TIF1 γ serait responsable de la monoubiquitination de Smad4 au niveau du résidu Lysine 519. Cette modification post-traductionnelle de Smad4 préviendrait son association avec les protéines R-Smads activées et provoquerait l'export nucléaire de Smad4 (Figure 13). Cette monoubiquitination peut être réversée par l'action de la déubiquitinase spécifique FAM/USP9x (Dupont *et al*, 2009). Pendant l'embryogenèse précoce chez les Vertébrés, l'activité de Nodal permet d'organiser l'embryon grâce notamment à des effets positifs ou négatifs sur la différenciation des cellules souches embryonnaires. Plusieurs signaux dont Nodal permettent la mise en place des différents feuilletts ectodermique, mésodermique et endodermique afin de dessiner l'axe antéro-postérieur de l'embryon grâce à la gastrulation. Il a été montré que durant ce processus, les cellules de l'embryon pouvaient interpréter des variations très subtiles de la voie de signalisation de Nodal. Dans ce contexte, la protéine TIF1 γ serait un élément crucial de la réponse des cellules aux signaux TGF β . En effet, une collecte d'embryons de souris mutants pour TIF1 γ à différents stades de gestation ont permis de mettre en évidence des défauts très importants de la polarité des embryons et de la mise en place des tissus embryonnaires. En particulier, la protéine TIF1 γ serait essentielle pour la formation du mésoderme qui est un événement tardif chez les Mammifères, en régulant négativement le signal médié par Nodal et Smad4 au cours de la mise en place des tissus extra-embryonnaires (Morsut *et al*, 2010). Ainsi, *in vivo*, l'activité du TGF β résulterait de la combinaison entre la disponibilité du ligand Nodal extracellulaire – et l'activation conséquente de Smad2/3 – et l'action subtile de TIF1 γ sur la réponse dépendante de Smad4. Au cours de l'embryogenèse, TIF1 γ permettrait donc à

la cellule d'interpréter différemment le signal apporté par Nodal grâce à la mono-ubiquitination de Smad4 par TIF1 γ . Récemment, l'équipe de Caroline Hill a proposé un modèle dans lequel l'activité de répression transcriptionnelle de TIF1 γ repose sur la reconnaissance et la lecture, grâce au domaine PHD et au Bromodomaine qui agissent en tandem, du code épigénétique de l'Histone H3 (Agricola *et al*, 2011). En absence de TGF β , TIF1 γ se présenterait sous forme inactive repliée grâce à l'interaction entre les domaines RBCC et PHD/Bromodomaine (Figure 14). Le signal TGF β permettrait l'activation des Smads et le recrutement de Smad4 au niveau de la chromatine, mobilisant les protéines HAT (Histone AcetylTransferase) responsable de l'acétylation des résidus Lysine 18 et 23 de l'Histone H3 (Figure 14). Dans ce modèle, les protéines Smads seraient donc les auteurs d'un « code Histone » spécifiquement déchiffré par TIF1 γ . La régulation de Smad4 par TIF1 γ au niveau de la chromatine pourrait expliquer pourquoi seulement une certaine proportion des protéines Smad4 est monoubiquitinée. L'activité ubiquitine ligase de TIF1 γ ne concernerait que la fraction de Smad4 active engagée dans la réponse transcriptionnelle au niveau de la chromatine. Ainsi, TIF1 γ agirait essentiellement au niveau des promoteurs de gènes cibles pour réguler l'équilibre entre les complexes TIF1 γ -Smad2/3 et Smad4-Smad2/3.

Dans le modèle d'Agricola *et al*, le recrutement de protéines de type HAT par les Smads actives permettrait de créer un « code Histone » lu par l'ubiquitine ligase TIF1 γ pour mettre fin à l'action du complexe transcriptionnel Smad4-Smad2/3 (Agricola *et al*, 2011). Les domaines RING et PHD/Bromodomaine, pouvant ainsi coupler l'ubiquitination à la lecture du code Histone, sont également retrouvés chez les autres membres de la famille TIF1. En effet, TIF1 α et TIF1 β agissent au niveau de la chromatine via leurs domaines PHD/Bromodomaine (Tsai *et al*, 2010; Schultz *et al*, 2001) et peuvent ubiquitiner différents substrats grâce à leurs domaines RING (Wang *et al*, 2005; Allton *et al*, 2009). Ces données suggèrent un rôle général des protéines de la famille TIF1 dans la connexion des modifications épigénétiques et de la régulation de facteurs de transcription, ainsi qu'une implication importante de l'activité ubiquitine ligase dans ce processus (Herquel *et al*, 2011a).

De par son domaine *Middle* lui conférant la plateforme d'interaction avec les protéines Smad, la protéine TIF1 γ , et non les autres membres de la famille TIF1, joue un rôle majeur dans la régulation de la voie du TGF β . L'équipe de Joan Massague a montré que la protéine TIF1 γ peut se lier sélectivement au complexe Smad2/3 en compétition avec Smad4 (Figure 15). Cette équipe a en particulier étudié l'effet du TGF β au cours de la différenciation hématopoïétique. La protéine Smad4 a largement été impliquée dans l'effet anti-prolifératif

du TGF β dans de nombreux types cellulaires, en particulier dans les précurseurs hématopoïétiques. Cependant le TGF β est également connu pour induire la différenciation érythroïde, et cette équipe a pu montrer que dans ce cas la formation du complexe Smad2/3-TIF1 γ est requise (He *et al*, 2006). Ces travaux remettent en cause le dogme initial supposant que Smad4 est un acteur obligatoire de la voie des Smads. Après stimulation au TGF β , la protéine TIF1 γ se lie en effet sélectivement au complexe Smad2/3 en compétition avec Smad4, et les taux relatifs des protéines TIF1 γ et Smad4 détermineraient le partenaire du complexe Smad2/3.

L'équipe de Massague a ensuite proposé un modèle d'action de TIF1 γ dans un contexte de différenciation des cellules souches embryonnaires. Un des effets précoces de Nodal au cours de la différenciation des cellules souches embryonnaires est l'activation des facteurs de transcription Gsc (Gooseoid) et Mixl1 (Mix-like homeodomain protein 1) par l'intermédiaire de la liaison du complexe Smad2/3-Smad4 et FoxH1 aux séquences ARE (Activin Response Element). Notons que ces gènes *Gsc* et *Mixl1* appartiennent à un groupe de synexpression dont l'expression dépendrait à la fois du complexe Smad activé, mais également du recrutement de co-facteurs tels que FoxH1. Ce contexte serait donc assez différent de celui dans lequel les études démontrant un rôle répresseur de TIF1 γ sur Smad4 ont été réalisées. Dans ce modèle de différenciation des cellules souches embryonnaires, l'observation montrant que la plupart des gènes de réponse à l'Activine sont dépendants à la fois de Smad4 et de TIF1 γ a permis d'identifier un mode d'action où TIF1 γ serait nécessaire au recrutement de Smad4 au niveau des gènes cibles (Figure 16). Ainsi, dans les cellules souches embryonnaires, alors que les protéines Smad2/3 et Smad4 sont requises pour la vaste majorité de réponses transcriptionnelles au signal Nodal, TIF1 γ ne serait nécessaire que pour la transcription des gènes de la différenciation. Au contraire, la grande majorité des réponses impliquées dans l'effet cytotatique du TGF β dans les kératinocytes font appel aux protéines Smad2/3 et Smad4 mais pas à TIF1 γ . Cette fonction de co-transducteur des protéines Smad dans la voie Nodal/TGF β serait dépendante des domaines PHD/Bromodomaine de TIF1 γ (Xi *et al*, 2011). Ces domaines sont importants pour reconnaître des motifs épigénétiques bien définis comme les modifications des Histones. En accord avec cela, l'analyse des interactions entre les domaines PHD/Bromodomaine de TIF1 γ a révélé une forte affinité pour l'Histone H3 portant un motif spécifique comprenant le résidu Lysine 4 non modifié, la tri-méthylation du résidu Lysine 9 et l'acétylation du résidu Lysine 18 (motif H3K4me0-K9me3-K18ac). De

manière intéressante, la modification H3K9me3, motif reconnu par le gardien de la répression transcriptionnelle HP1, est essentielle pour la liaison entre TIF1 γ et l'Histone H3.

Dans les cellules souches embryonnaires, les promoteurs de *Gsc* et *Mixl1* seraient dans un état d'attente, de pause, caractérisé par des modifications épigénétiques comme H3K9me3 associées au facteur HP1. Le signal Nodal déclencherait alors la formation des complexes Smad4-Smad2/3 et TIF1 γ -Smad2/3 qui coopèreraient pour activer la transcription des gènes maitres de la régulation de la différenciation du mésendoderme *Gsc* et *Mixl1* (Figure 16). Au début de cette « danse » de complexes transcriptionnels, le domaine PHD et le Bromodomaine de TIF1 γ reconnaîtraient respectivement les modifications H3K4me0-K9me3 et H3K18ac ; le complexe TIF1 γ -Smad2/3 lierait alors les nucléosomes contenant les Histones H3 modifiés au sein des promoteurs de *Gsc* et *Mixl1*. L'action du complexe TIF1 γ -Smad2/3 serait possible grâce à la reconnaissance conjointe des modifications d'Histones par TIF1 γ et des sites SBE par Smad2/3. La forte affinité de TIF1 γ pour H3K4me0-K9me3-K18ac (Figure 16) déplacerait HP1 des nucléosomes, ce qui se traduirait par un remodelage de la chromatine nécessaire au recrutement du complexe Smad4-Smad2/3 au niveau des ARE pour activer l'ARN polymérase II à transcrire les gènes de la différenciation cellulaire *Gsc* et *Mixl1* (Xi *et al*, 2011). Dans un contexte de cellules souches embryonnaires, les protéines TIF1 γ et Smad4 agiraient donc en coopération pour répondre au signal de différenciation apporté par Nodal, en faisant passer des gènes maintenus en « pause » dans un état activé.

La structure cristallographique de la liaison entre TIF1 γ et l'Histone H3 modifié montre la grande spécificité de cette interaction qui serait par exemple rendue impossible par la méthylation du résidu Lysine 4 de l'Histone H3. La reconnaissance du motif H3K18ac par le Bromodomaine de TIF1 γ est donc déterminée par l'interaction de son domaine PHD avec le motif H3K9me3. L'espacement des motifs de méthylation et d'acétylation sur l'Histone H3 régule de manière très importante la liaison de TIF1 γ à la chromatine. La structure cristallographique présentée par l'équipe de Massague remet ainsi en cause le modèle de liaison de TIF1 γ au motif H3K18ac-K23ac proposé par Agricola *et al* (Agricola *et al*, 2011). La combinaison H3K4me0-K9me3-K18ac (Figure 17) constituerait donc un code de reconnaissance unique pour le recrutement de TIF1 γ (Xi *et al*, 2011). Ainsi, la spécificité combinée de TIF1 γ et Smad2/3 pour, respectivement, les modifications d'Histone et les SBE de l'ADN assure une plus grande sélectivité dans la reconnaissance des gènes cibles. Au cours de la différenciation des cellules souches embryonnaires, le résultat final est que Nodal active la transcription des gènes *Gsc* et *Mixl1* qui étaient dans un état de pause, ce qui déclenche la

différenciation du mésendoderme. L'activité ubiquitine ligase de TIF1 γ sur Smad4 pourrait représenter un rétrocontrôle négatif pour l'inactivation et le recyclage de Smad4.

B – 4 - Implication de TIF1 γ dans l'hématopoïèse

Outre son rôle crucial dans la voie de signalisation du TGF β , la protéine TIF1 γ présente bien sûr de nombreuses implications dans différents processus, de manière totalement indépendante du TGF β , notamment pendant l'embryogenèse, au cours de l'hématopoïèse qui résulte d'un fin dosage entre les processus de différenciation et prolifération des cellules progénitrices en cellules du sang circulant. Chez le poisson zèbre, qui est un excellent modèle pour étudier la machinerie moléculaire qui régit l'expression des gènes de l'hématopoïèse, un groupe de mutants présentant de graves défauts de différenciation érythroïde a été identifié en 1996 et l'un de ces mutants a été appelé *moonshine* (*mon*) (Ransom *et al*, 1996). Le fait que ce gène soit situé dans une région du chromosome 8 du poisson zèbre synténique de la région du chromosome 1 humain contenant TIF1 γ , et que l'expression de TIF1 γ soit fortement augmentée dans les cellules hématopoïétiques tout au long de l'embryogenèse chez le poisson zèbre et la souris, parmi d'autres preuves expérimentales, ont permis de déterminer que *moonshine* est l'orthologue de TIF1 γ chez le poisson zèbre. Il apparaît donc que la protéine TIF1 γ joue un rôle essentiel dans l'hématopoïèse précoce. En effet, la mutation de TIF1 γ chez le poisson zèbre conduit à l'apoptose massive des progéniteurs érythroïdes qui ne peuvent donc pas se différencier, d'où la mort prématurée des embryons. De plus, les rares adultes mutants survivants présentent une sévère anémie et une érythropoïèse défective, montrant que TIF1 γ serait également requis pour réguler l'hématopoïèse tardive (Ransom *et al*, 2004).

Récemment, les travaux de Bai *et al* ont montré que ces défauts de l'érythropoïèse pourraient être dus à des changements d'expression de gènes contrôlés par l'élongation de la transcription, cette étape étant connue pour être hautement régulée au cours du développement embryonnaire. En particulier, le fait que l'ARN polymérase II (ARNpolII) puisse se mettre en pause, après l'initiation de la transcription, sous l'influence de facteurs de transcription comme DSIF (DRB Sensitivity-Inducing Factor), permettrait de réguler une expression précise et synchrone des gènes du développement (Boettiger & Levine, 2009). En effet, le complexe DSIF est capable d'inhiber l'élongation de la transcription précoce, en

mettant en pause l'ARNpolIII, mais pourrait également agir pour remettre l'ARNpolIII en action et stimuler une transcription productive (Price, 2008). Cette dualité fonctionnelle de DSIF serait due au recrutement de pTEFb (positive Transcription Elongation Factor b) qui peut phosphoryler le domaine C-terminal de l'ARNpolIII et ainsi remettre en marche l'élongation de la transcription. Grâce à un crible permettant d'identifier des mutations suppressives du phénotype du mutant *mon* chez le poisson zèbre, les auteurs ont pu mettre en évidence la mutation *sun* (*sunrise*) qui restaure l'expression de la globine β 3 (orthologue de l'hémoglobine chez le poisson zèbre) altérée chez le mutant *mon* (Bai *et al*, 2010). Cette mutation correspond à l'altération du gène *cdc73* (Cell Division Cycle 73) qui code pour un composant du complexe PAF de coordination de l'élongation de la transcription. De manière intéressante, les protéines TIF1 γ et PAF régulent de manière antagoniste l'expression des gènes de l'érythropoïèse. En effet, PAF inhibe l'expression de ces gènes cibles en bloquant l'ARNpolIII. Cette même équipe a montré que TIF1 γ est capable d'interagir avec plusieurs composants des complexes multiprotéiques SCL et FACT (Facilitates Chromatin Transcription) impliqués dans la régulation de la transcription. Il a ainsi été dessiné un modèle dans lequel TIF1 γ est indispensable pour recruter les complexes SCL, FACT et pTEFb et relever l'inhibition de l'ARNpolIII par les protéines PAF et DSIF. En effet, la kinase pTEFb recrutée par TIF1 γ phosphoryle l'inhibiteur DSIF et le domaine C-terminal, ce qui permet à l'ARNpolIII de reprendre l'élongation de la transcription. La protéine TIF1 γ est donc un acteur essentiel de la régulation de l'élongation de la transcription des gènes de l'érythropoïèse pendant le développement.

De plus, deux études récentes montrent l'implication de TIF1 γ dans la régulation de l'érythropoïèse : TIF1 γ interviendrait au sein du paradigme entre TAL1 et PU.1 pour changer le destin des progéniteurs hématopoïétiques. Auparavant, l'idée était que le facteur de transcription TAL1, par l'activation de *gata1*, gouverne la différenciation érythroïde alors que le facteur de transcription PU.1 gouverne la différenciation myéloïde ; ce paradigme reposant sur un antagonisme croisé entre TAL1 et PU.1 (Graf & Enver, 2009). Des expériences montrent que les surexpressions de *gata1* ou PU.1 sont suffisantes pour reprogrammer un lignage érythroïde en lignage myéloïde et inversement (Kulesa *et al*, 1995; Nerlov & Graf, 1998). La découverte de la conséquence phénotypique de la mutation *mon* a remis en cause ce dogme : TIF1 γ serait critique pour la différenciation érythroïde des cellules souches hématopoïétiques, comme le montre l'augmentation de la différenciation des compartiments myéloïdes en absence de TIF1 γ . Des expériences de génétique sur le développement du

poisson zèbre ont démontré que la protéine TIF1 γ entretient des relations épistatiques avec les régulateurs caractéristiques de l'hématopoïèse TAL1 et PU.1 (Monteiro *et al*, 2011). De manière intéressante, TIF1 γ exercerait des rôles différents spécifiques de chaque compartiment de progéniteurs cellulaires. Ainsi, TIF1 γ ne jouerait aucun rôle dans au sein des progéniteurs myéloïdes (ou ALM – Anterior Lateral Mesoderm). En revanche, au sein des populations à destin érythroïde, TIF1 γ régule de manière positive l'expression de TAL1 et PU.1 dans les progéniteurs érythroïdes (ou PLM – Posterior Lateral Mesoderm). Dans le tissu hématopoïétique de la queue du poisson zèbre (appelé CHT – Caudal Hematopoietic Tissue), dans lequel les cellules souches hématopoïétiques (HSC) se différencient, TIF1 γ inhibe la voie myéloïde en régulant négativement l'expression de PU.1 et favorise la voie érythroïde en favorisant l'expression de TAL1. La protéine TIF1 γ serait donc un modulateur indispensable pour induire la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques en érythrocytes.

Une étude chez la souris vient contraster ces observations des effets de la mutation de TIF1 γ chez le poisson zèbre. En effet, une lignée de souris générant l'inactivation de TIF1 γ uniquement dans le système hématopoïétique a permis de mettre en évidence que les défauts engendrés par la délétion de TIF1 γ ne sont pas létaux : les souris délétées pour TIF1 γ vivent et ne sont pas anémiques (Kusy *et al*, 2011). Toutefois, l'analyse de l'hématopoïèse dans ces animaux montre que TIF1 γ serait impliqué dans plusieurs étapes de l'hématopoïèse. En particulier, TIF1 γ serait important pour limiter la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques vers la voie myéloïde. Pour cela, TIF1 γ inhibe l'expression du facteur de transcription PU.1 ainsi que son activité transcriptionnelle par interaction directe. La protéine TIF1 γ peut donc s'associer aux deux facteurs maîtres régulant l'hématopoïèse : TAL1 et PU.1. De plus, TIF1 γ est capable de lier les séquences régulatrices des gènes cibles de TAL1 comme *gata1*, *gata2* ou *idl1*. En plus de son rôle dans le recrutement de complexes multiprotéiques permettant de réguler l'élongation de la transcription (Bai *et al*, 2010), TIF1 γ pourrait s'associer à TAL1 sur certains sites spécifiques et ainsi réguler l'expression de gènes cibles au cours de la différenciation hématopoïétique. TIF1 γ peut également réguler la transcription des gènes cibles de PU.1. En effet, cette étude montre que TIF1 γ est capable de lier les séquences régulatrices des gènes cibles de PU.1 comme *p15*, *egr2* ou *FcgR2b*. Les mécanismes d'action de la protéine TIF1 γ dans la régulation de ces gènes cibles reste à déterminer mais il semble clair que TIF1 γ contribue à orienter les progéniteurs hématopoïétiques vers la voie de la différenciation érythroïde.

B – 5 - Implication de TIF1 γ dans la tumorigenèse

Les différents travaux présentés précédemment ont permis de mettre en évidence que la protéine TIF1 γ serait importante au cours de l'hématopoïèse. L'équipe de Laurent Delva a utilisé des souris pour lesquelles l'expression de TIF1 γ a été invalidée spécifiquement dans le compartiment hématopoïétique grâce au système Cre-lox (une recombinaison Cre, dont l'expression est contrôlée par un promoteur spécifique du tissu ciblé, permet de recombinaison les sites lox entourant tout ou partie de la séquence de TIF1 γ de manière homologue). Ces souris ont présenté une diminution du nombre des progéniteurs érythroïdes, en accord avec la littérature, ainsi qu'une expansion sélective des progéniteurs granulo-monocytiques. Ce déséquilibre des populations des progéniteurs observé chez la souris correspondrait au phénotype engendré lors du développement de la CMML (Chronic MyeloMonocytic Leukemia) chez l'Homme. La collecte des monocytes du sang périphérique de 60 patients atteints de CMML a révélé que l'ARNm de TIF1 γ était indétectable, et que cela était corrélé à une absence d'expression protéique, chez 35% des patients (Aucagne *et al*, 2011). L'analyse des séquences promotrices du gène *TIF1 γ* a montré que l'absence d'expression de TIF1 γ chez ces patients serait due à une hyperméthylation au niveau des îlots CpG de son promoteur. De nouvelles thérapies dites « épigénétiques », incluant des inhibiteurs des DNMT (DNA MethylTransferase) ou des inhibiteurs de HDAC, sont en cours d'essais cliniques, notamment concernant les syndromes myélo-prolifératifs (Candelaria *et al*, 2011). Un essai clinique de phase II a été mis en place afin de tester l'efficacité d'un agent déméthylant, la Décitabine, sur une cohorte de patients atteints de CMML. De manière très intéressante, l'expression de TIF1 γ s'est trouvée restaurée dans les monocytes des patients répondant au traitement, montrant que l'expression de TIF1 γ serait un biomarqueur des réponses aux agents déméthylants des patients atteints de CMML. Ces résultats montrent donc que TIF1 γ serait, dans les cellules hématopoïétiques, un gène suppresseur de tumeur régulé de manière épigénétique.

Dans un autre contexte, il semblerait que la protéine TIF1 γ puisse s'associer avec les autres membres de la famille TIF1 – TIF1 α et TIF1 β – pour agir comme suppresseur de tumeur dans le carcinome hépatocellulaire (ou HCC pour HepatoCellular Carcinoma) (Herquel *et al*, 2011b). Cette étude fait suite à une publication de 2007 qui montrait que

l'inactivation de TIF1 α chez la souris provoquait la formation de HCC (Khetchoumian *et al*, 2007). La purification de complexes protéiques interagissant avec TIF1 α a permis de mettre en évidence l'interaction avec TIF1 γ et/ou TIF1 β . Ces interactions pourraient permettre le recrutement de protéines telles que des HDAC ou HP1 dans le but de former un complexe macromoléculaire pour réguler la transcription de gènes cibles important pour inhiber la formation des HCC (Nielsen *et al*, 1999). L'inactivation de TIF1 α chez la souris confère son activité oncogénique au récepteur à l'acide rétinoïque en augmentant la prolifération des hépatocytes (Khetchoumian *et al*, 2007). L'inactivation de TIF1 α combinée à celle de TIF1 γ potentialise clairement la formation de HCC et la dérégulation des gènes cibles. Cet effet additif des deux mutations pourrait suggérer que TIF1 α et TIF1 γ peuvent affecter des voies de signalisation différentes pour exercer leur rôle de suppresseur de tumeur. Ainsi, des dérégulations parallèles de la voie du TGF β et de la voie de l'acide rétinoïque pourraient coopérer pour induire ou inhiber la formation de tumeur, et en particulier de HCC.

Le dernier exemple de la caractérisation de la protéine TIF1 γ en tant que suppresseur de tumeur concerne la tumeur du pancréas ou PDAC (Pancreatic Ductal AdenoCarcinoma). Les cas sporadiques de PDAC, qui représentent la grande majorité des tumeurs du pancréas, sont liés à la mutation activatrice de l'oncogène *kras* (muté dans 90% des cas), et/ou à des mutations de gènes suppresseurs de tumeur comme *ink4a/arf* (80% des cas), *tp53* (50% des cas) ou *smad4* (50% des cas). La protéine Smad4 a été originellement identifiée grâce à la mutation du gène dans les tumeurs du pancréas, et appelée DPC4 (Deleted in Pancreatic Cancer 4). La voie de signalisation du TGF β semble donc être une voie cruciale dans la régulation du développement des lésions cancéreuses pancréatiques, comme le montre les phénotypes de l'inactivation de T β RII ou de la surexpression de Smad7 dans le modèle murin (Ijichi *et al*, 2006; Kuang *et al*, 2006). De plus, une étude génomique a permis de montrer que la voie du TGF β était altérée dans pratiquement tous les cas de cancers pancréatiques (Jones *et al*, 2008). Le croisement de modèles murins présentant une activation constitutive de l'oncogène Kras (mutation Kras^{G12D}) avec un modèle d'inactivation conditionnelle de TIF1 γ dans le pancréas ont généré des souris avec des lésions précancéreuses dans le pancréas comparable à l'inactivation de Smad4. Parallèlement, l'analyse de l'expression de la protéine TIF1 γ sur une collection de 20 tumeurs pancréatiques humaines (PDAC) a révélé une baisse de l'expression de TIF1 γ dans les tumeurs, en comparaison aux tissus péri-tumoraux (Vincent *et al*, 2009). Comme la protéine Smad4, TIF1 γ exercerait dans le pancréas un rôle de suppresseur de tumeur et ainsi, l'inactivation de TIF1 γ coopérerait avec la mutation

activatrice de Kras de la même manière que l'inactivation de Smad4. Cependant, une publication plus récente de la même équipe suggère que l'effet suppresseur de tumeur de TIF1 γ passerait par une voie indépendante de Smad4. En effet, la génération de souris présentant la mutation Kras^{G12D} et la double inactivation de TIF1 γ et Smad4 a permis de mettre en évidence une interaction génétique entre l'inactivation de ces deux protéines, ce qui montre qu'elles agiraient de manière indépendante (Vincent *et al*, 2012).

De manière intéressante, une publication récente met en lumière un rôle plutôt oncogénique de la protéine TIF1 γ concernant le cancer colorectal ou CRC (ColoRectal Cancer). La délétion du locus 18q est fréquemment retrouvée dans les CRC, laissant penser à la présence de gènes suppresseurs de tumeur dans cette région, dont *smad4* qui est délété dans près d'un quart des CRC, une faible expression de Smad4 étant corrélée à un mauvais pronostic (Alhopuro *et al*, 2005). En plus de la mutation activatrice de l'oncogène Kras, des mutations des gènes codant les protéines Smad4 et T β R2 ont également été retrouvées dans les stades précoces de la progression tumorale, suggérant un rôle important de la voie du TGF β dans le développement du CRC. L'analyse de l'expression des protéines TIF1 γ , Smad4 et T β R2 sur une série de 51 CRC a permis de mettre en évidence une surexpression de TIF1 γ , corrélée à la perte d'expression de Smad4, dans 50% des CRC, en comparaison aux tissus non-tumoraux (Jain *et al*, 2011). De plus, l'expression de TIF1 γ semble être corrélée au stade d'avancement du CRC, TIF1 γ étant plus exprimé dans les CRC de stade III que dans les CRC de stade I et II. Les mêmes analyses réalisées sur des polypes non cancéreux ou sur des lésions pré-cancéreuses (appelées adénomes tubulaires) ont montré que la surexpression de TIF1 γ , intervenant dans les stades précoces de la carcinogenèse et étant corrélée à la perte d'expression de Smad4, serait un indicateur de mauvais pronostic.

Au cours des trois dernières années, la bibliographie s'est étoffée concernant l'implication de la protéine TIF1 γ au cours de la tumorigenèse. Différents travaux ont montré que TIF1 γ serait plutôt un acteur de la suppression de la tumeur, notamment concernant la leucémie myélomonocytaire chronique, le carcinome hépatocellulaire ou encore le cancer du pancréas. Un article cependant met en lumière que dans le cancer colorectal, l'expression de TIF1 γ serait plutôt corrélée avec un stade avancé de la tumeur, ce qui dans ce cas serait en faveur d'un rôle pro-oncogénique. Il semble donc que le contexte cellulaire joue un rôle important pour médier des effets anti-tumoraux ou pro-tumoraux. Les mécanismes impliqués dans ces différents effets de la protéine TIF1 γ au cours de la progression tumorale restent mal connus. L'étude moléculaire des interactions, des modifications épigénétiques, des

modifications post-traductionnelles de TIF1 γ permettra de comprendre ces mécanismes, aussi bien de manière dépendante ou indépendante de la voie de signalisation du TGF β .

B – 6 - Implication de TIF1 γ en virologie et immunologie

Dans un contexte d'infection adénovirale, deux travaux récents mettent en lumière la régulation de l'activité de TIF1 γ au cours de la réplication virale. La protéine adénovirale E4-ORF3 active la réplication de l'ADN viral et permet de stabiliser l'accumulation nucléaire des ARNm viraux en relocalisant des protéines cellulaires dans des structures nucléaires. La protéine TIF1 γ pourrait interagir avec E4-ORF3, ce qui entraînerait la relocalisation de la protéine TIF1 γ endogène dans les cellules infectées ; cela étant dépendant de l'accessibilité du domaine Coiled-Coil de TIF1 γ (Vink *et al*, 2011). La seconde publication montre que la protéine adénovirale E4-ORF3 interagit avec TIF1 γ pour entraîner la dégradation de TIF1 γ médiée par le protéasome au cours de l'infection. De manière intéressante, ce mécanisme serait conservé au cours de l'évolution et permettrait au virus d'inhiber les fonctions antivirales de TIF1 γ pour autoriser la réplication virale (Forrester *et al*, 2011).

Plusieurs études ont révélé la présence d'auto-anticorps dirigés contre TIF1 γ (associés ou non à la présence d'auto-anticorps dirigés contre TIF1 α et TIF1 β) chez des patients atteints de dermatomyosite (DM) (Labrador-Horrillo *et al*, 2012; Fiorentino & Casciola-Rosen, 2012; Matsuura *et al*, 2012; Fujimoto *et al*, 2012; Muro *et al*, 2012). La DM est une maladie du tissu conjonctif qui se caractérise par une inflammation des muscles et de la peau. Cependant c'est un trouble systémique qui peut également toucher les articulations, l'oesophage, les poumons et, plus rarement, le cœur. Il existe un lien très net entre les auto-anticorps spécifiques et les différents phénotypes cliniques, ce qui fait des auto-anticorps d'excellents outils pour classifier les patients et prédire l'évolution et l'issue de la maladie. Il est possible que la réponse immunitaire anti-TIF1 soit simplement un marqueur des patients atteints de cancer, notamment dans le cancer colorectal où TIF1 γ est surexprimé (Jain *et al*, 2011). Cependant, le fait que de nombreux jeunes patients sans cancer présumé ont des auto-anticorps dirigés contre TIF1 (et non les patients souffrant d'autres maladies auto-immunes) suggère que la protéine TIF1 γ est liée à la DM.

Enfin, une étude montre l'implication des protéines TIF1 γ et Smad4 dans le développement d'un sous-type de cellules du système immunitaire. En effet, les auteurs ont

montré que la différenciation des précurseurs des lymphocytes T NK (Natural Killer) invariants (cellules iNKT) est orchestrée par la voie canonique du TGF β . La protéine TIF1 γ régulerait la différenciation précoce ou expansion clonale des précurseurs des iNKT alors que la protéine Smad4 contrôlerait la maturation des précurseurs des iNKT à des stades plus tardifs. De manière intéressante, la différenciation intermédiaire de ces précurseurs serait régie par une voie du TGF β indépendante de Smad4 et de TIF1 γ . Les inter-relations entre différentes voies de signalisation venant d'un même signal apporté par le TGF β permettraient donc une régulation fine du développement des précurseurs des cellules iNKT (Doisne *et al*, 2009).

III - Le TGF β et le développement tumoral

Le TGF β est connu depuis longtemps pour ses effets pléiotropes, que ce soit au cours du développement embryonnaire où il intervient dans la différenciation des cellules, la mise en place des différents feuilletts pendant la gastrulation et l'organogenèse, ou au cours de la vie adulte pendant laquelle le TGF β est un régulateur essentiel de l'homéostasie au sein des tissus ou du processus de cicatrisation par exemple. Afin de réguler tous ces processus biologiques, le TGF β a recours à des effets sur la prolifération, la survie, la différenciation, l'adhésion ou encore la migration des cellules.

A - Effets suppresseurs de tumeur

Les études génétiques et épigénétiques ont permis d'identifier un très grand nombre d'altérations au niveau des effecteurs de la voie de signalisation du TGF β dans de nombreux cancers humains (Levy & Hill, 2006).

Le gène du récepteur au TGF β de type II est surtout sujet à l'instabilité microsatellitaire dans de nombreux cancers humains du fait qu'il contient de courtes répétitions de nucléotides. Des erreurs dans la réplication permettent de générer des récepteurs mutants non fonctionnels. D'autres mutations décrites dans le domaine kinase de T β RII, notamment dans les cancers des poumons et de l'ovaire, permettent de dire que la perte du récepteur T β RII fonctionnel est un mécanisme majeur grâce auquel les cellules tumorales acquièrent une résistance face aux effets suppresseur de tumeur du TGF β . Des mutations, des pertes d'expression ou des modifications épigénétiques du gène *TGF β RI* sont également retrouvées et associées respectivement aux cancers du sein, du pancréas ou aux cancers gastriques. Concernant Smad2, de nombreuses mutations, retrouvées dans différents cancers humains, auraient des conséquences sur la stabilité de la protéine ou sur sa fonction en inhibant par exemple le recrutement par le récepteur T β RI ou la dissociation de la protéine Smad2 activée (Prunier *et al*, 2001). Contrairement à Smad2, la protéine Smad3 n'a été trouvée mutée que dans de rares cas de cancers du sein (Tram *et al*, 2011). De plus, une inhibition de l'expression de Smad3 a été décrite dans plusieurs types de cancers et suggère que Smad3 serait un acteur majeur des effets anti-prolifératifs du TGF β . Enfin, le gène *SMAD* le plus fréquemment muté dans les cancers humains est *SMAD4*. À l'origine identifiée comme

DPC4 du fait de sa délétion dans près de 50% des cancers du pancréas, la protéine Smad4 est également délétée ou mutée dans de très nombreux cancers. Ainsi, des mutations dans les domaines MH1, MH2 ou des mutations tronquant l'extrémité C-terminale conduiraient à la dégradation de la protéine Smad4 par le protéasome ou à des problèmes d'oligomérisation avec les R-Smads (Xu & Attisano, 2000; De Bosscher *et al*, 2004). De manière intéressante, dans le cancer colorectal, les mutations de Smad4 apparaissent à des étapes tardives de la progression tumorale et corrént avec l'apparition des métastases (Miyaki *et al*, 1999), de même que pour le cancer du pancréas. La pléthore d'altérations retrouvées dans les cancers humains est en faveur d'un rôle clé des récepteurs T β RI et T β RII, de Smad4 et à moindre échelle de Smad2 et Smad3, en tant que suppresseurs de tumeur.

De plus, de nombreux modèles murins ont permis de confirmer ces observations. En effet, les souris présentant une expression ectopique du TGF β 1 dans la glande mammaire grâce au promoteur MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus) présentent une hypoprolifération des cellules épithéliales et une inhibition du développement de tumeur mammaires (Pierce *et al*, 1995). Des modèles murins avec une expression ectopique d'un récepteur T β RII dominant négatif incapable de se complexer à T β RI ont une plus grande incidence de tumeurs mammaires. De manière très intéressante, et à l'inverse de ce que l'on pouvait s'attendre d'après les études génétiques chez l'Homme, le premier modèle murin d'inactivation de Smad3 s'est révélé être un bon modèle pour l'étude du cancer colorectal métastatique (Zhu *et al*, 1998), bien que d'autres modèles n'aient pas révélés de tumeurs spontanées par la suite. Il semble donc que les effets du TGF β , qu'ils soient pro- ou anti-tumoraux, sont grandement dépendants du contexte et du tissu. Comme nous le verrons par la suite, l'effet du TGF β sur la tumorigenèse et la formation de métastases est bien plus complexe, car aussi bien des inactivations que des activations de cette voie de signalisation peuvent mener au développement tumoral.

A – 1 - Effet cytotatique

Le TGF β est capable d'inhiber la prolifération des cellules épithéliales en bloquant la progression de la phase G1 du cycle cellulaire. Pour cela, la première cible transcriptionnelle directe du TGF β qui explique l'effet cytotatique sur les cellules épithéliales est c-Myc (Pietenpol *et al*, 1990), dont l'expression est inhibée par le TGF β . De plus, le TGF β peut également mobiliser des inhibiteurs des CDK comme p21^{CIP1}, p15^{INK4b} ou p27^{KIP1} grâce à un

contrôle transcriptionnel et post-transcriptionnel de ces inhibiteurs du cycle cellulaire. L'expression de $p15^{INK4b}$ dans les cellules épithéliales inhibe le complexe CyclineD-CDK4/6 mais favorise la liaison entre CDK4 et CDK6, ce qui déplace les inhibiteurs $p21^{CIP1}$ et $p27^{KIP1}$ qui, ainsi actifs, peuvent alors s'associer à CDK2 pour inhiber le complexe CyclineE/A-CDK2. Parallèlement, le TGF β induit l'expression de $p21^{CIP1}$, ce qui assure le blocage complet de l'activité de CDK2 et donc l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (Reynisdóttir *et al*, 1995). En fonction du type cellulaire, différents CKI (Cyclin-dependent Kinase Inhibitor) peuvent être engagés dans cet effet du TGF β sur la prolifération, alors que la suppression de *c-Myc* est une caractéristique générale de cette réponse au TGF β . Par exemple, Le TGF β stimule l'expression de $p21^{CIP1}$ dans les lymphocytes T (Wolfrim *et al*, 2004), de $p57^{KIP2}$ dans les cellules souches hématopoïétiques (Scandura *et al*, 2004), et de $p21^{CIP1}$ et $p15^{INK4b}$ dans les astrocytes et les cellules progénitrices neurales (Seoane, 2004).

Le signal apporté par le TGF β va activer les protéines Smad qui vont former un complexe avec les facteurs de transcription Sp1 et FoxO pour activer la transcription de $p15^{INK4b}$ ou $p21^{CIP1}$ (Feng *et al*, 2002; Seoane *et al*, 2004; Gomis *et al*, 2006). De manière intéressante, il a été montré que la protéine *c-Myc* peut lier directement Smad2 et Smad3 pour les empêcher d'activer la transcription des CKI (Feng *et al*, 2002). Concernant l'inhibition de l'expression de *c-Myc*, qui est un inducteur primordial de la prolifération et de la division cellulaire, le TGF β induit la formation d'un complexe transcriptionnel comprenant les Smads activées, p107, E2F4/5 et C/EBP β (CCAAT/Enhancer-Binding Protein β), dans lequel les Smads et E2F4/5 reconnaissent des régions promotrices de *c-Myc*, et p107 permet le recrutement de co-répresseurs. C/EBP β est également requis pour l'activation de $p15^{INK4b}$ par le complexe Smad3/4-FoxO (Seoane, 2006).

Cet effet cytotatique du TGF β , bien décrit aujourd'hui, montre que la répression transcriptionnelle de *c-Myc* est une étape critique pour exécuter le programme complet d'arrêt de la prolifération passant par l'activation des inhibiteurs des kinases du cycle cellulaire. Cependant, des voies indépendantes des Smads peuvent être impliquées dans cet effet cytotatique du TGF β en coopération avec la voie canonique du TGF β .

A – 2 - Induction de l'apoptose

Le TGF β peut, en plus de son action sur la prolifération des cellules, induire l'apoptose par différents mécanismes suivant le type cellulaire. Par exemple, dans les cellules épithéliales du pancréas, les protéines Smad ont pour gène cible *TIEG1* (TGF β -Inducible Early response Gene 1) qui code pour un facteur de transcription régulant l'expression de gènes pro-apoptotiques (Tachibana *et al*, 1997). Dans les hépatocytes, les Smads activent le facteur GADD45 β qui lie MKK4 (Mitogen-activated protein Kinase Kinase 4) et active la protéine MAPK p38, ce qui conduit à l'activation de la caspase-8 et du facteur pro-apoptotique Bad à l'origine du relargage du cytochrome C de la mitochondrie qui active l'apoptosome (Yoo *et al*, 2003). Les protéines Smad peuvent également activer la transcription du gène pro-apoptotique *Bim* qui active la protéine mitochondriale Bax qui induit le relargage du cytochrome C et l'activation des caspases pour médier l'apoptose des cellules épithéliales gastriques (Ohgushi *et al*, 2005). Dans les cellules hématopoïétiques, les Smads induisent la transcription de la lipide phosphatase SHIP (Src-Homology 2-containing Inositol 5' Phosphatase) qui interfère avec l'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt, connue pour réguler la survie cellulaire (Valderrama-Carvajal *et al*, 2002).

En conclusion, l'effet pro-apoptotique du TGF β sur les cellules épithéliales fait intervenir différentes voies (dépendantes ou indépendantes des protéines Smad) qui fournissent différents types de signaux (pro- ou anti-apoptotiques). La réponse des cellules normales et tumorales au TGF β dépend de nombreux signaux reçus pour permettre la survie ou la mort par apoptose.

A – 3 - Effets sur le stroma

Le microenvironnement joue un rôle important dans l'organogenèse et l'homéostasie des tissus normaux. Depuis plusieurs années, la contribution du microenvironnement stromal dans le cancer a été rapportée grâce à des études chez l'Homme montrant que le développement et la progression tumorale sont liés à la présence de fibroblastes associés à la tumeur (appelés TAF pour Tumor-Associated Fibroblast) portant des mutations de gènes suppresseurs de tumeur (Bhowmick *et al*, 2004b). Par exemple, des mutations des gènes *TP53* ou *PTEN* sont fréquemment retrouvées dans le stroma de carcinomes mammaires (Kurose *et al*, 2002). De plus, les cellules présentes dans le stroma produisent de nombreux facteurs de

manière paracrine tels que des facteurs mitogènes ou des facteurs de l'inflammation. Les interactions entre l'épithélium et le stroma adjacent sont donc très importantes pour réguler l'homéostasie du tissu. L'importance de la voie de signalisation du TGF β dans ces interactions a été montrée grâce à la génération de souris présentant une délétion du gène *tgfb β II* spécifiquement dans les fibroblastes (Bhowmick *et al*, 2004a). La perte du signal TGF β dans les fibroblastes de la prostate ou de l'estomac a conduit à des hyperplasies des épithélia adjacents qui ont respectivement progressé en néoplasie intra-épithéliale ou en carcinome gastrique, ces effets étant accompagnés d'une surexpression du HGF (Hepatocyte Growth Factor) par les fibroblastes mutants. Le TGF β est donc capable de limiter la stimulation paracrine de la prolifération des cellules épithéliales et ainsi d'inhiber le développement tumoral. De plus, le TGF β peut agir en renforçant la tolérance immunitaire en inhibant le développement de la plupart des cellules effectrices de la réponse immunitaire innée (macrophages, cellules NK) et adaptative (lymphocytes T CD8+ et T CD4+). Le TGF β favorise le développement des lymphocytes T régulateurs (Treg) qui suppriment les fonctions des autres lymphocytes, et des lymphocytes Th17 qui régulent les macrophages et les cellules NK (Natural Killer). Cela a été mis en évidence par l'analyse de souris présentant la délétion conditionnelle du gène *tgfb β I* ou *tgfb β II* dans le système hématopoïétique ou de souris déficiente pour *smad3* qui présentent une dérégulation des cellules du système immunitaire, avec notamment une expansion excessive des lymphocytes T, conduisant à une inflammation chronique, en lien avec le développement tumoral. L'effet suppresseur de tumeur du TGF β correspond donc à l'inhibition de l'inflammation pour promouvoir la tolérance immunitaire. Enfin, une étude *in vivo* montre que la co-xénogreffe de fibroblastes mammaires présentant la délétion de *TGF β RII* avec des cellules de carcinome mammaire chez la souris immunodéprimée augmente significativement la croissance tumorale et l'invasion, et cela est corrélé à une sécrétion accrue par les fibroblastes de facteurs mitogènes (Cheng *et al*, 2005).

En plus de ces effets suppresseurs de tumeur, il a été montré que le TGF β peut jouer un rôle sur l'immortalisation des cellules cancéreuses en réprimant, grâce à l'intervention de co-facteurs comme SIP1 (Smad-Interacting Protein 1), l'expression de la sous-unité catalytique TERT de la télomérase et en induisant ainsi la sénescence des cellules (Lin & Elledge, 2003).

B - Effets promoteurs de tumeur

Depuis le clonage du TGF β , de nombreuses études ont montré que les cellules tumorales ou les tumeurs humaines expriment de forts taux de TGF β en comparaison aux tissus normaux. De plus, l'expression ectopique du TGF β dans des cellules les rend plus agressives et plus tumorigènes après injection chez la souris immunodéprimée. De manière intéressante, des niveaux d'expression élevés de TGF β retrouvés dans de nombreux types de cancers sont associés à la malignité et à la progression tumorale (Teicher, 2001).

L'inactivation de certains composants de la voie du TGF β retrouvée dans différents types de cancer (cancers colorectal, pancréatique, ovarien, gastrique) n'est pas la règle. Au contraire, d'autres cancers, comme le cancer du sein, de la prostate, le mélanome ou les néoplasies hématopoïétiques, désactivent la branche anti-tumorale de la voie de signalisation du TGF β . Par exemple, les mutations inactivatrices de *T β RII* dues à l'instabilité microsatellitaire dans les cancers du sein sont rarement associées à la progression tumorale.

De nombreux modèles murins ont permis de mettre en évidence l'effet oncogénique du TGF β . Par exemple, des souris présentant une sécrétion accrue de TGF β dans la peau ou la glande mammaire ont montré que certes le TGF β inhibe la croissance des tumeurs primaires, mais qu'il augmente en parallèle l'invasion et le pouvoir métastatique de ces tumeurs (Cui *et al*, 1996). De même, le croisement entre un modèle murin présentant l'expression d'une forme constitutivement active de T β RI spécifiquement dans la glande mammaire (MMTV-caT β RI), et un modèle exprimant l'oncogène Neu dans la glande mammaire (MMTV-Neu), montre que le récepteur T β RI actif inhibe la formation de tumeurs mammaires mais accélère l'apparition des métastases aux poumons (Siegel *et al*, 2003). De plus, des expériences de xénogreffes de cellules MDA-MB-231 dans lesquelles l'expression de Smad4 a été éteinte ont montré une baisse de la formation de métastases aux os en comparaison aux cellules contrôles, mettant en lumière le rôle de Smad4 au cours de la TEM (Transition Epithélio-Mésenchymateuse) induite par le TGF β (Deckers *et al*, 2006). Ainsi le TGF β peut exercer des rôles pro-oncogéniques, notamment en induisant la TEM et en favorisant la néo-angiogenèse et l'échappement de la tumeur à la réponse immunitaire.

B – 1 - Effets sur le stroma tumoral

Le stroma tumoral est constitué de composants de la matrice extracellulaire, de cellules immunitaires, de micro-vaisseaux et de cellules de type fibroblastes. Depuis plusieurs années, il a été montré que ces fibroblastes du stroma tumoral peuvent être soit des cellules mésenchymateuses stromales, soit des cellules dérivées de monocytes (appelées fibrocytes), soit provenir de la TEM des cellules épithéliales de la tumeur adjacente, qui vont réguler la progression tumorale de manière négative ou positive selon le contexte (Kolonin *et al*, 2012; Petersen *et al*, 2003). Ainsi, en plus de son action anti-tumorale sur le microenvironnement stromal décrite précédemment, le TGF β peut exercer un rôle pro-oncogénique en agissant notamment sur les fibroblastes associés aux tumeurs (TAF), qui produisent de nombreuses cytokines, chemokines, facteurs de croissance et facteurs angiogéniques nécessaires à la progression tumorale. Par exemple, le TGF β peut induire la sécrétion de PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) par les fibroblastes associés aux cellules tumorales dans la leucémie (Mäkelä *et al*, 1987). De même, dans les fibroblastes humains de rein, le TGF β induit la production d'un mitogène majeur FGF2 (Fibroblast Growth Factor 2) (Strutz *et al*, 2001). Il a été montré que le TGF β peut également agir sur l'expression du facteur CTGF (Connective Tissue Growth Factor) qui régule de manière autocrine et paracrine la prolifération des fibroblastes eux-mêmes et des cellules adjacentes (Igarashi *et al*, 1993).

De manière intéressante, une population de myofibroblastes associés aux tumeurs pourrait être utilisée par les cellules épithéliales tumorales qui sécrètent du TGF β agissant directement sur la capacité de migration et d'invasion des fibroblastes. Une étude *in vitro* originale montre que cette stimulation des fibroblastes par les cellules tumorales provoque l'activation de la voie de signalisation JNK et l'expression de la N-Cadhérine au niveau du front des filopodes (De Wever *et al*, 2004).

L'analyse des interactions entre les cellules tumorales et les cellules du microenvironnement pourrait donc permettre de mieux comprendre les différents effets du TGF β au cours de la progression tumorale.

B – 2 - Echappement à la surveillance immunitaire

Le microenvironnement stromal contient aussi les cellules immunitaires dont la régulation par le TGF β permet aux cellules tumorales d'échapper à la surveillance du système

immunitaire (Torre-Amione *et al*, 1990). Le TGF β est le plus puissant immunosuppresseur du corps humain car il inhibe la prolifération des lymphocytes B et T, des cellules NK et des neutrophiles et macrophages. Une étude *in vivo* chez la souris avec des lymphocytes T exprimant un récepteur T β RII dominant négatif montre que l'inactivation de la voie de signalisation du TGF β rend les lymphocytes T plus aptes à développer une réponse immune efficace contre la tumeur, ce qui est une piste intéressante pour la thérapie (Gorelik & Flavell, 2001). Le TGF β sécrété par les tumeurs va agir sur le système immunitaire de l'hôte par différents mécanismes, notamment en permettant aux lymphocytes T régulateurs (Treg) d'inhiber l'activité cytotoxique des effecteurs de l'immunité adaptative que sont les lymphocytes T CD8⁺ (LTCD8⁺ ou CTL). En effet, des CTL exprimant un récepteur T β RII dominant négatif résistent à l'action des Treg, ce qui est corrélé avec une activité anti-tumorale. De plus, la voie de signalisation du TGF β inhibe l'expression des protéines cytotoxiques des CTL comme la Perforine, le Granzyme ou encore le ligand Fas (Thomas & Massagué, 2005).

B – 3 – Angiogenèse

L'angiogenèse est un processus physiologique normal qui permet la formation de néovaisseaux sanguins à partir des vaisseaux sanguins existants. Ce processus est bien sûr primordial au cours du développement embryonnaire et intervient également au cours de la vie adulte pendant la cicatrisation ou pendant le cycle de reproduction féminin. Cependant l'angiogenèse peut être détournée lors de pathologies comme le cancer où la tumeur va devoir créer de nouveaux vaisseaux sanguins pour continuer à être irriguée et à se développer. L'angiogenèse tumorale fait intervenir les mêmes voies de signalisation que l'angiogenèse physiologique. De plus, elles se déroulent de la même façon c'est-à-dire en deux phases séquentielles. La phase d'activation, qui consiste en l'initiation et le développement des nouveaux vaisseaux, se caractérise par l'augmentation de la perméabilité, de la prolifération, de la migration et de l'invasion des cellules endothéliales, corrélée à la baisse de leur adhérence à la lame basale. La phase de résolution permet la maturation des nouveaux vaisseaux grâce à l'augmentation de l'adhérence des cellules endothéliales à la lame basale nouvellement créée, la baisse de leur capacité de prolifération et d'invasion, et le recrutement de cellules (péricytes, cellules musculaires lisses vasculaires, cellules murales) dont le rôle est

de renforcer la stabilité des néovaisseaux et de réguler leurs propriétés hémodynamiques. La différence entre les angiogenèses physiologique et tumorale réside dans la qualité des vaisseaux formés, les vaisseaux tumoraux étant beaucoup plus tortueux et de calibre moins régulier que les vaisseaux physiologiques. En 1989, le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) a été identifié comme le facteur responsable de la croissance des cellules endothéliales nécessaire à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Pour lutter contre l'hypoxie, la tumeur secrète des taux élevés de VEGF dans le but de favoriser la néovascularisation indispensable à sa croissance (Brahimi-Horn *et al*, 2001).

L'effet du TGF β sur l'angiogenèse a été découvert par l'analyse des vaisseaux sanguins des souris déficientes pour le gène *tgfb1*, dont les défauts de différenciation des cellules endothéliales donnent naissance à des vaisseaux sanguins déformés et fragiles (Dickson *et al*, 1995). Le rôle crucial du TGF β a également été montré dans les modèles murins déficients pour les gènes *tgfb1*, *tgfb2* ou *tgfb3* qui présentent tous des défauts vasculaires et endothéliaux. Les cellules endothéliales possèdent deux récepteurs, ALK5 (T β RI) ou ALK1 (spécifique des cellules endothéliales et dont le ligand est BMP9 (David *et al*, 2007)), pour répondre au signal apporté par le TGF β . Plusieurs études récentes montrent que les réponses de ces différents récepteurs des cellules endothéliales vont réguler différemment l'angiogenèse. En effet, la stimulation de T β RI par le TGF β régulerait préférentiellement la phase de résolution en favorisant l'expression de gènes importants pour l'homéostasie et la maturation des vaisseaux, et la différenciation des cellules péri-endothéliales. En particulier, le TGF β induit, via T β RI, l'expression de la protéine SM22 α , un marqueur de différenciation des cellules des muscles lisses pendant le développement, qui pourrait permettre la différenciation des cellules endothéliales en cellules péri-endothéliales nécessaires à la stabilisation des néovaisseaux (Ota *et al*, 2002). De plus, la transduction du signal TGF β par T β RI et les protéines Smad2 et Smad3 dans les cellules endothéliales stimule la transcription des gènes de la matrice extracellulaire, de PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor type 1) et de la Fibronectine régulant l'homéostasie et la maturation des vaisseaux (Goumans *et al*, 2002; Wu *et al*, 2006). D'un autre côté, l'activation par le TGF β du récepteur ALK1 induit la transcription, par l'intermédiaire de Smad1, Smad5 et Smad8, de gènes impliqués dans la prolifération et la migration des cellules endothéliales et régulerait ainsi la phase d'activation de l'angiogenèse (Goumans *et al*, 2002; Wu *et al*, 2006; Ota *et al*, 2002). Il a également été montré que le VEGF pourrait agir de manière synergique avec un inhibiteur de l'activité kinase du récepteur T β RI (SB431542) pour favoriser l'angiogenèse par

l'induction de l'Intégrine $\alpha 5$ qui pourrait être nécessaire à la communication intercellulaire et à l'adhésion des cellules endothéliales (Liu *et al*, 2009). Enfin, le TGF β peut aussi contrôler l'angiogenèse en agissant sur les co-récepteurs T β RIII (ou betaglycan) et Endogline. Par exemple, une forme soluble de T β RIII a été utilisée pour séquestrer le ligand TGF β , inhiber l'angiogenèse et ainsi limiter la croissance tumorale chez la souris (Bandyopadhyay *et al*, 2002).

Le TGF β apporte donc un niveau de régulation supplémentaire pour la compréhension du processus complexe qu'est la néo-angiogenèse tumorale.

B – 4 - Transition épithélio-mésenchymateuse

La transition épithélio-mésenchymateuse, ou TEM, est un processus de transdifférenciation au cours duquel une cellule épithéliale polarisée acquiert des propriétés de cellule mésenchymateuse. Cette transition s'accompagne d'un changement de morphologie grâce à la réorganisation du cytosquelette et à la perte des jonctions intercellulaires, du déclenchement d'un programme transcriptionnel conduisant à la répression de l'expression des marqueurs épithéliaux et à l'activation de l'expression des marqueurs mésenchymateux et de l'acquisition de capacités de migration et d'invasion. La TEM a été décrite pour la première fois dans le développement embryonnaire et en particulier dans la formation de la bande primitive chez le poussin en 1982 (Greenburg & Hay, 1982). Depuis, il a été montré que cette transition des cellules, et sa réversion appelée transition mésenchymato-épithéliale (TME), sont indispensables pendant le développement embryonnaire. En effet, la TEM est importante depuis la gastrulation et la formation du mésoderme jusqu'à la mise en place des valves cardiaques. De plus, la TEM intervient de manière transitoire et spontanée pour permettre aux cellules de la crête neurale de migrer pour donner naissance aux structures cranio-faciales, au système nerveux périphériques et aux mélanocytes. Après la fécondation, les cellules du trophoctoderme subissent la TEM pour faciliter l'invasion de l'endomètre nécessaire à l'implantation correcte de l'embryon (Thiery *et al*, 2009). Chez l'adulte, la TEM est associée à un état d'inflammation transitoire, dans le cas de la cicatrisation ou de la régénération tissulaire par exemple. Si l'inflammation devient chronique, la TEM va promouvoir une fibrose des tissus, où les cellules épithéliales sont converties en myofibroblastes qui produisent une grande quantité de matrice extracellulaire riche en collagène. Le processus de TEM « pathologique » est semblable à la TEM physiologique et

implique des voies de signalisation similaires. Par exemple, le TGF β est connu pour avoir un rôle pro-fibrotique important, en favorisant l'accumulation de molécules de la matrice extracellulaire, notamment au cours de la fibrose pulmonaire (Kim *et al*, 2006). Dans le contexte tumoral, la TEM a été impliquée dans la génération des cellules de phénotype mésenchymateux dotées de propriétés migratoires et invasives à l'origine de l'apparition des métastases (Thiery *et al*, 2009).

Le TGF β est connu depuis longtemps pour être un puissant inducteur de la TEM. La TEM induite par le TGF β a été largement étudiée et il est admis que le TGF β induit l'expression d'un panel de facteurs de transcription clés de la TEM (appelés TEM-ATF pour Facteurs de Transcription Associés à la TEM) comme les protéines à doigts de zinc de la famille Snail (SNAIL, SLUG), les protéines bHLH (basic Helix Loop Helix) dont Twist1 ou les protéines à homéodomaines ZEB1 (Zinc finger E-box-binding homeobox 1) et ZEB2 (ou SIP1). Tous ces facteurs de transcription s'inter-régulent de manière à intensifier la réponse conduisant à la perte des marqueurs épithéliaux et à l'acquisition de marqueurs mésenchymateux (Figure 18) (Sánchez-Tilló *et al*, 2012). La voie canonique du TGF β , passant par les protéines Smad, est primordiale pour l'induction de ces médiateurs de la TEM, mais des voies non-canoniques sont également nécessaires pour la réalisation d'une TEM complète, comme l'activation de la métalloprotéinase TACE (TNF Alpha Converting Enzyme) qui clive le récepteur T β RI après ubiquitination par la protéine adaptatrice TRAF6 (TNF Receptor Associated Factor 6) (Mu *et al*, 2011). Différents niveaux de contrôle ont été récemment impliqués dans la régulation de la TEM induite par le TGF β , telles que des modifications épigénétiques, comme notamment l'activation par le TGF β de la DNA méthyltransférase DNMT1 et d'un patron de méthylation de l'Histone 3 spécifique de la TEM (McDonald *et al*, 2011; Papageorgis *et al*, 2010). De plus, le TGF β inhibe l'expression de plusieurs microARN (miR) tels que les miR de la famille miR-200 qui reconnaissent et entraînent la dégradation des ARN messagers de ZEB1 et ZEB2, et induit l'expression d'autres miR comme le miR-155 qui cible la protéine GTPase RhoA, conduisant à la perte de polarité des cellules en TEM (Kong *et al*, 2008). De manière intéressante, le TGF β peut faire intervenir l'épissage alternatif dans la régulation de la TEM. En effet, une étude récente des changements de variants d'épissage au cours de la TEM induite par le TGF β a montré que le TGF β réprime l'expression des facteurs d'épissage alternatif ESRP1 et ESRP2 (Epithelial Splicing Regulatory Protein), par l'intermédiaire de ZEB1 et ZEB2 (Horiguchi *et al*, 2012). La TEM induite par le TGF β serait donc dépendante, conjointement au programme

transcriptionnel décrit précédemment, d'un programme d'épissage alternatif indispensable à l'obtention d'un phénotype mésenchymateux (Figure 18).

Le TGF β peut donc induire des changements phénotypiques de la cellule qui contribuent à la progression tumorale et à la formation de métastases. Par exemple, le TGF β est nécessaire pour que les cellules tumorales mammaires forment des métastases pulmonaires. En effet, il a été montré que le signal apporté par le TGF β peut activer la transcription du gène de l'ANGPTL4 (Angiopoietin-like 4) au sein des cellules ayant subi la TEM et qui commencent à migrer. L'ANGPTL4 est une molécule sécrétée dont la fonction est de dissocier les jonctions serrées des cellules endothéliales, spécifiquement au niveau des capillaires sanguins pulmonaires. Ainsi, les cellules tumorales qui migrent vont être capables, grâce à la sécrétion d'ANGPTL4 induite par le TGF β du microenvironnement de la tumeur primaire, de coloniser spécifiquement les régions pulmonaires (Padua *et al*, 2008). Un autre exemple est la formation de métastases ostéolytiques qui sont les métastases osseuses les plus répandues pour tous les types de cancers, en particulier les cancers du sein et de la prostate. Le TGF β peut induire par sa voie canonique la production de facteurs pro-ostéolytiques spécifiques comme la PTHrP (Parathyroid Hormone-related Protein) et l'IL-11 (InterLeukin-11) qui stimulent l'expression de facteurs permettant la différenciation des ostéoclastes comme RANKL (Receptor Activator of NF κ B Ligand) et favorisent les métastases osseuses, ou le CTGF (Connective Tissue Growth Factor) qui est un inducteur extracellulaire de l'invasion et de l'angiogenèse (Yin *et al*, 1999; Shimo *et al*, 2006).

Outre son action promotrice de l'invasion tumorale, la TEM serait le mécanisme ultime de survie des cellules cancéreuses (Tiwari *et al*, 2012). En effet, la TEM conférerait aux cellules une résistance à l'apoptose (Valdés *et al*, 2002) et à l'anoïkis pour permettre aux cellules qui se détachent de la tumeur primaire de disséminer dans la circulation sanguine même en ayant perdu leurs jonctions intercellulaires. La perte d'expression de la E-Cadhérine serait déterminante pour cette résistance des cellules tumorales à l'anoïkis (Derksen *et al*, 2006). De plus, la TEM permettrait aux cellules précancéreuses d'échapper à la sénescence notamment par l'intermédiaire des facteurs de transcription clés comme ZEB1 (Browne *et al*, 2010). La perte de la E-Cadhérine induirait également l'expression de VEGF par les cellules tumorales, ce qui impliquerait la TEM dans la régulation de l'angiogenèse (Ceteci *et al*, 2007). Les cellules subissant la TEM peuvent également exprimer de nombreuses cytokines et sécréter des facteurs qui interfèrent avec les réponses immunitaires anti-tumorales, ce qui confère à ces cellules un échappement à l'immunosuppression. Tous ces effets de la TEM sur

la « survie » des cellules tumorales peuvent être ramenés à l'idée que la TEM permettrait l'émergence de populations de CSC (Cancer Stem Cell) (Morel *et al*, 2008; Mani *et al*, 2008). Le fait que la plupart des métastases ressemblent d'un point de vue organisationnel aux tumeurs primaires dont elles dérivent suggère un modèle de CSC migratoire, en accord avec tous les aspects de la progression tumorale (Brabletz *et al*, 2005). Ainsi, la TEM donne naissance à des cellules métastatiques qui, par définition, peuvent être à l'origine de nouvelles tumeurs secondaires. Dans les cancers du sein, le premier exemple de réactivation aberrante d'un programme de TEM concerne les tumeurs très agressives appelées « claudin-low », les tumeurs malignes les plus primitives, qui proviendraient de progéniteurs épithéliaux très peu différenciés (Morel *et al*, 2012). De plus, les cellules ayant subi la TEM expriment de nombreux gènes associés aux cellules souches comme CD44. Enfin, les cellules métastatiques développent une haute résistance aux chimiothérapies et autres agents pro-apoptotiques (Dean *et al*, 2005). En effet, de nombreux travaux montrent que les facteurs de transcription clés de la TEM confèrent aux cellules une résistance à un panel de chimiothérapies dans de nombreux types de cancers (Sánchez-Tilló *et al*, 2012).

Cependant, la réversibilité de la TEM par la TME est une autre démonstration de la plasticité des cellules tumorales. En effet, les cellules métastatiques (ayant subi la TEM) doivent regagner un phénotype épithélial leur permettant de proliférer afin de former une tumeur secondaire. Deux papiers ont récemment démontré très élégamment la nécessité de la réversion de la TEM pour une colonisation métastatique efficace. Un des travaux utilise un modèle murin de cancer de la peau dans lequel l'expression de Twist1 est inductible spécifiquement dans les kératinocytes par la doxycycline. Pour l'étude, les tumeurs primaires ont été induites par l'application cutanée de carcinogènes DBMA (7,12-dimethylbenz(a)anthracene) et TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate). Ensuite, une administration orale de doxycycline induit l'expression de Twist1 dans toutes les cellules cancéreuses (les cellules de la tumeur primaire, les cellules tumorales circulantes et les métastases), mimant ainsi activation de la TEM irréversible. En revanche, une administration localisée de doxycycline induit l'expression de Twist1 uniquement dans les cellules de la tumeur primaire et modélise donc une TEM réversible. De manière très intéressante, le nombre de métastases pulmonaires est plus important dans le modèle de TEM réversible, démontrant que la re-différenciation (TME) est nécessaire pour outrepasser l'arrêt de prolifération associé aux cellules en TEM et pour coloniser et créer des métastases (Tsai *et al*, 2012). Le second travail s'intéresse à un nouvel inducteur de la TEM, Prrx1 (Paired-related homeobox transcription factor 1) qui, contrairement aux autres facteurs de transcription clés

de la TEM, ne permet pas l'émergence de cellules à caractéristiques souches. Prrx1 coopère avec Twist1 pour induire la TEM, la migration et l'invasion des cellules tumorales. Cependant, des expériences de xéno greffe montrent que l'extinction de Prrx1 augmente de manière importante l'apparition de métastases, en accord avec le besoin de réversion du processus de TEM (Ocaña *et al*, 2012).

Donc la stratégie qui voudrait bloquer la TEM afin d'empêcher la formation de métastases et de rendre les CSC plus sensibles aux chimiothérapies pourrait au contraire favoriser l'apparition de tumeurs secondaires.

IV - Conclusion

Il apparaît évident aujourd'hui que le signal apporté par le TGF β est à l'origine de nombreux processus pro-oncogéniques tels que la TEM, l'invasion métastatique, l'échappement de la tumeur à la réponse immunitaire... Cependant, l'utilisation d'inhibiteurs de la voie du TGF β comme thérapies anti-tumorales se heurte à l'effet connu du TGF β comme suppresseur de tumeur notamment en inhibant la prolifération ou en activant l'apoptose des cellules épithéliales. C'est pourquoi aucune stratégie conventionnelle n'est utilisée *in vivo* aujourd'hui.

Dans les traitements traditionnels, l'inhibition de la voie du TGF β dans des cellules tumorales humaines ou murines augmente l'effet cytotoxique des radiations ionisantes et de nombreuses chimiothérapies. De plus, il a été montré que les tumeurs exprimant de forts taux de TGF β sont plus résistantes aux chimiothérapies (Teicher *et al*, 1997). Les traitements conventionnels, c'est-à-dire la radiothérapie, la chimiothérapie et même la résection chirurgicale, entraînent une sur-activation de la voie du TGF β . Dans le cas de la radiothérapie, l'apparition de fibroses plusieurs années après traitement pourrait s'expliquer par une sensibilisation des cellules à la TEM induite par le TGF β , pouvant contribuer au processus fibrotique (Andarawewa *et al*, 2007). Dans certains types de cancers, une bonne réponse aux traitements est corrélée avec une baisse du TGF β circulant. Toutes ces données et observations montrent que l'inhibition de la voie de signalisation du TGF β , en combinaison avec les traitements traditionnels, pourrait se révéler efficace.

Dans cette optique, de nombreux inhibiteurs de la voie du TGF β actuellement en essais cliniques semblent prometteurs. Plusieurs molécules en essais cliniques sont des inhibiteurs de l'activité kinase du récepteur au TGF β de type I comme le LY2109761 qui inhibe de manière impressionnante la formation de métastases dans des modèles murins de tumeurs pancréatiques (Melisi *et al*, 2008) ainsi que les métastases osseuses et pulmonaires de cellules tumorales mammaires (Ganapathy *et al*, 2010). Cependant, une exposition à long terme de cet inhibiteur à des modèles murins de cancers de la peau a montré pour la première fois le développement de résistance acquise aux inhibiteurs de petits poids moléculaires. Les tumeurs rendues ainsi résistantes à la drogue sont plus agressives et présentent un phénotype de cellule ayant subi la TEM avec des capacités invasives accrues (Connolly *et al*, 2011). L'utilisation des inhibiteurs de la voie du TGF β pourrait donc être efficace pour certains types

de tumeurs, dans certaines conditions, en doses limitées et en combinaison avec d'autres inhibiteurs ciblant plus spécifiquement la TEM ou la formation de métastases.

De nouvelles études pré-cliniques basées sur l'administration de molécules anti-sens ciblant le TGF β directement dans les cellules tumorales grâce à une stratégie de vaccins « anti-cancer » se sont révélées prometteuses (Olivares *et al*, 2011).

V - État de la question et objectifs de travail

Le TGF β est décrit depuis longtemps pour ses effets pléiotropiques depuis le développement embryonnaire jusqu'à la vie adulte. Cette cytokine régule de nombreux processus physiologiques tels que la prolifération cellulaire, la différenciation cellulaire, la migration cellulaire ou encore la mort cellulaire. La moindre dérégulation de la voie de signalisation du TGF β entraîne des désordres importants conduisant au développement de pathologies. De nombreuses altérations (mutations, délétions) des acteurs de la voie de signalisation canonique du TGF β (récepteurs, Smads) sont fréquemment observées dans un grand nombre de pathologies et en particulier dans un grand nombre de cancers. Il apparaît donc évident que cette signalisation nécessite d'être régulée très finement.

La protéine TIF1 γ , un nouvel acteur de la voie de signalisation canonique du TGF β , a été identifiée il y a quelques années comme pouvant interagir avec les messagers du signal TGF β , les protéines Smad. Plusieurs travaux suggèrent que la protéine TIF1 γ serait un régulateur négatif des fonctions de Smad4 et un inhibiteur général de la voie du TGF β . En effet, au cours de l'embryogenèse chez le Xénope, TIF1 γ est essentiel pour la spécification de l'ectoderme en inhibant l'induction du mésoderme par le signal TGF β (Dupont *et al*, 2005). De même, TIF1 γ est requis pour doser finement le signal apporté par Nodal et Smad4 au cours du développement embryonnaire chez la souris (Morsut *et al*, 2010). De plus, de nombreux travaux *in vitro* ont montré que TIF1 γ est un régulateur négatif de la transcription de gènes cibles du TGF β (He *et al*, 2006; Morsut *et al*, 2010). En condition de surexpression, des études *in vitro* ont montré que TIF1 γ est capable d'ubiquitiner Smad4 et ainsi d'inhiber la formation du complexe transcriptionnel en amont du signal TGF β (Dupont *et al*, 2009). Cette vision de TIF1 γ comme simple inhibiteur de Smad4 a été complétée par le travail du laboratoire de Joan Massagué démontrant que TIF1 γ peut interagir avec les protéines R-Smad activées par le TGF β . La présence des complexes Smad4-Smad2/3 et TIF1 γ -Smad2/3 seraient un moyen de contrôler différentes branches de la voie de signalisation du TGF β , en particulier au cours de l'hématopoïèse (He *et al*, 2006).

Notre laboratoire a donc cherché à caractériser les rôles respectifs des protéines TIF1 γ et Smad4 dans la voie de signalisation du TGF β . En particulier nous nous sommes intéressés aux interactions de la protéine TIF1 γ avec la voie canonique du TGF β , notamment au cours

de la TEM ou au cours du développement de la glande mammaire, mais également à la régulation des effets de TIF1 γ par une modification post-traductionnelle : la SUMOylation.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

I - Publications

Article 1 : Antagonistic regulation of EMT by TIF1 γ and Smad4 in mammary epithelial cells

Résumé

La voie de signalisation du TGF β est régulée de manière fine au cours du développement et de la vie adulte. Cependant, elle se retrouve dérégulée dans de nombreux contextes pathologiques et en particulier au cours de la progression tumorale. Dans ce cas, le TGF β est considéré comme « une épée à double tranchant ». En effet, cette cytokine peut agir comme suppresseur de tumeur en inhibant la prolifération et en activant l'apoptose de cellules épithéliales. À des stades plus avancés de la progression tumorale, le TGF β peut au contraire promouvoir le développement de la tumeur en favorisant l'angiogenèse, l'échappement à la réponse immune, et en induisant la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM).

La protéine TIF1 γ a été identifiée comme un nouvel acteur de la voie de signalisation canonique du TGF β . Il a été proposé que TIF1 γ serait une ubiquitine ligase capable de mono-ubiquitiner Smad4 et ainsi d'inhiber la formation des complexes transcriptionnels nécessaires à la transduction du signal TGF β jusque dans le noyau. TIF1 γ a également été décrit comme pouvant lier de manière sélective les protéines R-Smad activées et ainsi entrer en compétition avec Smad4 dans le but de réguler un programme transcriptionnel indépendant de Smad4. Dans tous les cas, TIF1 γ agirait comme un régulateur négatif des fonctions de Smad4 dans la voie du TGF β .

Afin de caractériser l'implication de la protéine TIF1 γ dans la voie de signalisation du TGF β et au cours du processus de TEM, nous avons analysé la réponse au TGF β dans des cellules épithéliales mammaires humaines (HMEC-TR). Nous avons analysé le transcriptome de cellules éteintes pour l'expression de TIF1 γ ou Smad4 et traitées ou non au TGF β pendant 24h. Nous avons tout d'abord confirmé l'implication de TIF1 γ dans la voie de signalisation du TGF β en caractérisant pour la première fois les gènes cibles de TIF1 γ en réponse au TGF β .

Nous nous sommes intéressés à un groupe de gènes, impliqués dans la TEM, régulés de manière antagoniste par TIF1 γ et Smad4. Ces gènes représenteraient la signature de l'inhibition des fonctions de Smad4 par TIF1 γ .

L'inactivation de TIF1 γ dans deux lignées de cellules épithéliales mammaires a permis de mettre en évidence le rôle de TIF1 γ au cours de la TEM induite par le TGF β . En effet, le phénotype mésenchymateux induit par la stimulation au TGF β , comme la réorganisation du cytosquelette d'actine en fibres de stress, la perte d'expression de marqueurs épithéliaux (comme la E-Cadhérine) et l'acquisition de marqueurs mésenchymateux (comme la N-Cadhérine ou la Vimentine), est clairement amplifié dans les cellules où l'expression de TIF1 γ est inhibée. De même, l'expression des facteurs de transcription associés à la TEM comme Snail1 et ZEB1 est significativement augmentée en réponse au TGF β dans les cellules éteintes pour TIF1 γ en comparaison aux cellules contrôles. De manière intéressante, le gain de motilité des cellules, associé au processus de TEM, est également accru en absence de TIF1 γ . Ces résultats suggèrent que la protéine TIF1 γ est un régulateur important de la TEM induite par le TGF β .

La protéine Smad4 étant le principal médiateur des effets anti-prolifératifs du TGF β , nous avons analysé l'effet de l'extinction de TIF1 γ sur la prolifération des cellules épithéliales mammaires. Nos résultats montrent que l'extinction de TIF1 γ n'affecte pas la prolifération, la progression du cycle cellulaire et l'expression des gènes maîtres du cycle cellulaire p21 et cMyc. La protéine TIF1 γ ne participerait donc pas à la régulation de l'expression des gènes impliqués dans l'effet anti-prolifératif du TGF β sur les cellules épithéliales.

Pour analyser l'effet de TIF1 γ sur la réponse transcriptionnelle induite par le TGF β , nous avons étudié la régulation transcriptionnelle du gène PAI-1 (Plasminogen-Activator Inhibitor-1), marqueur mésenchymateux dont le promoteur contient plusieurs éléments de réponse aux protéines Smad. L'étude de ce gène, qui appartient au groupe de gènes régulés de manière antagoniste par TIF1 γ et Smad4, a permis de mettre en évidence par des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine que TIF1 γ et Smad4 lient le promoteur avec deux cinétiques différentes, permettant à TIF1 γ d'agir comme répresseur transcriptionnel en limitant l'action de Smad4 sur le promoteur. Ainsi, TIF1 γ fonctionne comme un répresseur des fonctions de Smad4 en exerçant un rôle direct sur l'expression des gènes cibles du TGF β au cours de la TEM.

ANTAGONISTIC REGULATION OF EMT
BY TIF1 γ AND SMAD4
IN MAMMARY EPITHELIAL CELLS

HESLING Cédric*, FATTET Laurent*, TEYRE Guillaume, JURY Delphine, GONZALO
Philippe, LOPEZ Jonathan, VANBELLE Christophe, MOREL Anne-Pierre, GILLET
Germain, MIKAELIAN Ivan & RIMOKH Ruth,

EMBO Reports,

2011

(* co-auteurs)

Antagonistic regulation of EMT by TIF1 γ and Smad4 in mammary epithelial cells

Cédric Hesling^{1,2,3*}, Laurent Fattet^{1,2,4*}, Guillaume Teyre³, Delphine Jury³, Philippe Gonzalo^{1,2,4}, Jonathan Lopez^{1,2,4}, Christophe Vanbelle⁴, Anne-Pierre Morel^{1,2,3}, Germain Gillet^{1,2,3,4}, Ivan Mikaelian^{1,2,3,4} & Ruth Rimokh^{1,2,3,4†}

¹Inserm U1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, ²CNRS UMR5286, ³Centre Léon Bérard, and ⁴Université Lyon 1, Lyon, France

TGF- β is a potent inducer of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), a process involved in tumour invasion. TIF1 γ participates in TGF- β signalling. To understand the role of TIF1 γ in TGF- β signalling and its requirement for EMT, we analysed the TGF- β 1 response of human mammary epithelial cell lines. A strong EMT increase was observed in TIF1 γ -silenced cells after TGF- β 1 treatment, whereas Smad4 inactivation completely blocked this process. Accordingly, the functions of several TIF1 γ target genes can be linked to EMT, as shown by microarray analysis. As a negative regulator of Smad4, TIF1 γ could be crucial for the regulation of TGF- β signalling. Furthermore, TIF1 γ binds to and represses the plasminogen activator inhibitor 1 promoter, demonstrating a direct role of TIF1 γ in TGF- β -dependent gene expression. This study shows the molecular relationship between TIF1 γ and Smad4 in TGF- β signalling and EMT.

Keywords: TIF1 γ ; EMT; TGF- β ; Smad; breast

EMBO reports advance online publication 20 May 2011; doi:10.1038/embor.2011.78

INTRODUCTION

The transforming growth factor- β (TGF- β) pathway is initiated by ligand-induced heterotetrameric complexes of type I and II serine/threonine kinase receptors and Smad (mothers against decapentaplegic homologue 4) transcriptional regulators (Massague *et al*, 2005). Alternatively, non-Smad pathways are involved in TGF- β signalling through mitogen-activated protein kinase, Rho-like or PI3K/AKT pathways (Moustakas & Heldin, 2005). Transcription intermediary factor 1 γ (TIF1 γ)—which was recently shown to be involved in TGF- β signalling—is characterized by several domains; RING finger, B boxes, coiled coil, PHD/TTC and bromodomain (Venturini *et al*, 1999). TIF1 γ is involved in hematopoiesis,

transcription elongation (Ransom *et al*, 2004; He *et al*, 2006; Bai *et al*, 2010) and iNKT-cell development, a subclass of natural killer T-cells (Doisne *et al*, 2009). In *Xenopus* embryos, TIF1 γ (also known as ectodermin) is essential for ectoderm specification by restricting the mesoderm-inducing activity of TGF- β (Dupont *et al*, 2005). The negative control of Smad activity by TIF1 γ controls early mouse development by tuning the responses of extra-embryonic and embryonic cells to Nodal (Morsut *et al*, 2010). It has been proposed that TIF1 γ functions as a RING-finger ubiquitin ligase for Smad4. Smad4 monoubiquitination by TIF1 γ promotes its nuclear export and inhibits the formation of Smad nuclear complexes (Dupont *et al*, 2009). TIF1 γ has also been described as a selective binder of phosphorylated Smad2/3, competing with Smad4 to mediate an alternative, Smad4-independent TGF- β pathway (He *et al*, 2006).

The role of TGF- β in malignant transformation is ambiguous. At the early stages of tumorigenesis, it is an important tumour suppressor inducing apoptosis and cell-cycle arrest. At later stages, it stimulates tumour progression. Indeed, TGF- β promotes angiogenesis and modifications of the extracellular matrix facilitating invasion and metastasis (Thiery *et al*, 2009). In addition, cancer cells lose their ability to be growth-arrested by TGF- β , but retain their ability to undergo epithelial-to-mesenchymal transition (EMT; Massague, 2008; Heldin *et al*, 2009). Although the role of EMT in cancer has long been debated (Garber, 2008), recent advances indicate that EMT contributes to cancer-cell plasticity and to the invasive potential of transformed epithelial cells (Kalluri & Weinberg, 2009). It has been shown to endow normal and transformed mammary epithelial cells with stem-cell-like properties, including the ability to self-renew (Mani *et al*, 2008; Morel *et al*, 2008). Recent studies suggest that in cancer cells, EMT might help to prevent oncogene-induced senescence, thereby facilitating dissemination (Ansieau *et al*, 2008).

TGF- β is known to be a potent inducer of EMT. To better understand the role of TIF1 γ in TGF- β signalling and its requirement for EMT, we analysed TGF- β 1 response in human mammary epithelial cell lines. We show that TIF1 γ inactivation facilitates the contribution of Smad4 to TGF- β 1-induced EMT, but does not affect the anti-proliferative function of TGF- β 1.

¹Inserm U1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon,

²CNRS UMR5286,

³Centre Léon Bérard,

⁴Université Lyon 1, F-69000 Lyon, France

*These authors contributed equally to this work

†Corresponding author. Tel: +33 478782903; Fax: +33 478782720;

E-mail: rimokh@lyon.fnclcc.fr

Received 22 November 2010; revised 1 April 2011; accepted 8 April 2011; published online 20 May 2011

Table 1 | TGF- β 1 target genes (fold change ≥ 2 or ≤ 0.5 ; $P < 0.05$) regulated by TIF1 γ and potentially involved in EMT

Gene symbol	Gene name	ctrl+/ctrl-	si-S4+/ctrl-	si-TIF+/ctrl-
ADAM12*	A disintegrin and metalloproteinase domain 12 (meltrin- α)	2.83	1.31	4.25
<i>AKAP9</i>	A kinase (PRKA) anchor protein (yotiao) 9	2.32	1.25	1.27
<i>CD58</i>	CD58 antigen (lymphocyte function-associated antigen 3)	3.92	1.90	1.77
CDH11*	Cadherin 11, type 2, OB-cadherin (osteoblast)	2.25	1.42	6.29
CDH2*	Cadherin 2, type 1, N-cadherin (neuronal)	2.38	1.05	4.76
<i>CLDN14</i>	Claudin 14	3.38	1.45	1.39
<i>CLDN4</i>	Claudin 4	3.15	0.89	1.43
<i>CLU</i>	Clusterin	2.03	1.56	1.24
<i>COL1A1</i>	Collagen, type I, $\alpha 1$	6.54	0.19	0.41
COL5A1	Collagen, type V, $\alpha 1$	5.59	1.60	9.40
<i>COL5A2</i>	Collagen, type V, $\alpha 2$	2.29	0.64	1.10
<i>FANK1</i>	Fibronectin type 3 and ankyrin-repeat domains 1	2.27	0.66	0.82
<i>HNT</i>	Neurotrimin	2.65	0.52	0.68
<i>ITGB3</i>	Integrin $\beta 3$ (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)	8.26	1.26	3.89
<i>JPH1</i>	Junctophilin 1	0.41	0.76	0.27
<i>KAL1</i>	Kallmann syndrome 1 sequence	2.13	0.91	1.20
<i>KRT16</i>	Keratin 16	2.13	0.4	0.61
KRTHA4	Keratin, Hair, Acidic, 4 (intermediate filament)	5.78	2.28	12.02
<i>MLPH</i>	Melanophilin	2.07	2.85	9.46
<i>MMP10</i>	Matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2)	4.44	0.15	0.48
PIK3CD	Phosphoinositide-3-kinase, Catalytic, delta polypeptide	2.48	1.35	4.01
PKP1	Plakophilin 1 (ectodermal dysplasia/skin fragility syndrome)	2.13	1.16	3.66
<i>PODXL</i>	Podocalyxin-like	2.73	0.43	1.65
SERPINE1*	Plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI1)	5.95	1.14	10.26
<i>TPM1</i>	Tropomyosin 1 (α)	4.55	1.18	2.0
<i>TSPAN-2</i>	Tetraspan 2	3.64	0.85	2.33
<i>WASF3</i>	WAS protein family, member 3	0.50	2.01	1.54
WNT5A	Wingless-type MMTV integration site family, member 5A	2.44	1.44	3.90
WNT5B*	Wingless-type MMTV integration site family, member 5B	4.29	2.87	8.87
WNT9A*	Wingless-type MMTV integration site family, member 9A	2.23	0.44	7.17

ctrl, control; EMT, epithelial-to-mesenchymal transition; S4, Smad4; TGF- β 1, transforming growth factor- β 1; TIF1 γ , transcription intermediary factor 1 γ .

Genes showing opposite responses to Smad4 or TIF1 γ downregulation are presented in bold.

*Target genes for which quantitative reverse transcription PCR was performed.

RESULTS

Identification of TIF1 γ target genes

We characterized TIF1 γ target genes during TGF- β 1-induced EMT by transcriptomic analysis of HMEC-TR cells silenced for TIF1 γ or Smad4 (supplementary Fig S1 online). The original data are available at the Gene Expression Omnibus database under accession number GSE28448. Microarray data were confirmed by quantitative reverse transcription (qRT)-PCR analysis of 14 TGF- β 1 target genes (supplementary Fig S2 online). From the 707 TIF1 γ -dependent genes (supplementary Table S2 online), we selected 96 genes encoding proteins involved in cytoskeleton

dynamics, cell-cell and cell-matrix adhesion (supplementary Table S3 online), and potentially in EMT. Other functional groups are shown in supplementary Table S4 online. TGF- β 1 target genes (fold change ≥ 2) regulated by TIF1 γ and potentially involved in EMT are shown in Table 1. Of the 457 genes regulated by TIF1 γ and Smad4, 37 showed opposite responses to Smad4 or TIF1 γ downregulation (supplementary Table S5 online). These 37 genes could represent the signature of the repressive function of TIF1 γ on Smad4. Of these, 12 encode proteins with functions linked to EMT, such as N-cadherin. The expression of TIF1 γ -dependent genes was analysed in another mammary epithelial cell line

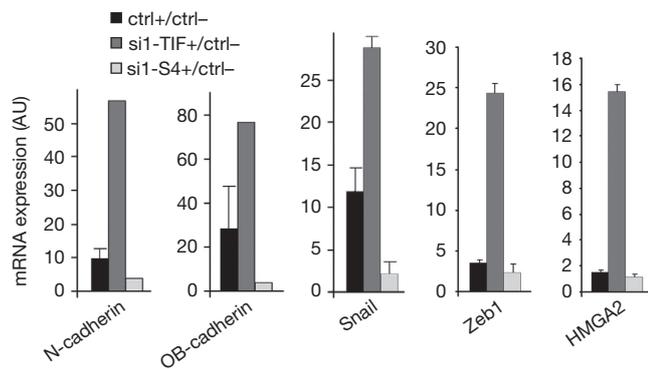


Fig 1 | MCF10A cells inactivated for TIF1 γ or Smad4 were treated with TGF- β 1 for 9 h. Expression of the indicated genes was determined by qRT-PCR. Values were normalized to the amount of HPRT mRNA and expressed relative to the value obtained in TGF- β 1-untreated controls. Error bars represent s.d. The experiment shown is representative of at least two separate experiments conducted in triplicate. AU, arbitrary units; ctrl, control; HPRT, hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase; mRNA, messenger RNA; siRNA, short-interfering RNA; S4, Smad4; TGF- β 1, transforming growth factor- β 1; TIF, transcription intermediary factor 1 γ .

(MCF10A) by qRT-PCR. The TGF- β 1-induced upregulation of genes such as N-cadherin, OB-cadherin, *SNAIL*, *ZEB1* and *HMGA2*, was abolished by Smad4 silencing, but enhanced by TIF1 γ silencing (Fig 1). Together, these results show that TIF1 γ target genes are not restricted to HMEC-TR cells and that TIF1 γ could be involved in the regulation of TGF- β 1-induced EMT.

TIF1 γ inactivation enhances TGF- β -induced EMT

Results from transcriptomic analysis showed that several TIF1 γ target genes are involved in EMT. To address the role of TIF1 γ during EMT, we used the mammary epithelial cell lines MCF10A and HMEC-TR. First, we validated that TGF- β 1 induces characteristic features of EMT in these cells (Fig 2). Compared with control cells treated with TGF- β 1, TIF1 γ -silenced cells had increased actin polymerization, reorganization of stress fibres into large linear and parallel bundles and fibroblast-like elongated morphology (Fig 2A,B). Immunofluorescence analysis and western blotting also showed increased expression of N-cadherin and vimentin and downregulation of E-cadherin (Fig 2). Similar results were obtained with a second short-interfering RNA (siRNA) targeting human TIF1 γ messenger RNA (mRNA; supplementary Fig S3 online). By contrast, Smad4 silencing or double Smad4 and TIF1 γ knockdown led to a complete block of TGF- β 1-induced EMT (Fig 2). These results support the idea that Smad4 has a key role in TGF- β 1-induced EMT (Valcourt *et al*, 2005; Deckers *et al*, 2006). To check whether TGF- β 1-induced EMT is reversible, MCF10A cells that were stably inactivated for TIF1 γ were exposed to TGF- β 1 for 21 days. A full EMT phenotype was observed, with gradual reversion to epithelial cells resembling parental MCF10A cells after TGF- β 1 removal and adjunction of T β RI kinase inhibitor (SB-431542; supplementary Fig S4 online). We next tested whether EMT in TIF1 γ knockdown cells was accompanied by a modification of cell motility. Results of wound healing assays in

MCF10A cells monitored by time-lapse video microscopy indicated that untreated cells on both sides of the wound moved as a cohesive unit (Fig 3). This organized migration was compromised in cells that had undergone EMT under TGF- β 1 treatment. By contrast, TIF1 γ -silenced cells quickly moved into the wound (supplementary Fig S5 online), resulting in faster closure. As expected, Smad4 silencing reduced cell motility. These results show that TIF1 γ has an important regulatory role in TGF- β 1-induced EMT.

Inactivation of TIF1 γ has no effect on cell proliferation

As Smad4 is a transmitter of growth-inhibitory effects of TGF- β 1, we analysed the effect of TIF1 γ inactivation on MCF10A and HMEC-TR proliferation. Growth inhibition was observed in TGF- β 1-treated cells (Fig 4A). TIF1 γ silencing had no effect on TGF- β 1-induced growth arrest, whereas, as expected, Smad4 silencing suppressed this arrest. We next examined the extent to which TIF1 γ downregulation altered cell-cycle progression in HMEC-TR cells. Four days after TGF- β 1 treatment, DNA content was analysed by flow cytometry. Cell-cycle distribution was not modified by TIF1 γ silencing, whereas, as expected, Smad4 silencing suppressed the effect of TGF- β 1 (supplementary Fig S6 online). These results are consistent with qRT-PCR data for the known Smad4 target genes p21 (CDKN1A) and MYC. In contrast to Smad4 silencing, inactivation of TIF1 γ did not affect the modulation of p21 and MYC expression induced by TGF- β 1 in MCF10A and HMEC-TR cell lines (Fig 4B). Moreover, several Smad4 target genes involved in the regulation of cell proliferation did not seem to be TIF1 γ target genes (supplementary Table S6 online). Taken together, these results indicate that TIF1 γ is not involved in the regulation of the proliferation of mammary epithelial cells upon TGF- β 1 treatment.

TIF1 γ inhibits TGF- β 1 transcriptional response

The TGF- β 1-induced accumulation of plasminogen activator inhibitor 1 (PAI1) mRNA was abolished by Smad4 silencing, but strongly enhanced upon TIF1 γ silencing (Fig 5A; supplementary Fig S2 online). We next tested whether TIF1 γ could modulate the transcriptional activity of *PAI1*, which is known to respond to TGF- β 1 in a Smad4-dependent manner. As observed for the (CAGA)₉-Luc reporter (supplementary Fig S7A,B online), exogenous TIF1 γ inhibited the TGF- β 1-induced transactivation of *PAI1*-Luc, whereas TIF1 γ inactivation enhanced signalling (Fig 5B). The Ub-ligase activity of TIF1 γ is essential for inhibiting luciferase reporters that are sensitive to TGF- β (Dupont *et al*, 2009). Isolated domains of TIF1 γ (TRIM, middle or PHD/Br) have no biological effect on luciferase reporter construct (Dupont *et al*, 2009; supplementary Fig S7C online), suggesting that the full length of the protein is required. These findings indicate that TIF1 γ negatively affects Smad4 function, compromising TGF- β 1 signalling.

To test whether TIF1 γ can bind to the *PAI1* promoter region harboring the Smad-binding elements, we performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) analyses. As expected, Smad4 was specifically immunoprecipitated with the endogenous *PAI1* promoter after TGF- β treatment. Interestingly, TIF1 γ was able to bind to the same region of the *PAI1* promoter (Fig 5C). Consistent with results showing that TIF1 γ inhibits the Smad3/4 complex (He *et al*, 2006; supplementary Fig S8A,B online), TIF1 γ protein expression reduced the Smad4-DNA association and enhanced its

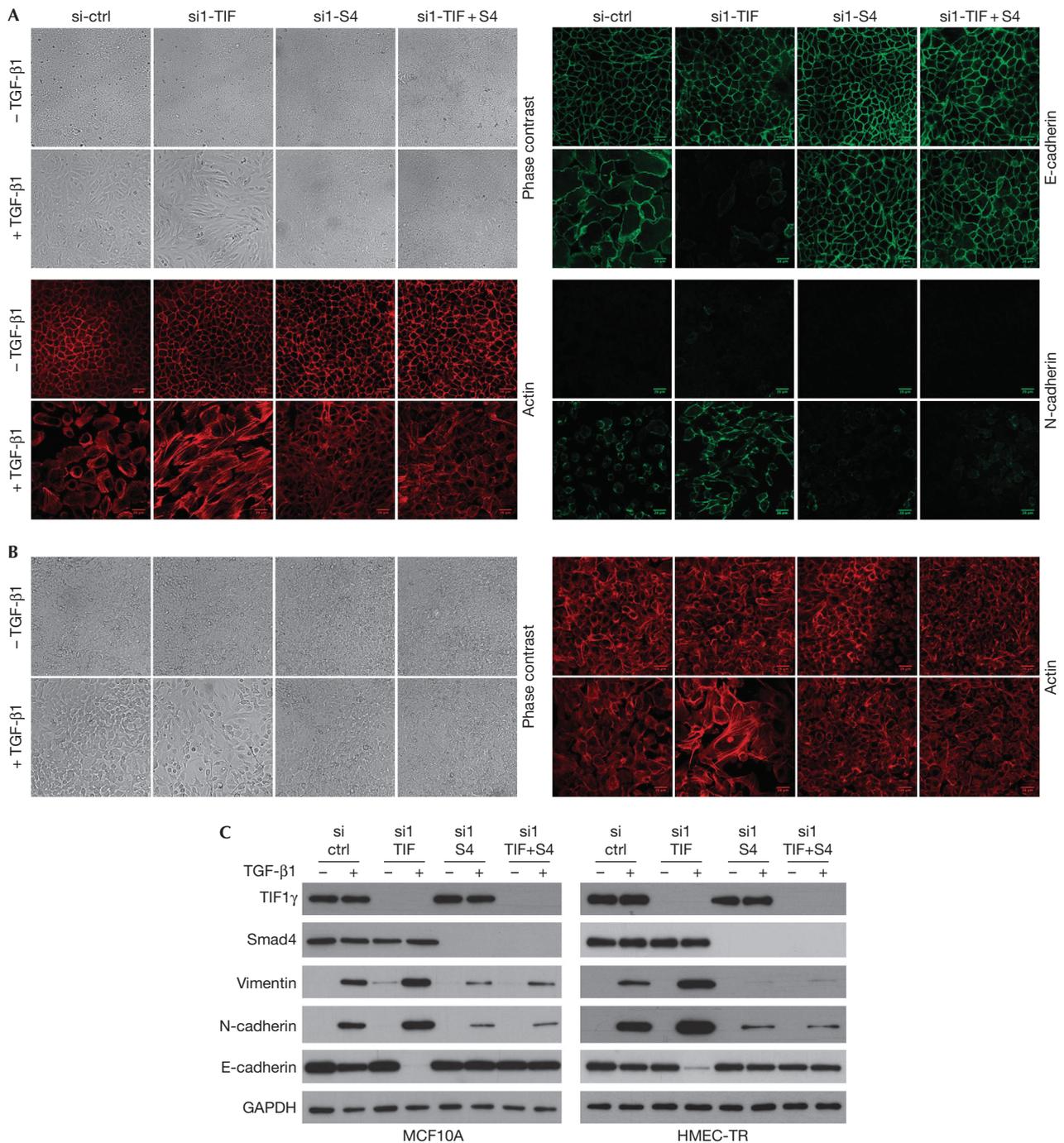


Fig 2 | Inactivation of TIF1 γ expression enhances TGF- β 1-induced EMT. MCF10A (A) and HMEC-TR (B) cells were knocked down using siRNA and treated or not with TGF- β 1 for 96 h. To block any signalling arising from autocrine production of TGF- β , experiments without TGF- β were performed using the T β RI kinase inhibitor SB-431542. Phase-contrast images ($\times 10$) and immunofluorescence confocal acquisitions showing actin subcellular localization detected by phalloidin or indirect immunofluorescence using E- or N-cadherin-targeting antibodies. Scale bars, 26 μ m. (C) Endogenous TIF1 γ , Smad4, vimentin, N-cadherin and E-cadherin levels were determined by immunoblotting. GAPDH was used as a loading control. ctrl, control; EMT, epithelial-to-mesenchymal transition; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; siRNA, short-interfering RNA; S4, Smad4; TGF- β 1, transforming growth factor- β 1; TIF, transcription intermediary factor 1 γ .

association with DNA (Fig 5D). Next, we analysed the kinetics of Smad4 and TIF1 γ binding to DNA after TGF- β stimulation. TIF1 γ binding to the promoter was detected under basal condition.

TGF- β 1 caused TIF1 γ release from the promoter and induced Smad4 recruitment. Two hours after TGF- β 1 treatment, TIF1 γ was recruited instead of Smad4 (Fig 5E,F). Interestingly, 90 min after

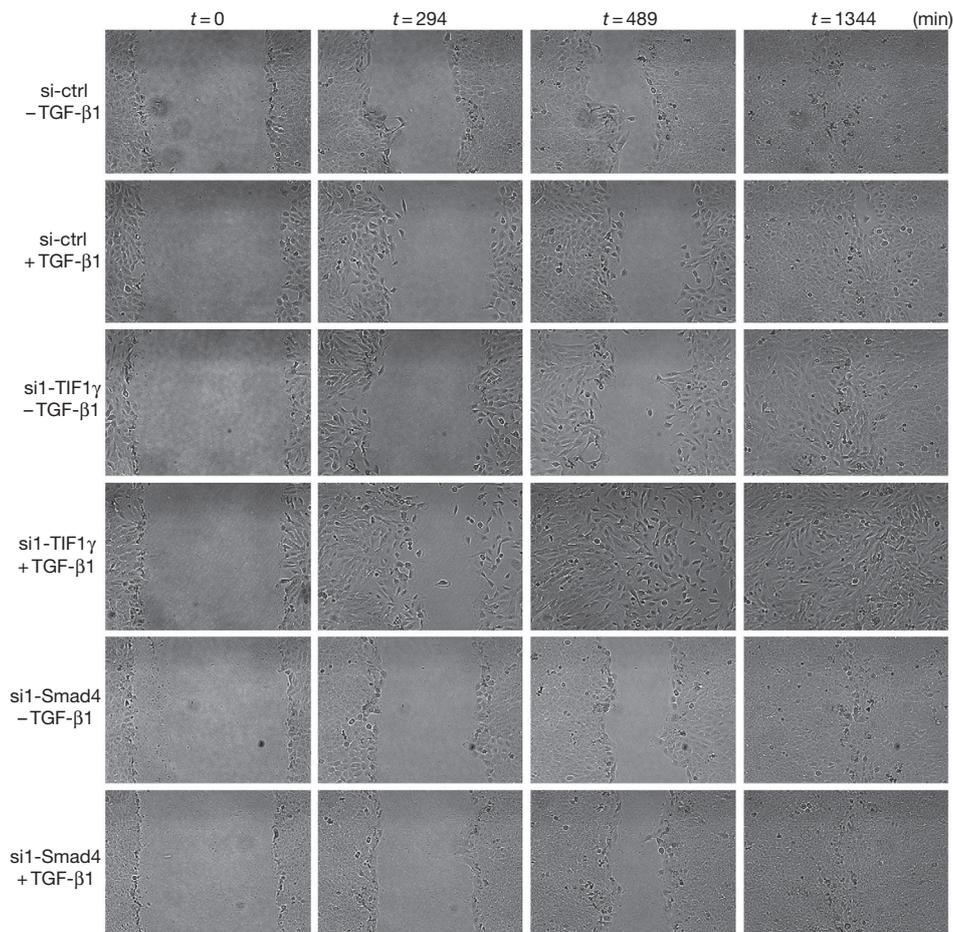


Fig 3 | Inactivation of TIF1 γ expression enhances TGF- β 1-induced cell migration. After the wound, the healing process of MCF10A cells was observed over 24 h using time-lapse photography. Images were combined into a film. Illustrative stills from the time-lapse recording are representative of at least three independent experiments. ctrl, control; TGF- β 1, transforming growth factor- β 1; TIF1 γ , transcription intermediary factor 1 γ .

TGF- β 1 treatment, both Smad4 and TIF1 γ bound to the *PAI1* promoter, suggesting that an intermediary and transitory complex could exist between TIF1 γ and Smad4. These results are in agreement with data showing that TIF1 γ interacts with Smad4 and promotes its nuclear export (Dupont *et al*, 2009; supplementary Fig S8D online). TIF1 γ silencing enhanced Smad4 binding to DNA with the same kinetics (Fig 5G). These results indicate that TIF1 γ can function as a repressor of Smad4 and thus has a direct role in TGF- β 1-dependent gene expression.

DISCUSSION

This study demonstrates that TIF1 γ participates in TGF- β signalling as a negative regulator of Smad4 during TGF- β -induced EMT in mammary epithelial cell lines. Inactivation of TIF1 γ markedly intensifies the mesenchymal characteristics triggered by TGF- β . By contrast, Smad4 downregulation leads to complete inhibition of TGF- β -induced EMT. These results are supported by microarray data showing that several genes involved in EMT are antagonistically regulated by Smad4 and TIF1 γ . Taken together, our results show that TIF1 γ inactivation enhances the function of Smad4 during TGF- β -induced EMT, but does not affect the

anti-proliferative function of TGF- β . In the light of the morphogen-like properties of TGF- β and the role of TIF1 γ in the embryo and in trophoblast stem cells (Morsut *et al*, 2010), TGF- β -mediated induction of growth arrest can be considered a low-threshold response, requiring prolonged association of Smad with its target promoter. Other responses, such as EMT induction, might correspond to higher threshold responses.

As shown previously (He *et al*, 2006), we have found that TIF1 γ expression decreases Smad3/4 interaction and favours Smad3/TIF1 γ complex, whereas TIF1 γ downregulation favours Smad3/4 complex required for Smad4 function (supplementary Fig S8A,B online). TIF1 γ interacts with Smad4 (Dupont *et al*, 2009; supplementary Fig S8D online) and our demonstration that TIF1 γ inhibits Smad4 function is consistent with the TGF- β -dependent ubiquitination of Smad4 by TIF1 γ (Dupont *et al*, 2009). TIF1 γ could destroy the association of Smad4 with Smad2/3, causing inhibition of Smad4 function. In TIF1 γ -depleted cells, Smad4 is more available for association with Smad2/3, leading to enhanced TGF- β signalling. These results corroborate data from CHIP assays showing that TIF1 γ can function as a repressor of Smad4. TIF1 γ expression inhibits Smad4 binding to DNA and is involved in the

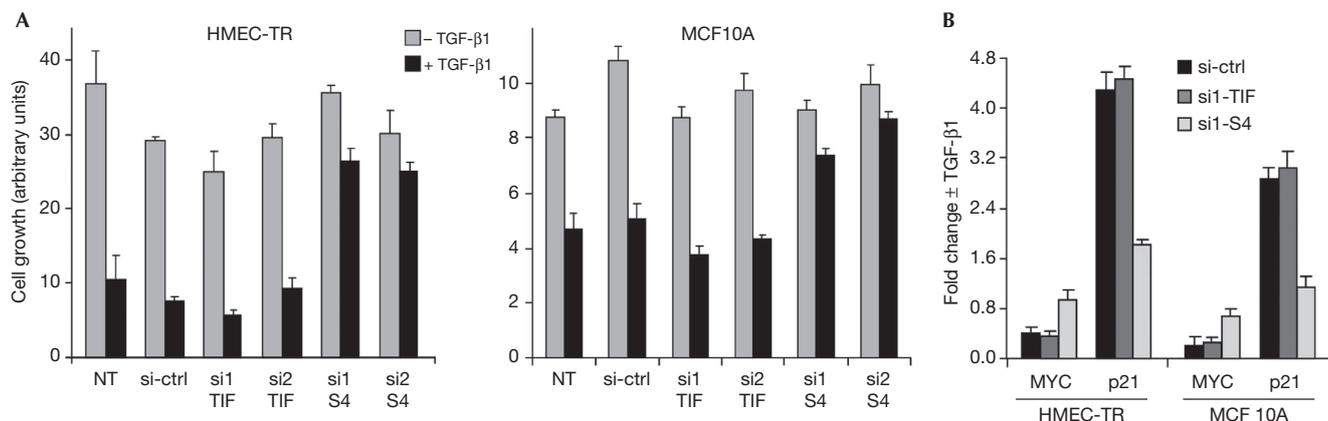


Fig 4 | Inactivation of TIF1 γ expression has no effect on cell proliferation. (A) Proliferation of TIF1 γ or Smad4-inactivated cells cultured with or without TGF- β 1 for 96 h. (B) Cells were treated with TGF- β 1 for 9 h. TGF- β -induced fold changes of p21 (CDKN1A) and MYC were analysed by qRT-PCR. All values were normalized to the amount of HPRT messenger RNA and expressed relative to the value obtained for TGF- β -untreated controls. The experiments shown are representative of three separate experiments performed in triplicate. Error bars indicate s.d. ctrl, control; NT, not transfected; qRT-PCR, quantitative reverse transcription PCR; S4, Smad4; TGF- β 1, transforming growth factor- β 1; TIF, transcription intermediary factor 1 γ .

interplay of Smad4 with the transcriptional machinery in TGF- β -mediated transcription. TIF1 γ can interact with phosphorylated Smad2/3 (He *et al*, 2006; supplementary Fig S8A–C online), and thus we cannot exclude its role in an alternative, Smad4-independent TGF- β pathway.

EMT triggered by TGF- β is regulated by TIF1 γ , which limits Smad4 function, suggesting that TIF1 γ alterations could contribute to the nature of aggressive cancer cells by promoting EMT, probably facilitating cell invasion. Finally, these results corroborate data from mouse models, showing that loss of TIF1 γ function cooperates with KrasG12D activation to induce pancreatic tumours (Vincent *et al*, 2009).

METHODS

Cell culture and siRNA transfection. Human mammary epithelial cells infected with a retrovirus carrying hTERT and the oncogenic allele H-RasV12 (HMEC-TR) were provided by RA Weinberg (Elenbaas *et al*, 2001). The mammary epithelial cell line MCF10A was obtained from American Type Culture Collection. Recombinant TGF- β 1 (Peprotech) was used at 10 ng/ml. A total of 1.5×10^5 cells were collected in OptiMEM medium (Invitrogen) and transfected with 5 nM siRNA and 0.5 μ l/ml lipofectamine RNAi-Max (Invitrogen). Cells were cultured for 48 or 96 h in complete fresh medium supplemented or not with TGF- β 1. The siRNA sequences used are listed in supplementary Table S7 online.

Microarray analysis. Replicates of total RNA from HMEC-TR cells silenced for TIF1 γ or Smad4 were obtained from two independent cell cultures. The microarrays were performed using GeneChip Human Genome U133 plus 2.0 Arrays (Affymetrix) as described previously (Hesling *et al*, 2007). The original data are available from the Gene Expression Omnibus (accession number GSE28448). Normalized data were statistically filtered with GeneSpring software (Agilent) using Pairwise comparison (supplementary information online).

qPCR. One microgram of total RNA was used for complementary DNA synthesis with the SuperScript II Reverse Transcriptase system (Invitrogen). mRNA levels were quantified using the SYBR

Green StepOne Plus Real Time PCR system (Applied Biosystems). Primers are listed in supplementary Table S8 online.

Western blot analysis. Lysates of cells prepared in RIPA lysis buffer were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, electroblotted onto polyvinylidene difluoride transfer membrane, stained with specific primary antibodies (Smad4, SantaCruz Biotechnology; TIF1 γ , Euromedex; vimentin, Dako; E-cadherin and N-cadherin, BD Biosciences) and horseradish-peroxidase-linked secondary antibodies, and then detected with electrochemiluminescence plus reagent (Roche).

Proliferation assays. SiRNA-treated cells were seeded in triplicate, cultured for 4 h and then treated with TGF- β 1. At each time point, cells were treated with Uptiblu (Interchim) and incubated for 4 h at 37 $^{\circ}$ C. Fluorescence intensity was monitored at 530–560 nm excitation wavelength and 590 nm emission wavelength (CytoFluor, PerSeptive Biosystem).

Immunofluorescence. Cells were fixed in 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS), permeabilized with 0.4% Triton X-100 in PBS for 5 min and subsequently stained with 0.25 mM tetramethyl rhodamine iso-thiocyanate-conjugated phalloidin (Sigma-Aldrich), E-cadherin or N-cadherin antibodies. Fluorescence was examined by confocal laser scanning microscopy (Carl Zeiss).

Wound healing. MCF10A cells were grown to confluence with or without TGF- β 1. Medium was aspirated and a gel filter tip was drawn carefully through the monolayer to create a wound between cells. After washing with PBS, fresh medium was added, with or without TGF- β 1. Plates were transferred to a heated stage on a Zeiss microscope. The field of view was centred on a section of the wound. Phase images were recorded every minute for up to 24 h and then processed into a film.

Luciferase assays. HMEC-TR cells transfected or not with siRNAs or expression vectors were co-transfected with a *PAl1* promoter (p800-Luc) luciferase construct (supplementary information online). Luciferase activity was measured in equivalent amounts of each lysate using the dual luciferase kit (Promega).

ChIP. HMEC-TR cells transfected or not with *PAl1* promoter (p800-Luc) were treated or not with TGF- β 1 for the indicated time.

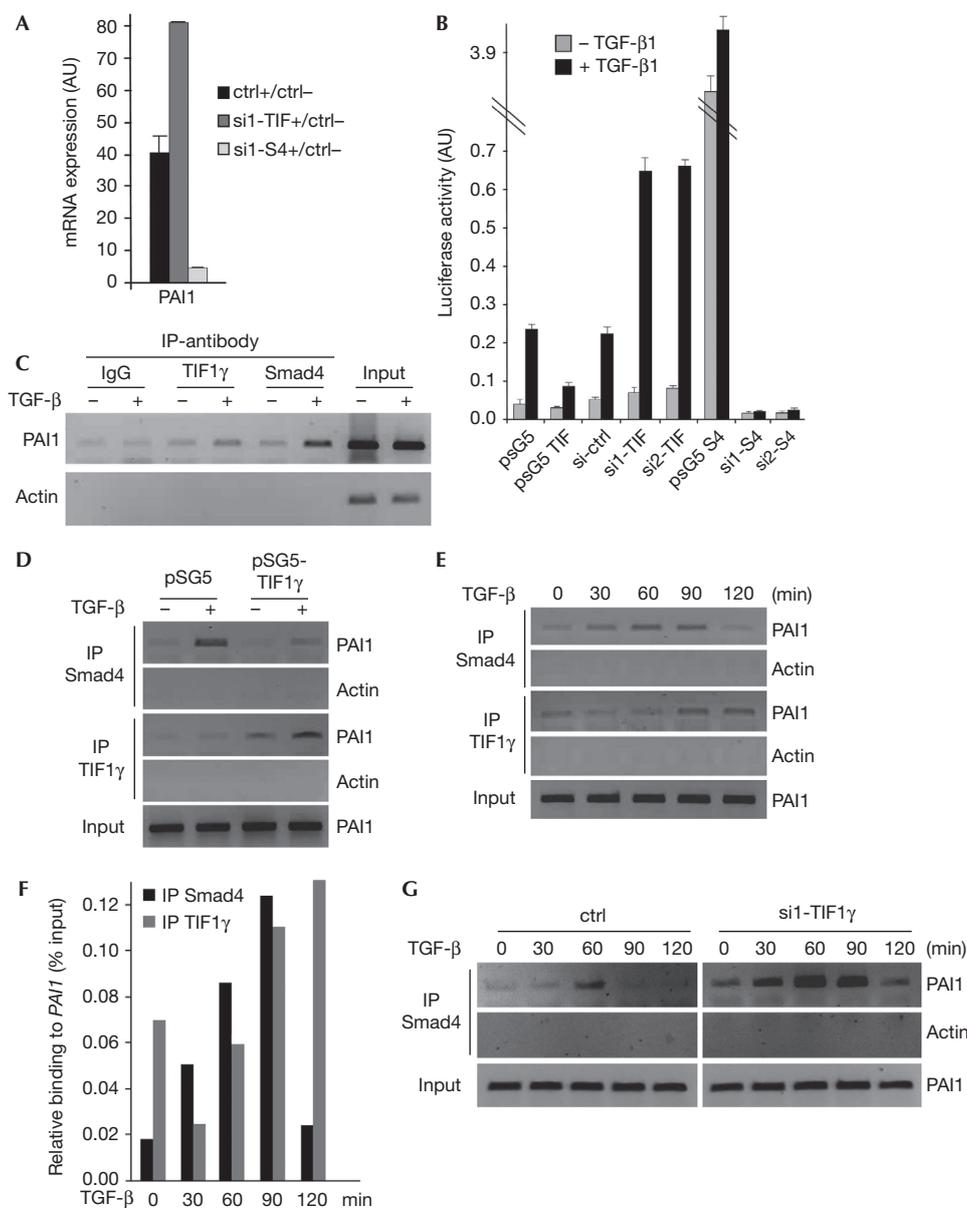


Fig 5 | TIF1 γ inhibits TGF- β 1 signalling. (A) HMEC-TR cells inactivated for TIF1 γ or Smad4 were treated with TGF- β 1 for 9 h. TGF- β 1-induced fold changes of PAI1 were analysed by qRT-PCR. All values were normalized to the amount of HPRT messenger RNA and expressed relative to the value obtained for TGF- β 1-untreated controls. The experiment shown is representative of three separate experiments performed in triplicate; error bars represent s.d. (B) HMEC-TR cells were co-transfected with the pGL3(PAI1)-Luc vector together with the pRL-CMV (cytomegalovirus) internal control vector and expression vectors or short-interfering RNA, as indicated. Relative luciferase activity is given as the mean \pm s.d. of an experiment performed in triplicate, representative of three experiments. (C,D) ChIP assay was performed on HMEC-TR cells transfected (D) or not (C) with TIF1 γ expression vector as indicated and treated with TGF- β 1 for 2 h. PCR amplification of endogenous PAI1 promoter (733/484) was performed to detect protein-bound DNA. Rabbit preimmune serum was used as a negative control. Primers specific to PAI1 were used before (input) and primers specific for actin were used after immunoprecipitation as a control to monitor immunoprecipitation specificity. (E,F) ChIP assay of the kinetics of Smad4 and TIF1 γ binding to DNA after TGF- β 1 stimulation. HMEC-TR cells transfected with PAI1 promoter were subjected to PCR analysis (E). The relative binding of Smad4 and TIF1 γ proteins to the human PAI1 promoter was also measured by qRT-PCR analysis of the precipitated DNA and input DNA (F). Results are expressed as percentages of the total DNA input. The data shown correspond to one of two independent experiments performed with comparable results. (G) ChIP assay of the kinetics of Smad4 binding to DNA after TGF- β 1 stimulation. HMEC-TR cells transfected with PAI1 promoter and inactivated for TIF1 γ were subjected to PCR analysis. AU, arbitrary units; ChIP, chromatin immunoprecipitation; ctrl, control; IgG, immunoglobulin G; IP, immunoprecipitation; PAI1, plasminogen activator inhibitor 1; qRT-PCR, quantitative reverse transcription PCR; S4, Smad4; TGF- β 1, transforming growth factor- β 1; TIF, transcription intermediary factor 1 γ .

Assays were carried out using the kit from Upstate Biotechnology. Cell lysates were subjected to anti-Smad4 (SantaCruz) or anti-TIF1 γ (Bethyl) immunoprecipitation. Rabbit IgG (Abcam) was used as a negative control. Following reverse crosslinking, DNA was treated with proteinase K and purified. Smad4- or TIF1 γ -precipitated genomic DNA was subjected to PCR. The 351 bp *PAI1* promoter region harbouring the Smad-binding elements was amplified with primers 5'-AGCCAGACAAGGTTGTTG-3' and 5'-GACCACCTCCAGGAAAG-3'. An unrelated genomic DNA sequence (*actin*) was amplified with primers 5'-AGCCATGTAC GTTGCTATCCAG-3' and 5'-CTTCTCCTTAATGTCACGCACG-3'. The relative binding of proteins of interest Smad4 and TIF1 γ to the human *PAI1* promoter was also measured by real-time quantitative PCR analysis of the precipitated DNA and input DNA. Results are presented as 'percent input' values.

Supplementary information is available at EMBO reports online (<http://www.emboports.org>).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank R.A. Weinberg for providing HMEC derivatives and C. Languilaire for excellent technical assistance. We also thank M.D. Reynaud for help in manuscript preparation, S. Croz from ProfileXpert for microarray study and CeCIL platform (Structure Fédérative de Recherche; SFR Santé Lyon-Est) for videomicroscopic study. This work was supported by grants from the Ligue Nationale contre le Cancer (Savoie, Saone & Loire), Institut National du Cancer (INCA), Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC) and IFR62.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- Ansieau S *et al* (2008) Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence. *Cancer Cell* **14**: 79–89
- Bai X *et al* (2010) TIF1 γ controls erythroid cell fate by regulating transcription elongation. *Cell* **142**: 133–143
- Deckers M, van DM, Buijs J, Que I, Lowik C, van der PG, Ten DP (2006) The tumor suppressor Smad4 is required for transforming growth factor β -induced epithelial to mesenchymal transition and bone metastasis of breast cancer cells. *Cancer Res* **66**: 2202–2209
- Doisne JM *et al* (2009) iNKT cell development is orchestrated by different branches of TGF- β signaling. *J Exp Med* **206**: 1365–1378
- Dupont S, Zacchigna L, Cordenonsi M, Soligo S, Adorno M, Rugge M, Piccolo S (2005) Germ-layer specification and control of cell growth by Ectoderm, a Smad4 ubiquitin ligase. *Cell* **121**: 87–99
- Dupont S *et al* (2009) FAM/USP9x, a deubiquitinating enzyme essential for TGF β signaling, controls Smad4 monoubiquitination. *Cell* **136**: 123–135
- Elenbaas B, Spirio L, Koerner F, Fleming MD, Zimonjic DB, Donaher JL, Popescu NC, Hahn WC, Weinberg RA (2001) Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. *Genes Dev* **15**: 50–65
- Garber K (2008) Epithelial-to-mesenchymal transition is important to metastasis, but questions remain. *J Natl Cancer Inst* **100**: 232–233, 239
- He W, Dorn DC, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Moore MA, Massague J (2006) Hematopoiesis controlled by distinct TIF1 γ and Smad4 branches of the TGF β pathway. *Cell* **125**: 929–941
- Heldin CH, Landstrom M, Moustakas A (2009) Mechanism of TGF- β signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition. *Curr Opin Cell Biol* **21**: 166–176
- Hesling C, Oliveira CC, Castilho BA, Zanchin NI (2007) The Shwachman-Bodian-Diamond syndrome associated protein interacts with HsNip7 and its down-regulation affects gene expression at the transcriptional and translational levels. *Exp Cell Res* **313**: 4180–4195
- Kalluri R, Weinberg RA (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* **119**: 1420–1428
- Mani SA *et al* (2008) The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* **133**: 704–715
- Massague J (2008) TGF β in cancer. *Cell* **134**: 215–230
- Massague J, Seoane J, Wotton D (2005) Smad transcription factors. *Genes Dev* **19**: 2783–2810
- Morel AP, Lievre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau S, Puisieux A (2008) Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS ONE* **3**: e2888
- Morsut L *et al* (2010) Negative control of Smad activity by ectoderm/Tif1 γ patterns the mammalian embryo. *Development* **137**: 2571–2578
- Moustakas A, Heldin CH (2005) Non-Smad TGF β signals. *J Cell Sci* **118**: 3573–3584
- Ransom DG *et al* (2004) The zebrafish moonshine gene encodes transcriptional intermediary factor 1 γ , an essential regulator of hematopoiesis. *PLoS Biol* **2**: E237
- Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA (2009) Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* **139**: 871–890
- Valcourt U, Kowanetz M, Niimi H, Heldin CH, Moustakas A (2005) TGF- β and the Smad signaling pathway support transcriptomic reprogramming during epithelial-mesenchymal cell transition. *Mol Biol Cell* **16**: 1987–2002
- Venturini L *et al* (1999) TIF1 γ , a novel member of the transcriptional intermediary factor 1 family. *Oncogene* **18**: 1209–1217
- Vincent DF *et al* (2009) Inactivation of TIF1 γ cooperates with Kras to induce cystic tumors of the pancreas. *PLoS Genet* **5**: e1000575

Antagonistic regulation of EMT by TIF1 γ and Smad4 in mammary epithelial cells

Hesling C, Fattet L, Teyre G, Jury D, Gonzalo P, Lopez J, Vanbelle C, Morel AP, Gillet G, Mikaelian I, Rimokh R

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Methods

Microarray Analysis. Transcriptomic microarray analysis was performed on HMEC-TR cells silenced for TIF1 γ or Smad4 (si-control, si1-TIF1 γ or si1-Smad4). The regulation of EMT by TGF β 1 involves several cellular responses; we consequently examined changes in gene expression at 24 hours after TGF β 1 treatment. Efficient TIF1 γ and Smad4 silencing was checked by quantitative RT-PCR and Western Blotting (Fig S1). RNA quality was assessed using an Agilent Bioanalyzer (model 2100; Agilent Technologies). Before hybridization, RNA was amplified to obtain cRNA and was labeled using One-Cycle cDNA Synthesis Kit (Affymetrix) according to the manufacturer's instructions. The stained arrays were scanned on an Affymetrix GeneChip Scanner 3000-7G. The raw signal was extracted and normalized using GeneChip Operating Software version 1.4 (GCOS1.4). All quality controls were in the expected range indicated by Affymetrix. A given mRNA transcript was considered differentially expressed in a comparison of any two samples if the difference between expression levels had a p value of ≤ 0.05 in the Welch Anova parametric test using a multiple test correction (Benjamini and Hochberg false discovery rate). TIF1 γ and Smad4 target genes were classified in three subgroups by GeneSpring filtering using a combination of three cut-offs as shown in Table S1. Genes whose expression was modified by TIF1 γ or Smad4 knockdown after TGF β 1 treatment were identified from the list of TGF β 1-dependent genes based on the average ratios of si-TIF1 γ +/ctrl+ (>1.5) and si-Smad4+/ctrl+ (>1.5) respectively (Table S1). Both siTIF1 γ +/ctrl- and si-Smad4+/ctrl- ratios were calculated and are presented in comparison with the ctrl+/ctrl- ratio. We identified 1047 genes whose expression was exclusively modified by Smad4 inhibition (Smad4-dependent and TIF1 γ -independent genes, SDTI), 457 genes whose expression was modified by the down-regulation of both proteins (Smad4-dependent and TIF1 γ -dependent genes, SDTD) and 250 genes exclusively regulated by TIF1 γ knockdown (Smad4-independent and TIF1 γ -dependent genes, SITD). The three complete lists are shown in Supplementary data (Table S2).

Immunoprecipitation and western blot analysis. TIF1 γ and/or flag-Smad3 expression vectors were transfected, either alone or in combination, into HMEC-TR cells using FuGENE HD (Roche). The cells were then incubated for 48h and treated or not with TGF β 1 for 2h, and total cell lysates were collected. The proteins were immunoprecipitated with anti-Flag (Euromedex) or anti-TIF1 γ (Bethyl) antibodies and Protein A/G-agarose (Fast Flow, Millipore), separated by SDS/PAGE (10%), electroblotted onto PVDF transfer membrane, stained with the specific primary antibodies anti-flag EL1B11 (Euromedex), anti-Smad4 (SantaCruz biotechnology), anti-TIF1 γ (Euromedex) and horseradish-peroxidase-linked secondary antibodies, and then detected with ECL plus reagent (Roche).

Luciferase assays. HMEC-TR cells were transfected or not with siRNAs in 24-well-plates, cultured in complete medium for 24h and then co-transfected with 150 ng of (CAGA)₉-MLP-Luc (Dennler *et al.*, 1998) or PAI-1 promoter (p800-Luc) luciferase constructs and 50 ng of the indicated construct (pSG5-TIF1 γ or Smad4) expressing vectors. The pRL-TK vector (25 ng; Promega) was used as internal control for transfection efficiency. After transfection, the cells were cultured for an additional 24h in complete medium with or without TGF β 1. Transfected cells were then washed and collected. Luciferase activity was measured in equivalent amounts of each lysate using the dual luciferase kit (Promega). Luciferase firefly activity was normalized to the *Renilla* luciferase activity of the pRL-TK vector. Experiments were performed in triplicate and each set was repeated at least three times.

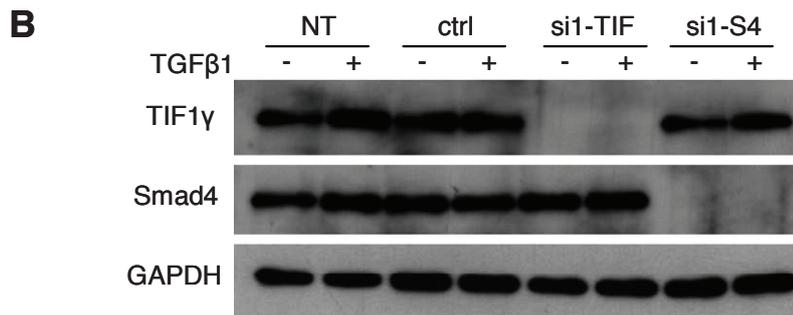
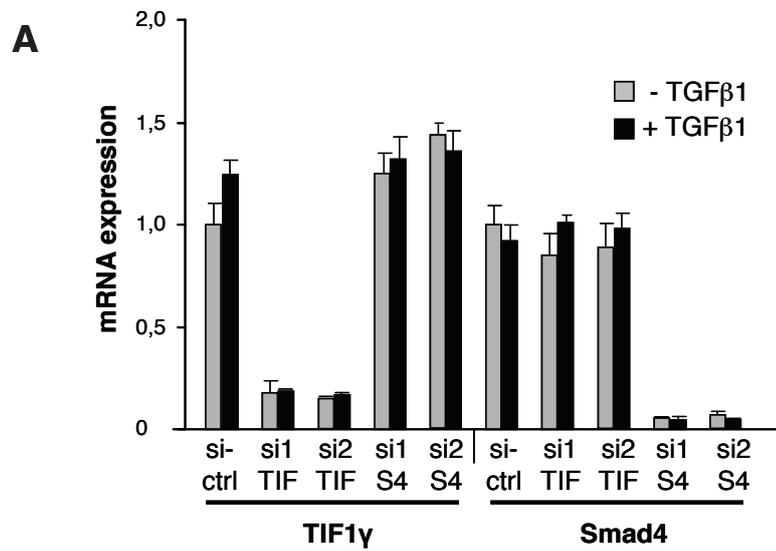


Fig S1: Validation of TIF1 γ and Smad4 transient down regulation. HMEC-TR cells transfected with control siRNA (ctrl) or two siRNA sequences targeting human TIF1 γ or Smad4 mRNA were treated with TGF β for 24h. **(A)** Expression of TIF1 γ and Smad4 was determined by quantitative PCR. Values were normalized to the amount of HPRT mRNA and expressed relative to the value obtained in control TGF β 1-untreated cells. The experiment shown is representative of five separate experiments performed in triplicate. Error bars represent s.d. **(B)** The levels of endogenous TIF1 γ , Smad4 and GAPDH were determined by immunoblotting. ctrl, control; TIF, TIF1 γ ; S4, Smad4.

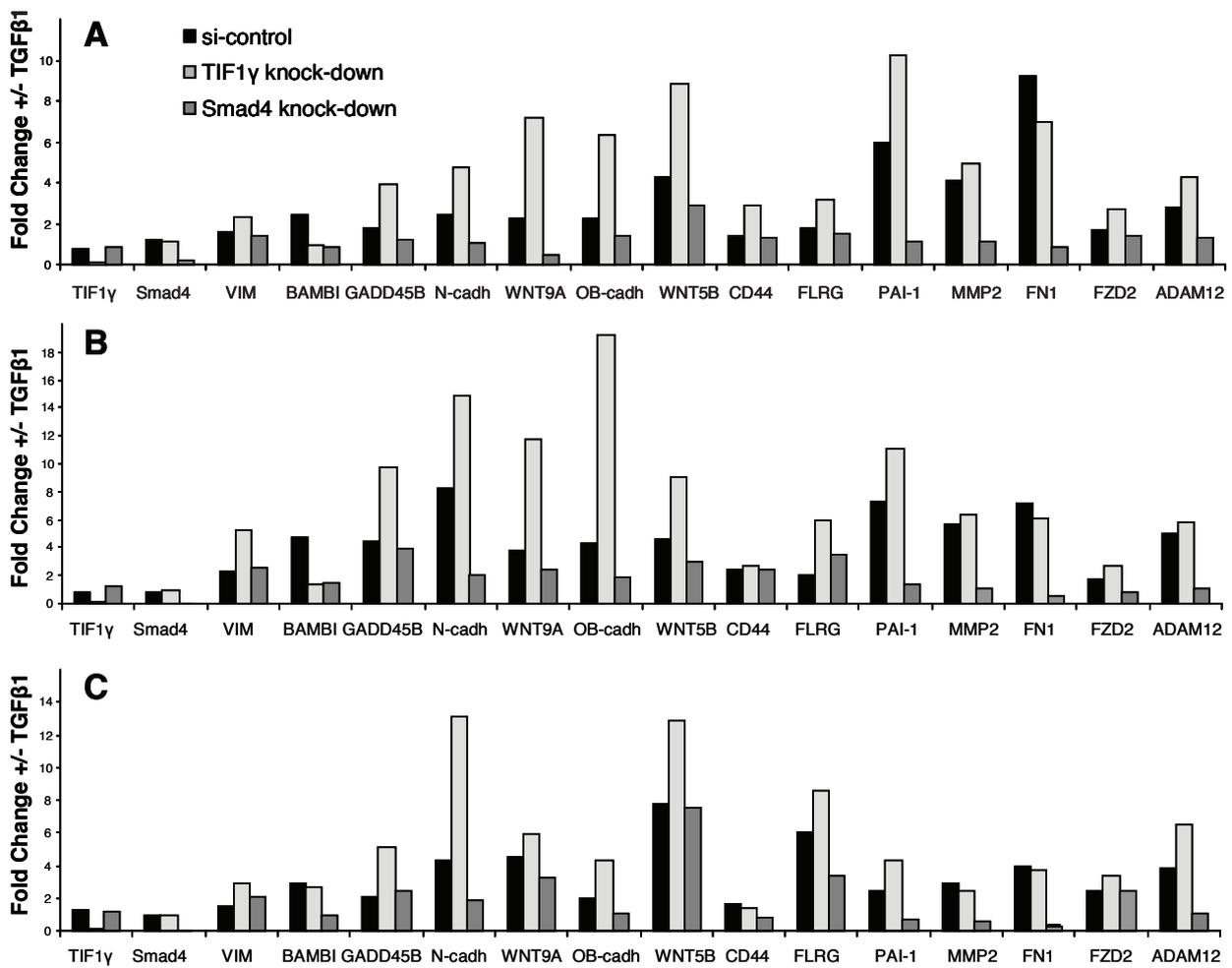


Fig S2: Validation of microarray results. (A) Results from microarray experiments. (B) The two independent RNA extractions performed for microarray experiments were used to quantify the expression of 16 selected genes by qRT-PCR. (C) Two additional and independent RNA extractions from HMEC-TR cells were used to quantify the expression of selected genes. All values were normalized to the amount of HPRT mRNA and expressed relative to the value obtained in control TGF β 1-untreated cells. For B and C, the data shown correspond to one of two independent experiments performed in triplicate, with comparable results. VIM, Vimentin; cadh, cadherin. ctrl, control; TIF, TIF1 γ ; S4, Smad4.

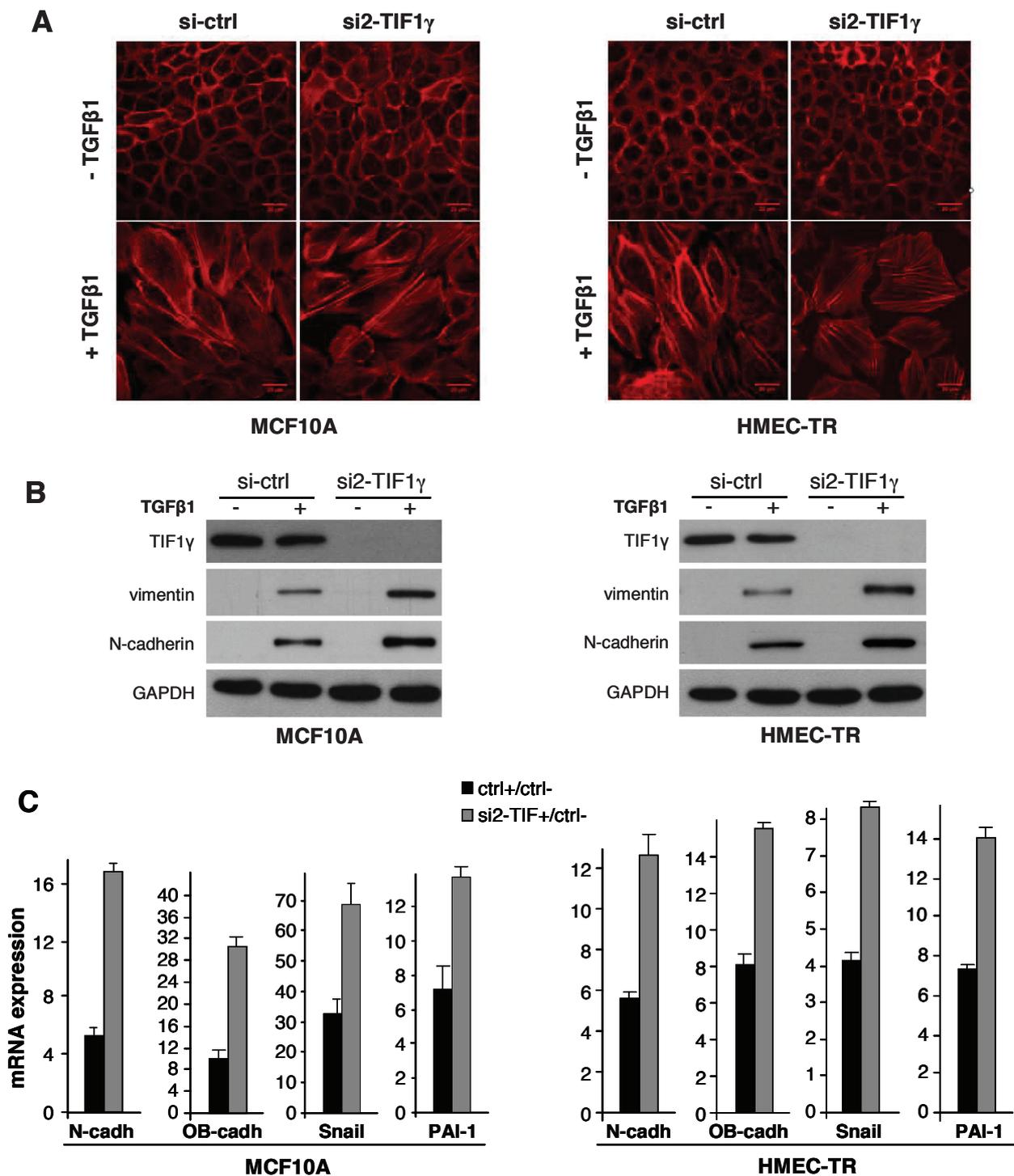


Fig S3: Inactivation of TIF1 γ expression enhances TGF β 1-induced EMT. MCF10A and HMEC-TR cells transfected with control siRNA (ctrl) or siRNA#2 targeting human TIF1 γ were treated with TGF β for 96h. (A) Immunofluorescence confocal acquisitions showing actin subcellular localization detected by phalloidin. Bars = 20 μ m. (C) Endogenous TIF1 γ , Vimentin and N-cadherin levels were determined by immunoblotting. GAPDH served as a loading control. (D) MCF10A and HMEC-TR cells transfected with control siRNA (ctrl) or siRNA#2 targeting human TIF1 γ were treated with TGF β for 9h. Expression of N-Cadherin (N-cadh), OB-Cadherin (OB-cadh), Snail and PAI-1 was determined by quantitative RT-PCR. Values were normalized to the amount of HPRT mRNA and expressed relative to the value obtained in TGF β 1-untreated controls. Error bars represent s.d. The experiment shown is representative of at least two separate experiments performed in triplicate.

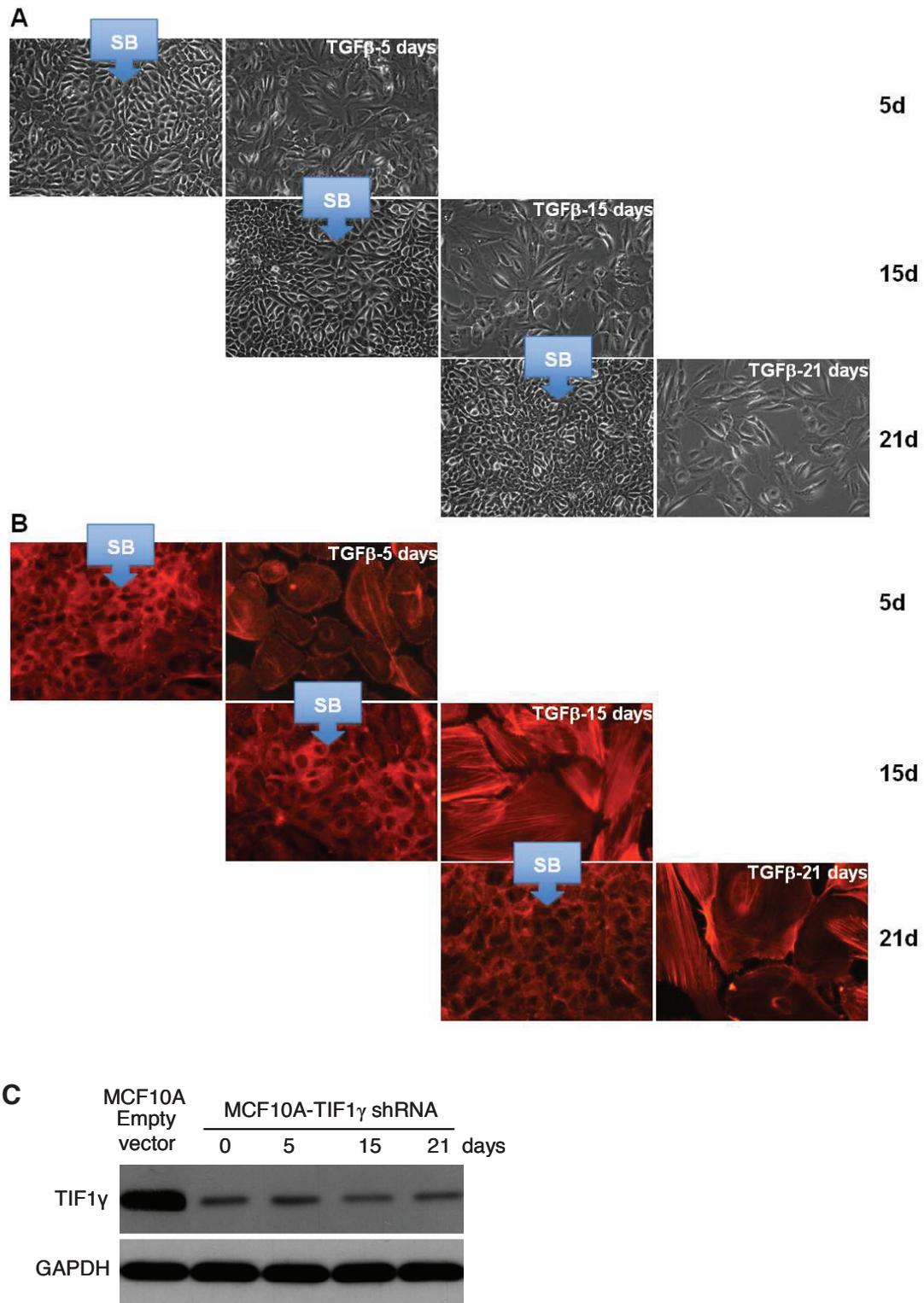


Fig. S4: MCF10A cells stably infected with sh(TIF1 γ) retrovirus (Open Biosystems) were exposed to TGF β 1 during 21 days. Cells gradually reverted back to epithelial cells resembling parental MCF10A cells after TGF β 1 removal and adjunction of T β RI kinase inhibitor (SB-431542). (A) Phase contrast images (x10) and (B) immunofluorescence acquisitions showing actin subcellular localization detected by phalloidin (x40). SB, SB-431542; d, days. (C) TIF1 γ levels were determined by immunoblotting in parental MCF10A cells and in MCF10A cells stably infected with sh(TIF1 γ) retrovirus. GAPDH served as a loading control.

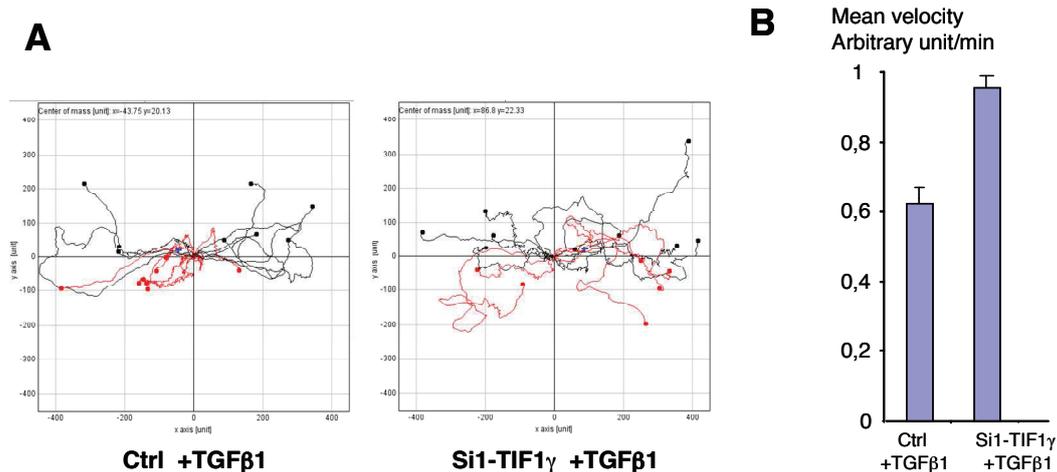


Fig S5: Inactivation of TIF1 γ increases TGF β 1-induced cell motility. MCF10A cells were grown to confluence with or without addition of TGF β 1. Medium was aspirated and a gel filter tip was drawn carefully through the monolayer to create a wound between cells. Cells were then washed with PBS and fresh medium was added, with or without TGF β 1. The healing process was observed by timelapse video microscopy. The migration patterns of individual cells were determined by timelapse on duplicates. In cells inactivated or not for TIF1 γ and treated with TGF β , the migration path of 8 cells from the wound edge was tracked with the Manual Tracking plug-in developed by F. Cordelières (Orsay, France). The traces were reported on a diagram (A). (B) The mean velocity was calculated on the 16 tracks with the Chemotaxis Tool from Ibidi (G. Trapp). Error bars represent s.d.

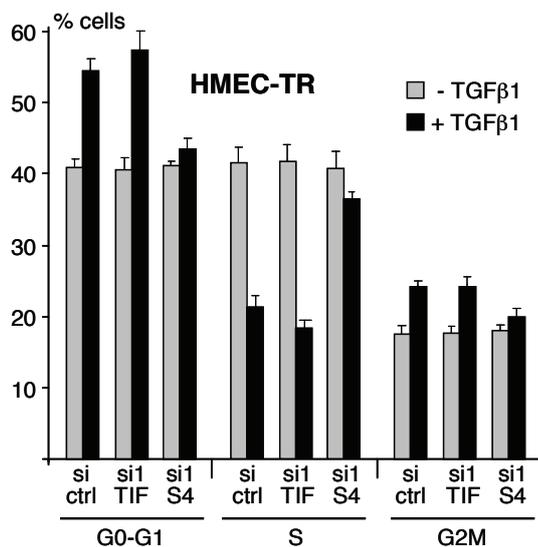


Fig S6: Inactivation of TIF1 γ expression had no effect on cell cycle distribution. Cell cycle distribution of TIF1 γ or Smad4-inactivated cells cultured or not with TGF β 1 for 96h. Harvested cells were fixed in 75% ethanol at 4°C, then treated with RNase III and stained with propidium iodide. Cell cycle distribution was analyzed using a FACS Canto II (Becton Dickinson).

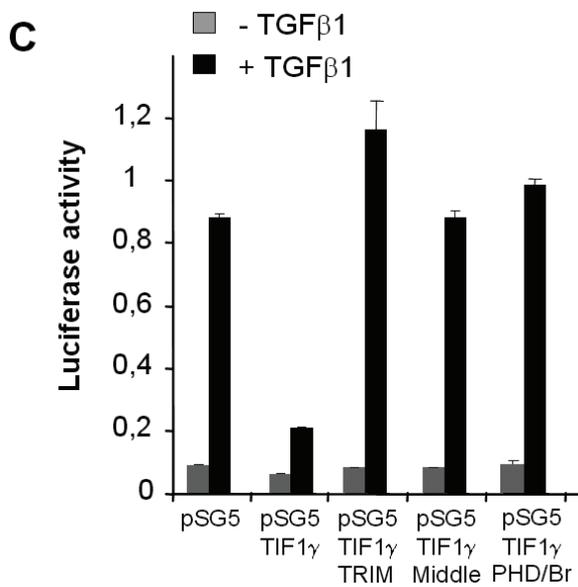
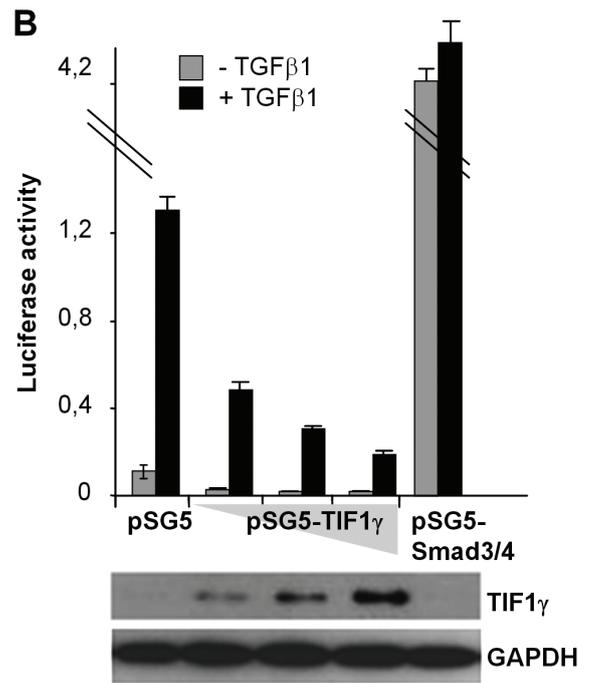
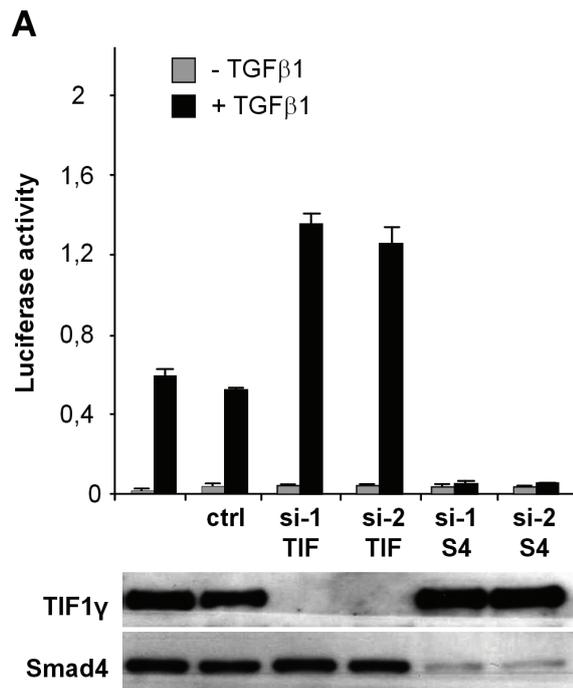


Fig S7: TIF1 γ inhibits TGF β 1 signaling. HMEC-TR were cotransfected with the pGL3(CAGA)-Luc reporter vector (known to be driven by the activated Smad complex) together with the pRL-CMV internal control vector and si-RNA (A) or the expression vectors indicated (B,C). Twenty-four hours before harvesting, transfected cells were either stimulated by TGF β 1 or left unstimulated, then luciferase activity was determined. The relative luciferase activity is given as the mean \pm s.d. of one experiment performed in triplicate, representative of three experiments. Expression levels of TIF1 γ , Smad4 and GAPDH proteins are shown. ctrl, control; TIF, TIF1 γ ; S4, Smad4. Isolated TIF1 γ domains (TRIM, nt 1-1368; Middle, nt 1369-2664; PHD/Br, nt 2665-

3390) were cloned in pSG5-flag expression vector. As previously shown (Dupont *et al.*, 2005; 2009), inactivation of TIF1 γ enhanced the TGF β 1-transcriptional response of the artificial (CAGA)₉-MLP-Luc reporter (A). In addition, TIF1 γ was found to inhibit the transcriptional activity of the reporter construct in a dose-dependent manner (B). Isolated domains of TIF1 γ (TRIM, middle or PHD/Br) are void of biological effect on luciferase reporter construct (C).

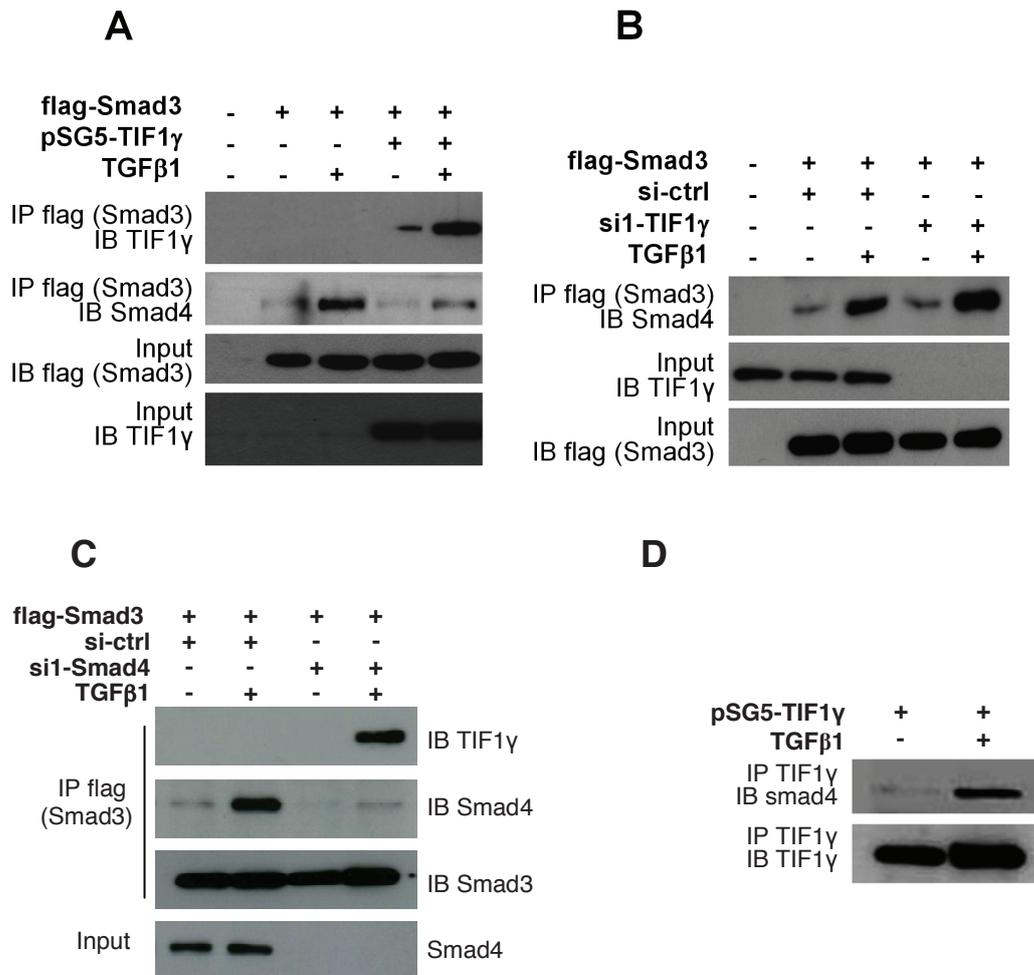


Fig S8: TIF1 γ inhibits Smad3/4 complexes. HMEC-TR cells were transfected with the indicated vectors, control siRNA (ctrl) or siRNA targeting human TIF1 γ mRNA. 48h post-transfection, the cells were treated or not with TGF β 1 for 2h. Lysates were immunoprecipitated (IP) and immunoblotted (IB) as indicated. Protein expression was monitored by immunoblot analysis of total cell extracts (Input). As previously shown (He *et al.*, 2006), over-expression of TIF1 γ in HMEC-TR cells decreased Smad3/Smad4 interaction (A) whereas TIF1 γ down-regulation favored the formation of Smad3/Smad4 complex (B). In cells overexpressing TIF1 γ , TIF1 γ could be coimmunoprecipitated with Smad3, this interaction being enhanced by TGF β 1 treatment (A). In cells inactivated for Smad4, the Smad3/TIF1 γ complex was more abundant (C). TIF1 γ has been shown to interact with Smad4 and to act as a RING-finger ubiquitin ligase for Smad4, regulating Smad4 localization (Dupont *et al.*, 2005; 2009). We found that Smad4 could be coimmunoprecipitated with TIF1 γ in HMEC-TR cells, this interaction being enhanced by TGF β 1 treatment (D).

Table S1: SITD, SDTD and SDTI groups of TGFβ1-dependent genes were identified based on the indicated combination of 3 cut off values shown in the table. FC, Fold Change.

	ctrl+/ctrl-	si-Smad4+/ctrl+	si-TIF1γ+/ctrl+
Smad4 Independent and TIF1γ Dependant (SITD)	FC>1.3 and FC<0.77	0.66<FC<1.5	FC>1.5 and FC<0.66
Smad4 Dependent and TIF1γ Dependent (SDTD)	FC>1.3 and FC<0.77	FC>1.5 and FC<0.66	FC>1.5 and FC<0.66
Smad4 Dependent and TIF1γ Independent (SDTI)	FC>1.3 and FC<0.77	FC>1.5 and FC<0.66	0.66<FC<1.5

Table S2: Three complete lists are shown in the excel file:
SDTI: Smad4-dependent and TIF1γ-independent probes
SDTD: Smad4-dependent and TIF1γ-dependent probes
SITD: Smad4-independent and TIF1γ-dependent probes

Table S3: TGF β 1 target genes regulated by TIF1 γ and potentially involved in EMT process. Genes showing an opposite response to Smad4 or TIF1 γ down-regulation are presented in bold. * Target genes for which quantitative RT-PCR was performed. S4, Smad4; TIF, TIF1 γ

Gene symbol	Gene name	ctrl+/ctrl-	si-S4+/ctrl-	si-TIF+/ctrl-
Cell adhesion/ cell-surface proteins				
ADAM12 *	a disintegrin and metalloproteinase domain 12 (meltrin alpha)	2.83	1.31	4.25
CDH11 *	cadherin 11, type 2, OB-cadherin (osteoblast)	2.25	1.42	6.29
CDH2 *	cadherin 2, type 1, N-cadherin (neuronal)	2.38	1.05	4.76
CELSR2	cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 2	1.38	0.86	0.81
CLDN14	claudin 14	3.38	1.45	1.39
CLDN4	claudin 4	3.15	0.89	1.43
CLU	clusterin	2.03	1.56	1.24
CNTNAP3	cell recognition molecule CASPR3	1.58	1.44	0.90
DSG3	desmoglein 3 (pemphigus vulgaris antigen)	1.52	0.83	0.54
EPPK1	epiplakin 1	1.81	0.61	0.71
JPH1	junctionophilin 1	0.41	0.76	0.27
MLLT4	mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila)	1.44	0.88	0.92
OCLN	occludin	1.60	0.95	0.80
PDGFC	platelet derived growth factor C	1.45	1.22	2.36
PKP1	plakophilin 1 (ectodermal dysplasia/skin fragility syndrome)	2.13	1.16	3.66
PODXL	podocalyxin-like	2.73	0.43	1.65
PVRL4	poliovirus receptor-related 4	1.95	1.00	1.21
SELL	selectin L (lymphocyte adhesion molecule 1)	1.63	1.1	1.04
STYK1	protein kinase STYK1	1.47	1.1	0.60
HNT	neurotrimin	2.65	0.52	0.68
KAL1	Kallmann syndrome 1 sequence	2.13	0.91	1.20
CD58	CD58 antigen, (lymphocyte function-associated antigen 3)	3.92	1.90	1.77
TSPAN-2	tetraspan 2	3.64	0.85	2.33
Matrix extra cellular proteins				
COL1A1	collagen, type I, alpha 1	6.54	0.19	0.41
COL5A1	collagen, type V, alpha 1	5.59	1.60	9.40
COL5A2	collagen, type V, alpha 2	2.29	0.64	1.10
ECM1	extracellular matrix protein 1	1.80	0.36	0.60
MMP10	matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2)	4.44	0.15	0.48
MMP28	matrix metalloproteinase 28	1.49	0.48	0.60
SERPINB1	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B, member 1	1.59	0.39	0.43
SERPINB13	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B, member 13	1.63	0.38	0.21
SERPINB5	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B, member 5	1.72	0.84	1.04
SERPINE1 *	plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1)	5.95	1.14	10.26
SPP1	secreted phosphoprotein 1 (osteopontin, bone sialoprotein I)	1.69	0.35	0.45
TIMP3	tissue inhibitor of metalloproteinase 3	1.58	0.62	0.52
TNC	tenascin C (hexabrachion)	1.79	0.51	0.56
Cytoskeleton				
FLNC	filamin C, gamma (actin binding protein 280)	1.80	1.48	1.17
KRT16	keratin 16	2.13	0.4	0.61
KRT9	keratin 9 (epidermolytic palmoplantar keratoderma)	1.43	0.78	0.94
KRTHA4	keratin, hair, acidic, 4 (intermediate filament)	5.78	2.28	12.02
MYLIP	myosin regulatory light chain interacting protein	0.67	0.64	0.42
MYLK	myosin, light polypeptide kinase	1.38	1.24	0.76
MYO10	myosin X	1.59	1.62	2.77
MYO5B	myosin VB	1.42	0.69	0.61
NEXN	nexilin (F actin binding protein)	0.73	0.6	0.34
NRAP	nebulin-related anchoring protein	1.75	1.43	1.10
TPM1	tropomyosin 1 (alpha)	4.55	1.18	2.0
Microtubule/Microtubule associated protein/Spindle				
BPAG1	bullous pemphigoid antigen 1, 230/240kDa	0.58	0.33	0.16
EML1	echinoderm microtubule associated protein like 1	1.83	0.80	2.75
KIF11	kinesin family member 11	0.56	0.55	0.33

MICAL2	NIH_MGC_69 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:3886131	1.58	1.78	2.78
MID1	midline 1 (Opitz/BBB syndrome)	1.45	1.13	0.64
SSX2IP	synovial sarcoma. X breakpoint 2 interacting protein	0.69	0.58	0.32
TPX2	TPX2. microtubule-associated protein homolog (Xenopus)	0.70	0.83	0.43
TTL	tubulin tyrosine ligase	0.71	2.0	1.34
GTPase signaling/Ras signaling				
ARF1	ADP-ribosylation factor 1	1.36	1.72	0.89
ARHGAP19	Rho GTPase activating protein 19	0.69	0.8	0.34
ARHGEF10	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 10	1.90	1.37	0.87
ARHGEF2	rho/rac guanine nucleotide exchange factor (GEF) 2	0.63	0.46	1.45
CD14	CD14 antigen	0.62	0.54	0.31
MLPH	melanophilin	2.07	2.85	9.46
MTSS1	metastasis suppressor 1	1.58	1.37	2.95
PAK2	p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 2	1.57	0.52	0.31
PIK3CD	phosphoinositide-3-kinase. catalytic. delta polypeptide	2.48	1.35	4.01
PSCD2	pleckstrin homology. Sec7 and coiled-coil domains 2	1.43	1.39	2.47
RAB40C	RAB40C. member RAS oncogene family	1.93	1.37	2.25
RAB7	RAB7. member RAS oncogene family	1.84	1.75	2.12
RASA1	RAS p21 protein activator (GTPase activating protein) 1	1.53	0.81	0.99
RASA4	DNA directed RNA polymerase II polypeptide J-related gene	1.78	0.83	0.77
RHPN2	rhophilin. Rho GTPase binding protein 2	1.48	0.96	0.64
RICS	Rho GTPase-activating protein	1.36	0.72	0.61
SEC14L1	SEC14-like 1 (S. cerevisiae)	1.62	2.26	3.74
WASF3	WAS protein family. member 3	0.50	2.01	1.54
Hyaluronan/CD44 signaling				
ASB6	ankyrin repeat and SOCS box-containing 6	0.74	1.40	1.25
CALML3	calmodulin-like 3	1.79	1.43	0.85
CD44 *	CD44 antigen	1.44	1.34	2.89
FANK1	fibronectin type 3 and ankyrin repeat domains 1	2.27	0.66	0.82
HAS3	hyaluronan synthase 3	0.56	0.52	0.12
HMMR	hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM)	0.53	1.09	0.79
Integrin signaling				
AKAP9	A kinase (PRKA) anchor protein (yotiao) 9	2.32	1.25	1.27
ILK	integrin-linked kinase	1.39	1.39	2.26
ITGA4	integrin. alpha 4	0.55	1.18	0.35
ITGA5	integrin. alpha 5 (fibronectin receptor. alpha polypeptide)	1.93	1.37	3.71
ITGB3	integrin. beta 3 (platelet glycoprotein IIIa. antigen CD61)	8.26	1.26	3.89
ITGB8	integrin. beta 8	1.46	1.06	0.72
WNT Beta catenin signaling				
FZD2 *	frizzled homolog 2 (Drosophila)	1.63	1.35	2.66
INVS	inversin	0.61	0.74	0.40
SIAH1	seven in absentia homolog 1 (Drosophila)	1.59	1.45	0.70
SIP	Siah-interacting protein	0.63	1.45	1.14
TCF7L1	transcription factor 7-like 1 (T-cell specific. HMG-box)	1.56	0.79	0.51
WNT5A	wingless-type MMTV integration site family. member 5A	2.44	1.44	3.90
WNT5B *	wingless-type MMTV integration site family. member 5B	4.29	2.87	8.87
WNT9A *	wingless-type MMTV integration site family. member 9A	2.23	0.44	7.17
Cell Differentiation				
EDG4	endothelial differentiation. 4	0.57	1.24	2.05
SOCS2	suppressor of cytokine signaling 2	1.39	0.82	1.53
SPRR1B	small proline-rich protein 1B (cornifin)	1.50	0.40	0.24

Table S4: Functional classification of TGF β dependent genes whose expression was modified by TIF1 γ knock-down

Functional annotation	Number of genes	percent
EMT	96	13.56
Regulation of transcription	63	8.9
Cell proliferation	61	8.61
Metabolism	61	8.61
Apoptosis	24	3.39
Other functions	118	16.66
Unknown functions	285	40.25

Table S5: Genes exhibiting antagonistic responses to Smad4 and TIF1 γ down-regulation.
* Target genes for which quantitative RT-PCR was performed.

Gene symbol	Description	ctrl+/ctrl-	Si-Smad4+/ctrl-	Si-TIF1 γ +/ctrl-
Cytoskeleton/Cell Junction/Cell-Matrix Proteins				
ADAM12 *	a disintegrin and metalloproteinase domain 12 (meltrin alpha)	2.83	1.31	4.25
CDH11 *	cadherin 11. type 2. OB-cadherin (osteoblast)	2.25	1.42	6.29
CDH2 *	cadherin 2. type 1. N-cadherin (neuronal)	2.38	1.05	4.76
COL5A1	collagen, type V, alpha 1	5.59	1.60	9.40
EML1	echinoderm microtubule associated protein like 1	1.83	0.80	2.75
JPH1	junctophilin 1	0.41	0.76	0.27
KRTHA4	keratin. hair. acidic. 4	5.78	2.28	12.02
PIK3CD	phosphoinositide-3-kinase. catalytic. delta polypeptide	2.48	1.35	4.01
PKP1	plakophilin 1 (ectodermal dysplasia/skin fragility syndrome)	2.13	1.16	3.66
SERPINE1*	plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1)	5.95	1.14	10.26
WNT9A*	wingless-type MMTV integration site family. member 9A	2.23	0.44	7.17
WNT5A	wingless-type MMTV integration site family. member 5A	2.44	1.44	3.90
Metabolism				
GLDC	glycine dehydrogenase (decarboxylating; glycine decarboxylase)	0.52	0.85	0.26
GLUL	Homo sapiens glutamine synthetase pseudogene. complete sequence.	3.70	1.54	5.63
LOX	lysyl oxidase	1.86	1.03	3.55
NOX5	NADPH oxidase. EF hand calcium-binding domain 5	2.75	1.54	7.31
P4HA3	prolyl 4-hydroxylase alpha III	8.70	2.01	15.59
SLC27A2	solute carrier family 27 (fatty acid transporter). member 2	0.52	0.92	0.25
TGM 2	transglutaminase 2	3.18	1.15	5.55
Cell Proliferation				
GADD45B *	growth arrest and DNA-damage-inducible. beta	2.70	1.49	4.51
Unknown Function				
BC041029	MRNA; cDNA DKFZp686O13152	0.55	1.20	0.30
AW300131	Transcribed sequences (AW300131)	1.73	1.01	2.97
AW139053	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2718337 3'	0.61	0.35	1.31
AW338214	Clone IMAGE:5275753. mRNA	0.50	0.81	0.32
ANKRD22	Hypothetical protein MGC22805	0.54	0.85	0.19
BJ-TSA-9	Hypothetical protein MGC14128	1.65	0.89	2.65
C5orf13	Chromosome 5 open reading frame 13	1.80	1.07	3.39
FLJ23657	Hypothetical protein FLJ23657	10.82	2.25	18.51
FLJ36031	Hypothetical protein FLJ36031	1.47	0.83	2.52
FLJ90166	Hypothetical protein FLJ90166	1.68	0.77	7.80
KCTD11	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2426829 3'	1.83	0.92	2.95
LOC93109	Hypothetical protein BC007772	1.69	1.09	2.73
MGC22679	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:3854163 5'	0.40	0.88	0.24
SDPR	serum deprivation response (phosphatidylserine binding protein)	0.59	1.10	0.37
TGM2	AL031651	4.33	1.15	9.05
Other functions				
PROC	protein C (inactivator of coagulation factors Va and VIIIa)	2.87	1.19	5.93
OPN3	opsin 3 (encephalopsin. panopsin)	2.24	1.03	3.38

Table S6: Genes involved in cell cycle and found in SDTI group. * Target genes for which quantitative RT-PCR was performed.

Gene symbol	Description	ctrl+/ctrl-	si-Smad4+/ctrl-	si-TIF1 γ +/ctrl-
ASK	activator of S phase kinase	0.59	0.98	0.6
AURKB	aurora kinase B	0.57	0.93	0.82
BRRN1	barren homolog (Drosophila)	0.57	0.96	0.59
CCND2	cyclin D2	0.73	1.2	0.49
CCNF	cyclin F	0.56	0.98	0.79
CCNG2	cyclin G2	1.74	0.66	1.42
CDC25A	cell division cycle 25A	0.58	0.92	0.58
CDC45L	CDC45 cell division cycle 45-like (S. cerevisiae)	0.7	1.21	0.69
CDC6	CDC6 cell division cycle 6 homolog (S. cerevisiae)	0.63	0.95	0.53
CDK4	cyclin-dependent kinase 4	0.66	1.16	0.92
CDKN1A *	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21. Cip1)	1.7	0.67	1.87
CDKN2B	cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15. inhibits CDK4)	4.27	1.07	3.22
CHC1	chromosome condensation 1	0.61	1.28	0.77
DRIM	down-regulated in metastasis	0.51	1.12	0.67
DUSP22	dual specificity phosphatase 22	1.64	0.98	1.93
E2F5	E2F transcription factor 5. p130-binding	0.38	0.8	0.49
FANCD2	Fanconi anemia. complementation group D2	0.68	1.03	0.62
FGF2	fibroblast growth factor 2 (basic)	0.67	1.38	0.79
FGF5	fibroblast growth factor 5	2.03	0.96	2.48
GADD45A	growth arrest and DNA-damage-inducible. alpha	2.04	1.21	1.65
IFRD2	interferon-related developmental regulator 2	0.59	1.05	0.77
IGFBP7	insulin-like growth factor binding protein 7	1.89	0.89	2.15
IL15	interleukin 15	2	1	1.87
INHBA	inhibin. beta A (activin A. activin AB alpha polypeptide)	2.17	1.3	1.86
INSIG1	insulin induced gene 1	2.23	0.86	2.15
ISG20	interferon stimulated gene 20kDa	1.59	0.79	1.1
KRAS2	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog	2.3	1.25	2.47
LRP1	low density lipoprotein-related protein 1	2.14	1.16	2.56
LRP5	low density lipoprotein receptor-related protein 5	0.61	1.04	0.84
MN1	meningioma (disrupted in balanced translocation) 1	1.98	0.66	2.71
MXD4	MAX dimerization protein 4	2.15	1	1.68
MYC *	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	0.6	0.95	0.55
NAP1L1	nucleosome assembly protein 1-like 1	0.65	1.02	0.68
NME1	non-metastatic cells 1	0.72	1.24	0.97
NOLC1	nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1	0.57	1.07	0.52
PA2G4	proliferation-associated 2G4. 38kDa	0.6	0.92	0.8
PDGFA	platelet-derived growth factor alpha polypeptide	2.36	1.14	1.82
PLK1	polo-like kinase 1 (Drosophila)	0.5	1.05	0.61
POLD4	polymerase (DNA-directed). delta 4	2.26	0.72	2.58
PPP6C	protein phosphatase 6. catalytic subunit	0.6	1.44	0.78
PRIM1	nascent-polypeptide-associated complex alpha polypeptide	0.55	1.08	0.56
SASH1	SAM and SH3 domain containing 1	0.71	1.07	0.72
SKP2	S-phase kinase-associated protein 2 (p45)	0.42	0.67	0.48
SMAD3	MAD. mothers against decapentaplegic homolog 3	0.55	0.83	0.73
SPOCK	sparc/osteonectin (testican)	2.35	0.8	2.5
TCF8	transcription factor 8 (represses interleukin 2 expression)	2.62	0.93	2.24
TIEG	TGFB inducible early growth response	1.61	0.83	1.31
TNFSF13	tumor necrosis factor (ligand) superfamily. member 13	2.05	0.98	1.88
TNFSF9	tumor necrosis factor (ligand) superfamily. member 9	1.72	0.93	1.6

Table S7: si-RNAs used in the study.

Name	Sequence
si-TIF1 γ #1	UUU CGC AGC ACA CAA GAG AUC UCC UCC GGA GGA GAU CUC UUG UGC UGC GAA A
si-TIF1 γ #2	UUU CAC GGU GGA UAA AUC CAU UGG U ACCAAUGGA UUU AUC CAC CGU GAA A
si-Smad4#1	GCA AUU GAA AGU UUG GUA A U UAC CAA ACU UUC AAU UGC
si-Smad4#2	CCC ACA ACC UUU AGA CUG A U CAG UCU AAA GGU UGU GGG
Control	1027280 (Qiagen)

siRNA used for TIF1 γ are stealth siRNA from Life technologies-Invitrogen

Table S8: Quantitative RT-PCR primers used in the study

Gene	Sequence
TIF1 γ	PPH16274A (SA Biosciences)
Smad4	5'GTG GAA TAG CTC CAG CTA TC3' 5'CGG CAT GGT ATG AAG TAC TCC3'
Vimentin	5'CCA AAC TTT TCC TCC CTG AAC C3' 5'GTG ATG CTG AGA AGT TTC GTT GA3'
BAMBI	PPH01947E (SA Biosciences)
GADD45B	5'GTG GAT TAT AAT TGC AAC ATG ACG3' 5'TTG GCC GAC TCG TCA CCC3'
CDH2 (N-Cadherin)	5'GTG CAT GAA GGA CAG CCT CT3' 5'ATG CCA TCT TCA TCC ACC TT3'
WNT9A	5'CGC CTA CTT CGG GCT GAC3' 5'CTG CTT CCG CTC CAG CTT3'
CDH11 (OB-Cadherin)	5'CCC TGA AAT CAT TCA CAA TCC3' 5'AGT CCT GCT TCT GCC GAC T3'
WNT5B	5'GGA CAA CGC ATC TGT CTT TGG3' 5'GCT GAT GGC GTT GAC CAC3'
CD44	5'CTG GGG ACT CTG CCT CGT3' 5'GAG AGA TGC TGT AGC GAC CA3'
FLRG	5'CAC TCG TCG CGG TAG GTG3' 5'TTC CCT GCA AAG ATT CGT G3'
PAI-I	PPH00215E (SA Biosciences)
MMP2	PPH00151B (SA Biosciences)
FN1	PPH00143B (SA Biosciences)
FZD2	PPH02470A (SA Biosciences)
ADAM12	PPH07260E (SA Biosciences)
CDKN1A	5'GAC ACC ACT GGA GGG TGA CT3' 5'CCA CAT GGT CTT CCT CTG CT3'
c MYC	5'CTG CTG GGA GGA GAC ATG GT3' 5'TCC TGG ATG ATG ATG TTT TTG ATG3'
SNAIL	5'GTC GCA GGA CTC TAA TCC AGA3' ATC TCC GGA GGT GGG ATG
ZEB1	5'ATC CTG GGG CCT GAA GCT CAG G3' 5'TGG TGT GCC CTG CCT CTG GT3'
HMGA2	5'CCC AGG GGA AGA CCC AAA GGC3' 5'GTT GGC GCC CCC TAG TCC TCT3'
HPRT	5'TGA CCT TGA TTT ATT TTG CAT ACC3' 5'CGA GCA AGA CGT TCA GTC CT3'

Article 2 : Dynamic regulation of TGF β signaling by TIF1 γ : a computational approach

Résumé

La voie de signalisation canonique du TGF β fait intervenir les protéines Smad qui agissent en tant que facteurs de transcription pour conduire le signal apporté par le ligand jusque dans le noyau. Récemment, le nouvel acteur, TIF1 γ , a été impliqué dans la régulation de cette voie de signalisation. Aucun modèle mathématique n'avait jusque là pris en compte l'intervention de TIF1 γ dans la voie de signalisation du TGF β , c'est pourquoi en collaboration avec l'équipe du Dr Nathalie Théret (Rennes), nous avons modélisé de manière intégrative la régulation dynamique de la voie du TGF β par TIF1 γ . À partir des modèles préexistants de recyclage des récepteurs et de localisation nucléo-cytoplasmique des Smads, nous avons développé un modèle prenant en compte l'hypothèse de la mono-ubiquitination de Smad4 par TIF1 γ , puis un modèle prenant en compte l'interaction entre TIF1 γ et les R-Smads. Cela nous a permis de mettre en place un modèle général en intégrant le régulateur TIF1 γ et la déubiquitineuse FAM/USP9x. Des études de simulation ont permis de valider ce modèle intégratif, rendant compte à la fois de la gradation de la régulation de la voie du TGF β par TIF1 γ , et de l'importance des cycles d'ubiquitination et de déubiquitination de Smad4 respectivement par TIF1 γ et FAM/USP9x.

Nous avons ensuite validé expérimentalement le modèle intégratif en analysant l'induction de marqueurs de la TEM en réponse au TGF β . Pour cela, nous avons réalisé des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine afin d'observer le recrutement des complexes transcriptionnels de la voie du TGF β au niveau du promoteur du gène cible PAI-1 étudié précédemment. L'association des protéines Smad2/3, Smad4 et TIF1 γ sur le promoteur entre 30 et 90 minutes de stimulation au TGF β est en accord avec la nécessité d'un complexe ternaire pour expliquer la dynamique de la régulation de la voie du TGF β . Afin d'étudier l'importance des ratios des protéines TIF1 γ et Smad4, nous avons utilisé une stratégie de siARN pour varier les niveaux respectifs des deux protéines et analysé la réponse transcriptionnelle au TGF β en quantifiant le niveau d'expression de marqueurs de la TEM (N-Cadhérine et OB-Cadhérine). Nos résultats montrent que TIF1 γ est un régulateur essentiel des réponses au TGF β dépendante de Smad4 au cours de la TEM et que la dynamique de cette

régulation détermine les ratios de TIF1 γ et de Smad4 et par conséquent la nature de la réponse transcriptionnelle au signal TGF β .

Enfin, de manière intéressante, le modèle intégratif permet de comparer les réponses au TGF β en variant la dose ou le temps d'exposition au ligand. Nos résultats suggèrent que la réponse de la cellule au TGF β dépend des ratios des protéines TIF1 γ et Smad4 et du temps d'exposition au TGF β , en accord avec la grande variété de réponses au TGF β en fonction de la disponibilité du ligand.

En conclusion, le modèle intégratif présenté dans cet article montre que les ratios des protéines TIF1 γ et Smad4 permettent de réguler la voie de signalisation du TGF β , en particulier au cours des réponses à de courtes stimulation au TGF β , comme au cours de la TEM induite par le TGF β .

Article

DYNAMIC REGULATION OF TGF β SIGNALING
BY TIF1 γ : A COMPUTATIONAL APPROACH

ANDRIEUX Geoffroy, FATTET Laurent, LE BORGNE Michel, RIMOKH Ruth & THERET
Nathalie,

PLoS ONE,

2012

Dynamic Regulation of Tgf- β Signaling by Tif1 γ : A Computational Approach

Geoffroy Andrieux^{1,2}, Laurent Fattet³, Michel Le Borgne², Ruth Rimokh³, Nathalie Th  ret^{1*}

1 Inserm U1085-IRSET, Université de Rennes 1, Rennes, France, **2** Université de Rennes 1, IRISA, Rennes, France, **3** Inserm U1052/CNRS 5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Lyon, France

Abstract

TIF1 γ (Transcriptional Intermediary Factor 1 γ) has been implicated in Smad-dependent signaling by Transforming Growth Factor beta (TGF- β). Paradoxically, TIF1 γ functions both as a transcriptional repressor or as an alternative transcription factor that promotes TGF- β signaling. Using ordinary differential-equation models, we have investigated the effect of TIF1 γ on the dynamics of TGF- β signaling. An integrative model that includes the formation of transient TIF1 γ -Smad2-Smad4 ternary complexes is the only one that can account for TGF- β signaling compatible with the different observations reported for TIF1 γ . In addition, our model predicts that varying TIF1 γ /Smad4 ratios play a critical role in the modulation of the transcriptional signal induced by TGF- β , especially for short stimulation times that mediate higher threshold responses. Chromatin immunoprecipitation analyses and quantification of the expression of TGF- β target genes as a function TIF1 γ /Smad4 ratios fully validate this hypothesis. Our integrative model, which successfully unifies the seemingly opposite roles of TIF1 γ , also reveals how changing TIF1 γ /Smad4 ratios affect the cellular response to stimulation by TGF- β , accounting for a highly graded determination of cell fate.

Citation: Andrieux G, Fattet L, Le Borgne M, Rimokh R, Théret N (2012) Dynamic Regulation of Tgf- β Signaling by Tif1 γ : A Computational Approach. PLoS ONE 7(3): e33761. doi:10.1371/journal.pone.0033761

Editor: Dipankar Chatterji, Indian Institute of Science, India

Received: December 13, 2011; **Accepted:** February 21, 2012; **Published:** March 23, 2012

Copyright:    2012 Andrieux et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (www.inserm.fr) and the Ligue Nationale Contre le Cancer (<http://www.ligue-cancer.net>). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: nathalie.theret@univ-rennes1.fr

Introduction

Complex signaling by transforming growth factor β (TGF- β) forms a pivotal network that plays an essential role in tissue homeostasis and morphogenesis. At the same time, up-regulation and activity of TGF- β has been linked to various diseases, including fibrosis and cancer, by promoting cell proliferation and invasion and the epithelial-mesenchymal transition [1]. TGF- β signaling occurs through association with a heteromeric complex of two types of transmembrane serine/threonine kinases, the type I (T β RI) and type II (T β RII) receptors. TGF- β binding to T β RII induces recruitment and phosphorylation of T β RI, which in turn transmits the signal through phosphorylation of the receptor-bound R-Smad transcription factors, Smad2 or Smad3. Once phosphorylated, the R-Smads hetero-dimerize with their common partner, Smad4. The resulting complexes then migrate to the nucleus, where they regulate the transcription of TGF- β -target genes in conjunction with other transcription factors [2].

Nuclear Transcriptional Intermediary Factor 1 γ , TIF1 γ (also known as tripartite motif protein TRIM33), is a member of the transcriptional intermediary factor 1 family [3] and was recently identified as a new partner of the Smad-dependent TGF- β signaling pathway. A screen for molecules involved in the specification of the embryonic endoderm first revealed TIF1 γ as a Smad4-binding protein and as a negative regulator of TGF- β signaling [4]. TIF1 γ mono-ubiquitinates Smad4, inducing its nuclear export to the cytoplasm, where the FAM/UPS9x deubiquitinating enzyme was recently shown to allow Smad4 recycling [5]. The role of TIF1 γ as a repressor was also reported in

the control of Smad activity during embryogenesis [6]. In contrast, TIF1 γ was identified as a protein partner for receptor-activated Smad2/3, resulting in an alternative positive regulatory Smad4-independent TGF- β signaling pathway [7].

Whether TIF1 γ down-regulates or promotes alternative TGF- β signaling may be linked to the cellular context. TIF1 γ is a ubiquitous protein and its mRNA has been detected in all tissues [8]. Its loss of expression has been shown to favor Kras^{G12D}-dependent precancerous pancreatic lesions [9], induce cell-autonomous myeloproliferative disorders in mice [10] and potentiate TIF1 α -induced murine hepatocellular carcinoma [11], thereby supporting a protective role of TIF1 γ in cancer. Consistent with this view, a decrease in TIF1 γ expression in human pancreatic cancer and human chronic myelomonocytic leukemia has been reported [9,11] and TIF1 γ silencing in human mammary epithelial cell lines was shown to lead to a strong epithelial-mesenchymal transition mediated by TGF- β 1 [12]. In contrast, a pro-tumorigenesis role for TIF1 γ has been suggested by the observation that its expression prevents Smad4-mediated growth inhibition in response to TGF- β [4]. In line with the uncertain role of TGF- β in cancer, TIF1 γ may differentially affect TGF- β signaling according to the cellular context by acting either as tumor suppressor or promoter.

Several mathematical models have been developed to predict the dynamic behavior of TGF- β signaling. In particular, initial differential models that couple signaling with receptor trafficking have significantly improved our understanding of the plasticity of the TGF- β signaling pathway [13]. Models focusing on Smad phosphorylation [14], Smad nucleocytoplasmic shuttling [15,16]

and Smad oligodimerization [17] have also been developed to understand the dynamics and flexibility of Smad-dependent pathways, while integrative models have coupled receptor trafficking to Smad pathways [18–20]. As the latter models recapitulate the essential components of the canonical Smad-dependent TGF- β signaling pathway, they constitute useful tools to investigate the role of new regulatory components of TGF- β signaling.

We have used an integrative modeling approach to explore the impact of TIF1 γ on the outcome of TGF- β signaling. Taking advantage of mathematical models of receptor trafficking [13] and Smad shuttling [16], we have developed a new TGF- β signaling model that includes TIF1 γ and FAM/UPS9x. Our model, which is based on the transient formation of a ternary complex containing TIF1 γ , Smad4 and Smad2/3, successfully reconciles the different observations reported for TIF1 γ -Smad4 [4] and TIF1 γ -Smad2/3 [7] interactions. We show that TGF- β signaling is highly sensitive to the TIF1 γ /Smad4 ratio, suggesting a critical role for the FAM/UPS9x deubiquitinase. This model also predicts how varying TIF1 γ /Smad4 ratios can modulate the cellular response to transient and sustained TGF- β stimulation, accounting for a highly graded TGF- β response. We discuss how the seemingly opposite roles of TIF1 γ may be resolved by taking into account the dynamic balance of interactions involving Smad4 and Smad2/3.

Materials and Methods

Mathematical modeling

The model consists of a system of nonlinear, ordinary differential equations that merge the ODE models of receptor trafficking [13] and Smad shuttling [16]. Briefly, the receptors described in the Smad shuttling model were replaced by those of the receptor trafficking model using unit conversion in a cell volume of 2.27×10^{-12} L. Model building, parameters, system ordinary equations and description of the model in Systems Biology Markup Language (SBML) are detailed in Tables S1 and S2 and Model S1. Model simulations were implemented with the mathematical Scipy library of Python language programming and the Matplotlib Python 2D plotting library was used to visualize the simulation curves.

Cell culture and siRNA transfection

Human mammary epithelial (HMEC) cells infected with a retrovirus carrying hTERT and the oncogenic H-RasV12 (HMEC-TR) allele were provided by R. A. Weinberg [21] and cultured as previously described [12]. Cells were transfected with 5 nM siRNA and 0.5 μ l/ml lipofectamine RNAiMax (Invitrogen) and further cultured in the presence or absence of 10 ng/ml TGF- β 1 (Peprotech) for the indicated times.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP)

Assays were carried out on cells transfected with the PAI-1 p800-Luc construct, as previously described [12], using the kit from Upstate Biotechnology. Briefly, cell lysates were subjected to anti-Smad4 (SantaCruz) or anti-TIF1 γ (Bethyl) immunoprecipitation. Smad4- or TIF1 γ -precipitated genomic DNA was subjected to PCR. The 351-bp PAI-1 promoter region harboring the Smad-binding elements was amplified with primers 5'-AGCCAGACAAGGTTGTTG-3' and 5'-GACCACCTCCAGGAAAG-3'. An unrelated genomic DNA sequence (actin) was amplified with primers 5'-AGCCATGTACGTTGCTATCCAG-3' and 5'-CTTCTCCTTAATGTCCACGCACG-3'.

Relative quantification of mRNA by real-time PCR

Real-time quantitative PCR was performed using the qPCR™ Core Kit for Sybr™ Green I from Eurogentec and the ABI Prism 7700 thermocycler (Perkin-Elmer, Foster city, CA, USA). Primer pairs for target genes were: sense CDH11 (OB-Cadherin), 5'CCC TGA AAT CAT TCA CAA TCC3', antisense 5'AGT CCT GCT TCT GCC GAC T3'; CDH2 (N-Cadherin), sense: 5'GTG CAT GAA GGA CAG CCT CT3', antisense: 5'ATG CCA TCT TCA TCC ACC TT3'; HPRT, sense: 5'TGA CCT TGA TTT ATT TTG CAT ACC3', antisense: 5'CGA GCA AGA CGT TCA GTC CT3'.

Western blot analysis

Cell lysates were subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto PVDF membranes. The blots were incubated for 1 hr in Tris-buffered saline containing 0.1% Tween 20 and 5% non-fat dry milk and further incubated for 1 hr with specific primary antibodies (anti-Smad4, SantaCruz biotechnology; anti-TIF1 γ , Euromedex). The bound antibodies were visualized with horseradish peroxidase-conjugated antibodies using the ECL-Plus reagent (Roche).

Results and Discussion

Quantitative models for TIF1 γ -dependent TGF- β signaling

Merging receptor trafficking [13] and Smad cytonucleoplasmic shuttling [16] models through their common receptor-ligand complex in the endosome (LRe), we developed new models that integrate TIF1 γ . Kinetic parameters were estimated according to the experimental data from [5] and [7] and are detailed in Table S1. We first constructed two separate models, each taking into account the different hypotheses regarding Smad/TIF1 γ interactions. The first model is based on the TIF1 γ -dependent negative regulation associated with the ubiquitination of Smad4 ([4,5]; Figure 1A). In this model, TIF1 γ interacts preferentially with Smad4 within phosphorylated Smad2-Smad4 complexes in response to TGF- β , leading to a rapid dissociation of complexes and formation of ubiquitinated Smad4 (Smad4ub) that is exported from the nucleus. Similar to the transient interaction of the phosphatase (PPase) with phosphorylated Smad2 [15,16], the formation of TIF1 γ -Smad complexes was neglected because of fast reaction rates. In the cytoplasm, ubiquitinated Smad4 undergoes deubiquitination by FAM/UPS9x (FAM), thereby recycling Smad4 for TGF- β signaling (Figure 1A). We set the same kinetic parameters for association between TIF1 γ and phosphorylated Smad2-Smad4 complexes in the nucleus (pS2S4n) and association between phosphorylated Smad2 and Smad4. Ubiquitination/deubiquitination and phosphorylation/dephosphorylation kinetics were considered to be similar, as previously described [5]. Export of ubiquitinated Smad4 from the nucleus to the cytoplasm was assumed to be 2-fold higher than entry of Smad4 in the nucleus, based on the observation suggesting that ubiquitinated Smad4 is less efficiently retained in the nucleus [4,5].

Our second model is based on results from He *et al.* [7], who proposed that TGF- β induces a competing interaction between TIF1 γ and phosphorylated Smad2, although an association of TIF1 γ with Smad4 was also detected in the nucleus (Figure 1B). In the absence of conclusive experimental data, we considered the kinetic parameters for association between TIF1 γ and either phosphorylated Smad2 or Smad4 in the nucleus to be similar to those for phosphorylated Smad2 with Smad4. To test this hypothesis, we analyzed the effect of a 2-fold decrease in k_{on}/k_{off}

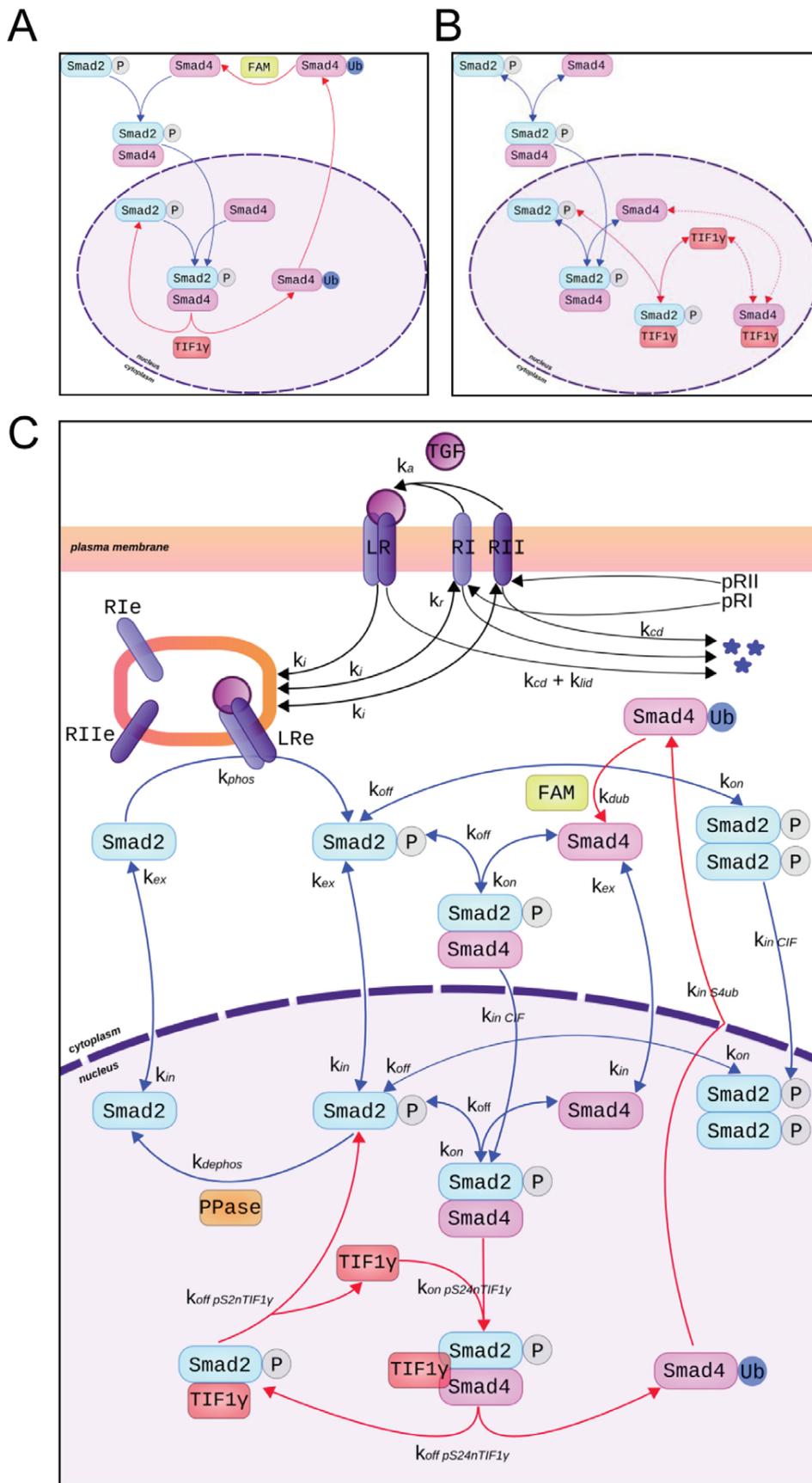


Figure 1. Schematic representation of the models. Detailed information on parameters and entities are given in Tables S1 and S2. A) Model hypothesis from [4]. B) Model hypothesis from [7]. C) Integrated model including TIF1 γ (red rectangle) and FAM (green rectangle). doi:10.1371/journal.pone.0033761.g001

for the association between TIF1 γ and Smad2 or Smad4, which did not modify the TGF- β response in simulation studies.

Finally, we integrated the TIF1 γ and FAM/UPS9x modulators into a unique model that merges all experimental observations (Figure 1C). Unlike the model depicted in Figure 1A, we considered TIF1 γ binding to Smad4 as part of a ternary complex, in which phosphorylated Smad2, Smad4 and TIF1 γ are associated in the nucleus (pS24nTIF1 γ). In this case, note that the interaction of TIF1 γ with Smad2 occurs within phosphorylated Smad2-TIF1 γ (pS2nTIF1 γ) complexes that are generated by dissociation of the ternary complexes in the nucleus. We set the same kinetic parameters for the formation/dissociation of the ternary pS24nTIF1 γ complexes and the formation/dissociation of the phosphorylated Smad2-Smad4 complexes.

Model analysis and simulation

We next performed computational experiments to investigate the dynamics of TGF- β signaling according to each model. TGF- β signaling was expressed as the amount of phosphorylated Smad2-Smad4 complexes in the nucleus (pS24n) because TGF- β target genes are regulated by these heterodimeric complexes. To explore the functional effect of TIF1 γ on the TGF- β transcriptional signal, simulation studies were performed using different concentrations of TIF1 γ varying from 0 to 50 nM, the latter corresponding to the initial concentration of Smad4 (Figure 2, Table S1). These prediction studies showed that each model was either too sensitive, with total inhibition of signaling at low concentrations of TIF1 γ according to the first model (Figure 2A), or too insensitive, with only a slight variation of signaling at higher TIF1 γ concentrations according to the second model (Figure 2B). Each predictive model hence yielded a significant mismatch with the experimental data derived from the other. The strict negative regulatory role of TIF1 γ proposed by Dupont *et al.* [4] is not compatible with the lack of sensitivity of the second model adapted from He *et al.* [7]. Similarly, He *et al.* observed a moderate TIF1 γ effect on TGF- β transcriptional activity that did not agree with the high sensitivity of the first model adapted from Dupont *et al.* In contrast, our integrative model that includes all observations yielded a graded effect of TIF1 γ on pS24n complex formation that is in agreement with the relative abundance of TIF1 γ -Smad complexes reported in both studies, leading to a graded regulation of TGF- β signaling (Figure 2C).

To further explore the robustness of our integrative model, we evaluated the sensitivity of TGF- β signaling to variations in kinetic parameters. As shown in Figure 3, varying the rate of formation (Figure 3A) or dissociation (Figure 3B) of complexes containing TIF1 γ and pS24n had little effect on TGF- β signaling. Similarly, varying the kinetic parameters for the dissociation of phosphorylated Smad2-TIF1 γ complexes (pS2nTIF1 γ) induced only few changes in the concentration of pS24n (Figure 3C). In contrast, TGF- β signaling was highly sensitive to the variation of k_{in} -Smad4ub (Figure 3D), suggesting that the export rate of ubiquitinated Smad4 is a critical component of the regulation of TGF- β transcriptional activity. In addition, the slight alteration in TGF- β signaling induced by changes in the deubiquitination rate of Smad4 (Figure 3E) disappeared with increasing concentrations of the FAM deubiquitinase (Figure 3F), suggesting that changes in FAM expression might be a sensitive marker to predict modulation of TGF- β signaling. Taken together, the results of our simulation studies reveal a new pivotal role of the Smad4 ubiquitination/

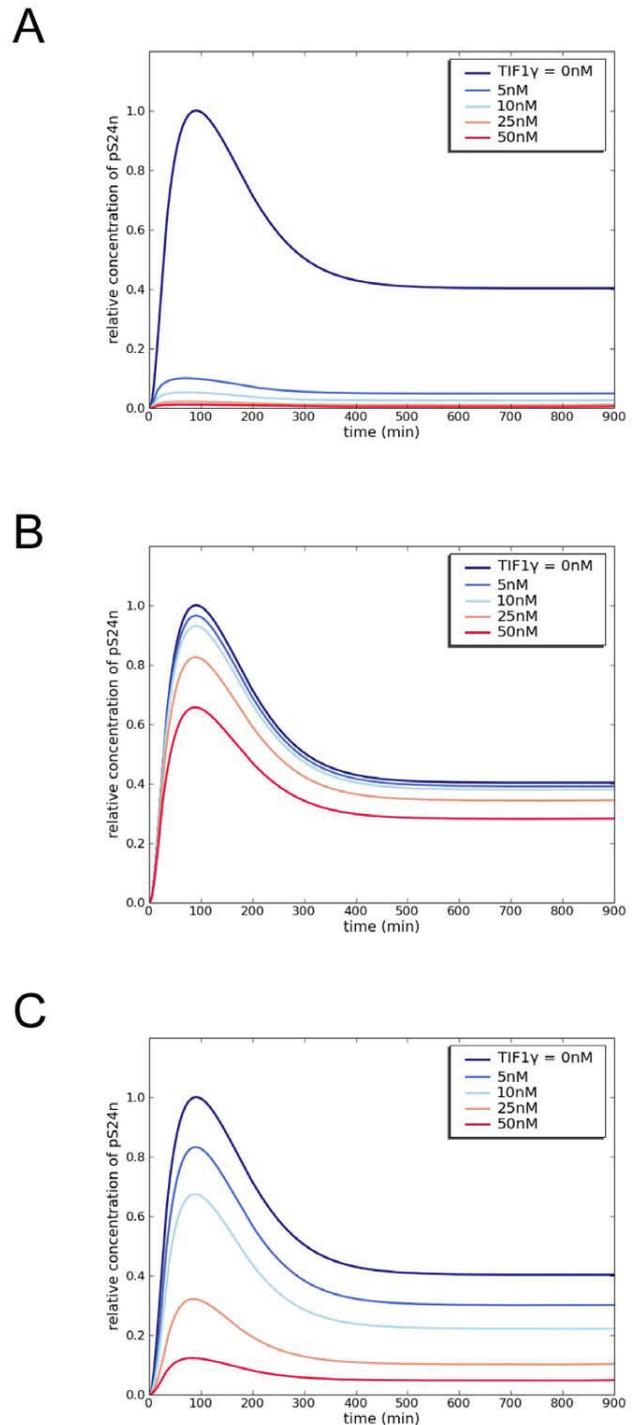


Figure 2. Effect of TIF1 γ on TGF- β signaling. Modeling analysis of the pS24n response to increasing TIF1 γ concentrations at a 10 nM TGF- β input. A) Model according to [4]; B) model according to [7] and C) integrated model. doi:10.1371/journal.pone.0033761.g002

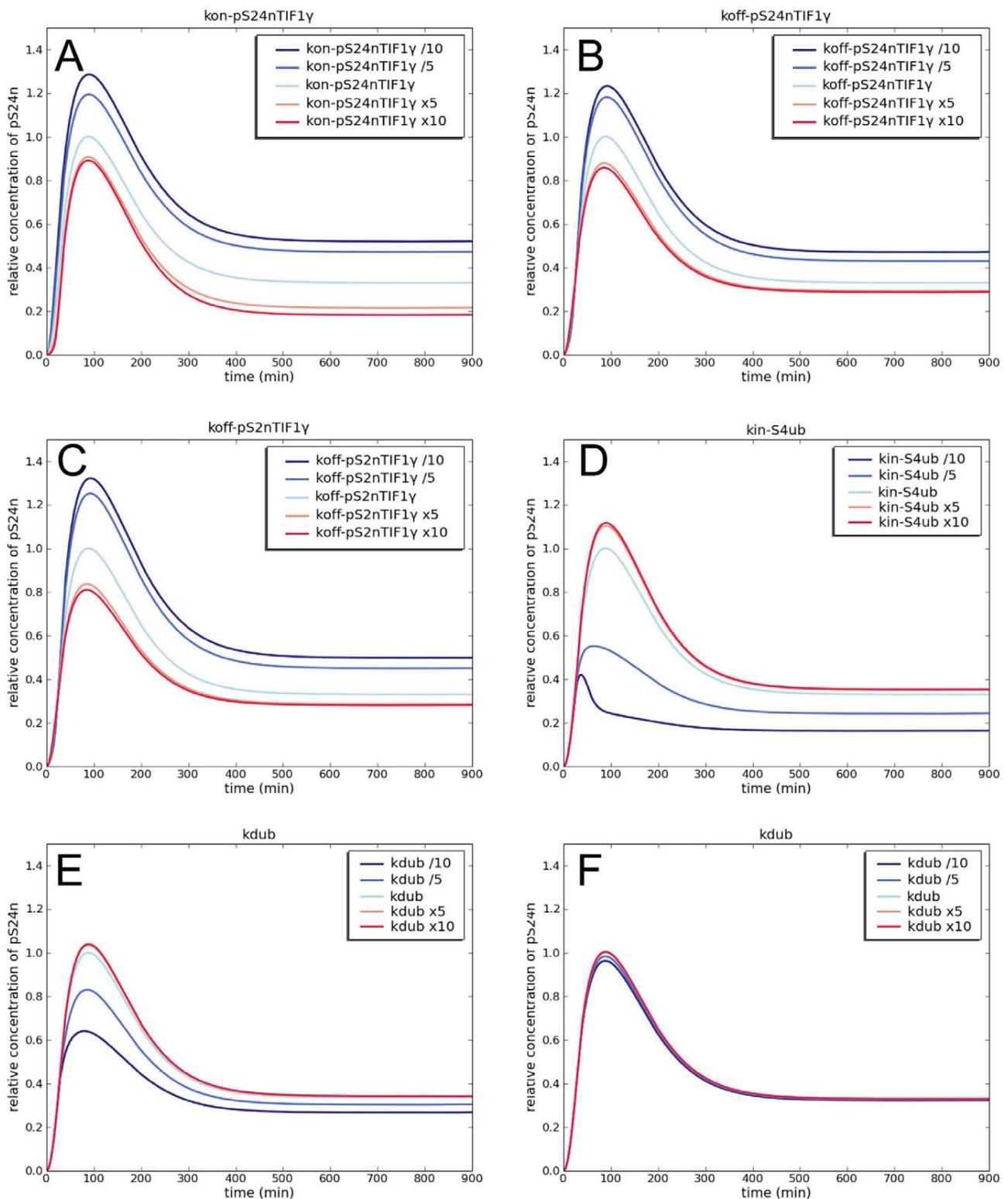


Figure 3. Parameter sensitivity analysis. Modeling analysis of pS24n response to variations of kinetic constants at a 10 nM TGF- β input. A) $k_{on-pS24nTIF1\gamma}$, binding of TIF1 γ to phosphorylated-Smad2/Smad4 complexes; B) $k_{off-pS24nTIF1\gamma}$, dissociation of phosphorylated-Smad2/Smad4/TIF1 γ complexes in the nucleus; C) $k_{off-pS2nTIF1\gamma}$, dissociation of phosphorylated Smad2-TIF1 γ complexes in the nucleus; D) $k_{in-S4ub}$, nuclear export of ubiquitinated Smad4 in the cytoplasm; E) and F) k_{dub} , deubiquitination of Smad4 according to relative FAM concentrations of 1 nM (E) and 10 nM (F). doi:10.1371/journal.pone.0033761.g003

deubiquitination cycle in the regulation of the dynamics of TGF- β signaling. Of note is the predicted critical regulatory role of FAM in TGF- β signaling through Smad4 recycling.

Experimental validation of the model

A key component of our model is based on the hypothesis that a transient ternary complex is formed, associating Smad4, TIF1 γ and Smad2. To investigate the reality of such an interaction, we performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays as previously described [12]. As shown in Figure 4, stimulation of cells with TGF- β induced the recruitment of Smad proteins on the promoter sequence of PAI-1, a TGF- β target gene. In the absence of TGF- β stimulation, TIF1 γ showed a significant association with DNA while Smad2/3 was not detected. A faint Smad4 signal could be detected under these conditions. TGF- β stimulation led to the detection of a strong Smad2/3 ChIP signal. Between 30 and 90 min of TGF- β stimulation, the association of all three proteins with DNA appears consistent with the hypothesis that a ternary complex containing Smad4, Smad2/3 and TIF1 γ transiently forms. After 120 min, Smad4 dissociated from DNA whereas Smad2/3 and TIF1 γ remained present on the PAI-1 promoter. This observation is in agreement with our hypothesis that Smad2-TIF1 γ complexes are released from the ternary complexes. Importantly, Dupont *et al.* [4], using a double-immunoprecipitation approach for TIF1 γ and Smad4, previously reported formation of these ternary complexes. More recently TIF1 γ was shown to be present at the promoter region of PAI-1 gene in uninduced cells, whereas an increase in TIF1 γ association with the Smad-binding region of the promoter was also observed upon TGF- β stimulation [22].

We next devised an experimental approach that could be used to evaluate TGF- β transcriptional activity as a function of variable TIF1 γ /Smad4 ratios. Cells were transiently transfected with siRNAs to silence Smad4 or TIF1 γ expression and were further stimulated or not with TGF- β for the indicated times (Figure 5A).

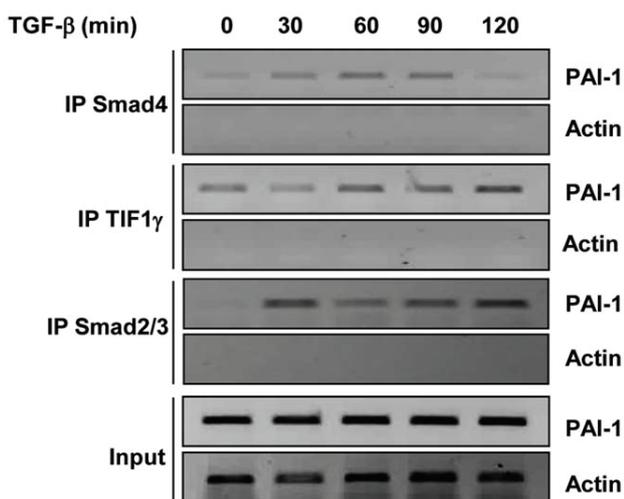


Figure 4. TIF1 γ , Smad2 and Smad4 bind to the PAI-1 promoter. ChIP assays were performed on HMEC cells treated with TGF- β for the indicated times. Cell lysates were subjected to anti-Smad4 (IP Smad4), or anti-TIF1 γ (IP TIF1 γ), or anti-Smad2/3 (IP Smad2/3) chromatin immunoprecipitation. PCR amplification of the endogenous PAI-1 promoter (733/484) was performed to detect protein bound DNA. Primers specific to actin were used as controls. doi:10.1371/journal.pone.0033761.g004

The expression of Smad4 and TIF1 γ was efficiently inhibited since no proteins were detected at day 3 post-transfection compared with cell transfected with non-targeted siRNAs (scr). The efficacy of RNA interference was confirmed at the mRNA level (Figure S1). This effect decreased with time according to siRNA availability and mRNA turnover, leading to the recovery of protein basal levels after several days (Figure 5A, upper panel). Note that silencing Smad4 and TIF1 γ affected the amounts of TIF1 γ and Smad4 proteins, respectively, detected at day 3. The time courses shown in Figure 5 finally allowed us to analyze cells containing variable amounts of endogenous Smad4 and TIF1 γ proteins. For each time point, cell extracts were used for western blot analyses and TIF1 γ /Smad ratios were evaluated by densitometric scanning of blots (Figure 5A, bottom panel). To perform this experimental verification, we quantified the mRNA levels of endogenous TGF- β target genes instead of using the over-expression of reporter genes to estimate transcriptional activities. We selected the CDH2 and CDH11 cadherin genes as they are up-regulated by TGF- β through Smad4- and TIF1 γ -dependent pathways in our cell model (Figure S2). Using the same cell extracts used for western blotting (Figure 5A), the mRNA levels of CDH2 and CDH11 were quantified and TGF- β transcriptional activity was evaluated as the ratio of mRNA levels observed in the presence or absence of TGF- β (Figure 5B). TGF- β -induced expression of CDH2 and CDH11 was correlated with the amount of Smad4 and TIF1 γ proteins. Compared to control cells (scr), low Smad4 expression (Day3) prevented TGF- β -dependent expression of CDH2 and CDH11 while the absence of TIF1 γ led to up-regulation of CDH2 and CDH11.

We then compared these experimental data with results predicted by our integrative model. As shown in Figure 5C, our observations could be fitted to the simulation curves of TGF- β transcriptional signaling, a validation reinforced by the use of physiological parameters. We conclude from these results that TIF1 γ is a new regulator that plays a pivotal role in the control of Smad4-dependent TGF- β transcriptional activity. These data also show that TIF1 γ /Smad4 ratios can determine TGF- β -dependent transcriptional activity. Accordingly, our model supports the hypothesis of fast binding of TIF1 γ to phosphorylated Smad2/Smad4 complexes and the release of both ubiquitinated Smad4 and phosphorylated Smad2-TIF1 γ complexes.

TGF- β dose- and time-dependent responses

The concentration of TGF- β in the cellular microenvironment is highly variable and its increased expression has been reported in numerous pathologies, including inflammation, fibrosis and cancer [23]. However the determination of TGF- β concentrations at the cellular level within tissues remains a difficult task since TGF- β is stocked as a latent form in the extracellular matrix [24]. In addition, its conversion from latent to biologically active forms involves numerous protease- and non protease-dependent mechanisms that differ according to cell type and the physiological context, leading to a complex non-linear delivery [25]. All previous mathematical models are based on biological data obtained from *in vitro* experiments using either TGF- β concentrations (in the nM range) or on/off signal inputs. However, Zi and al. [19] recently developed an integrative model that includes a ligand depletion parameter and demonstrated that cell-fate decision in response to TGF- β stimulation depends not only on its concentration but also on the time course of its delivery. Because we did not integrate ligand depletion in our model, response predictions were insensitive to TGF- β concentration except for concentrations as low as 0.1 nM (Figure 6A) and we routinely used concentrations of 10 nM as the TGF- β input.

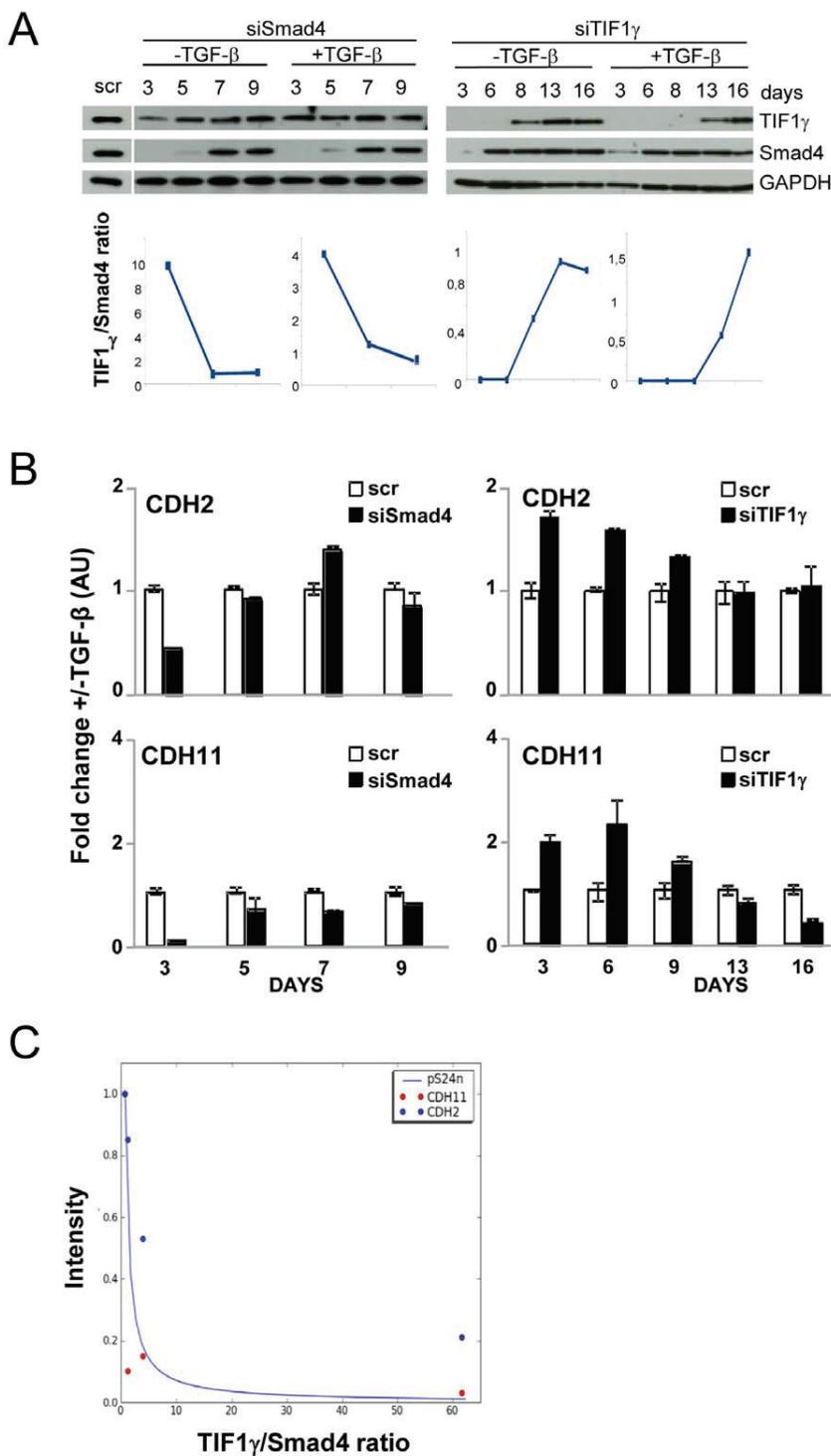


Figure 5. Expression of the CDH2 and CDH11 TGF- β target genes is sensitive to TIF1 γ /Smad4 ratios. HMEC cells were transfected with Smad4 (siSmad4) or TIF1 γ (siTIF1 γ) siRNAs and cultured in the presence (+) or absence (-) of TGF- β for the indicated times (days). Controls were cells transfected with non-targeted siRNA (scr). A) Smad4 and TIF1 γ protein levels were analyzed by immunoblotting (upper panels) and quantified by densitometric scanning (lower panels). B) TGF- β -induced fold changes in CDH2 and CDH11 expression were analyzed by RT-qPCR. All values were normalized to the amount of HPRT mRNA and expressed relative to the value obtained for TGF- β -untreated controls in arbitrary units (AU). Results are expressed as the mean \pm SD of 3 independent experiments. C) mRNA levels of CDH2 (red circles) and CDH11 (blue circles) were plotted against TIF1 γ /Smad4 ratios and were fitted to the predictive equation curve of p524n relative concentrations. doi:10.1371/journal.pone.0033761.g005

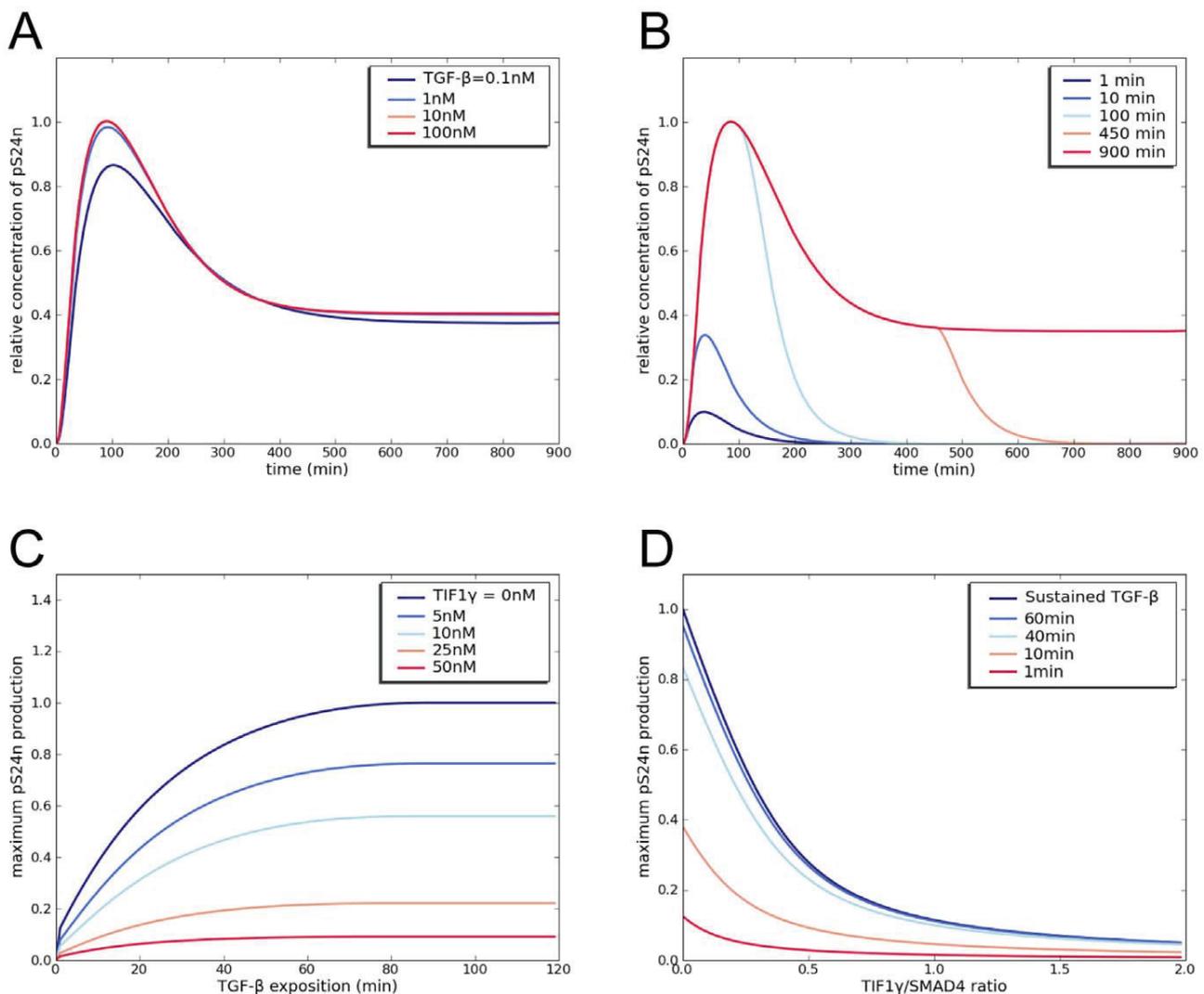


Figure 6. Concentration and time dependence of TGF- β signaling. A) and B) Modeling analysis of the pS24n response to increasing concentrations of TGF- β (A) and duration of stimulation with 10 nM TGF- β (B). C) and D) Modeling analysis of the maximum pS24n response as a function of TGF- β duration of exposure (C) or increasing TIF1 γ /Smad4 ratios (D). doi:10.1371/journal.pone.0033761.g006

When TGF- β depletion was included in our model, both graded short-term and switch-like long-term responses to TGF- β were conserved as reported by Zi *et al.* [19]. However, they were attenuated, suggesting that the presence of TIF1 γ does not affect the signal shape, but only the amplitude of TGF- β signaling (Figure S3).

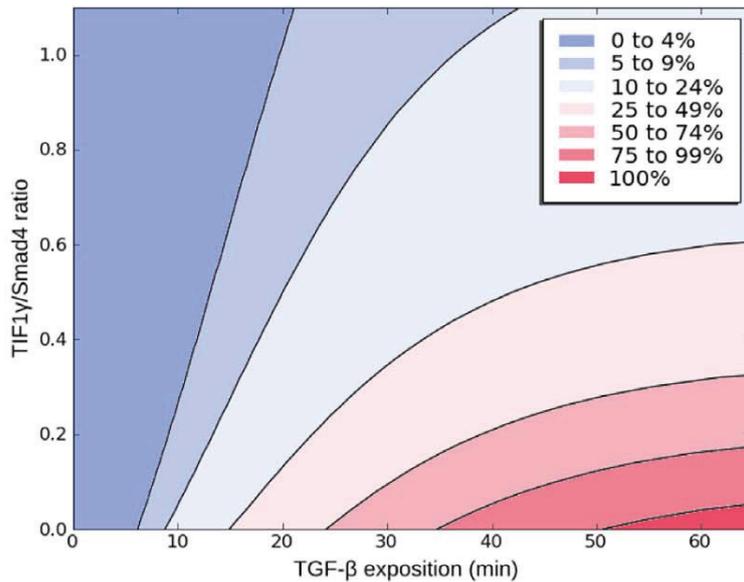
In contrast, we observed that, in our model, the length of stimulation modified the cell response. This was particularly true for short times (Figure 6B), maximum pS24n complex formation being highly dependent on TIF1 γ concentration (Figure 6C and 6D). This indicates that the magnitude of the cellular response to TGF- β depends on both TIF1 γ /Smad4 ratios and time-dependent stimulation, predicting a broad range of responses according to TGF- β cellular content and availability in the microenvironment (Figure 7A). Note that the alternative pS2TIF1 γ transcription complexes proposed by He *et al.* [7] displayed an opposite profile that required high TIF1 γ /Smad4 ratios and longer stimulation times to be fully active (Figure 7B).

In agreement with Zi *et al.* [19], our model showed that periodic short pulses of ligand stimulation yielded an outcome similar to that produced by sustained ligand stimulation, whereas an increase in the duration between pulses prevented a continuous response. These observations support the memory concept of ligand-receptor complex (LCR) activity (Figure S4A). When TIF1 γ was added, the shape of the response was similar, albeit attenuated, suggesting that, in our model, TIF1 γ does not affect LCR recycling (Figure S4B).

Conclusions

Taking into account the seemingly contradictory observations of Smad4-TIF1 γ and Smad2/3-TIF1 γ interactions, we propose an integrative model based on the formation of Smad2-Smad4-TIF1 γ ternary complexes. Validation of our hypotheses by *a posteriori* biological experiments provides strong support for our model, which shows that the TIF1 γ /Smad4 ratio serves as a regulator of TGF- β signaling that may affect determination of cell

A



B

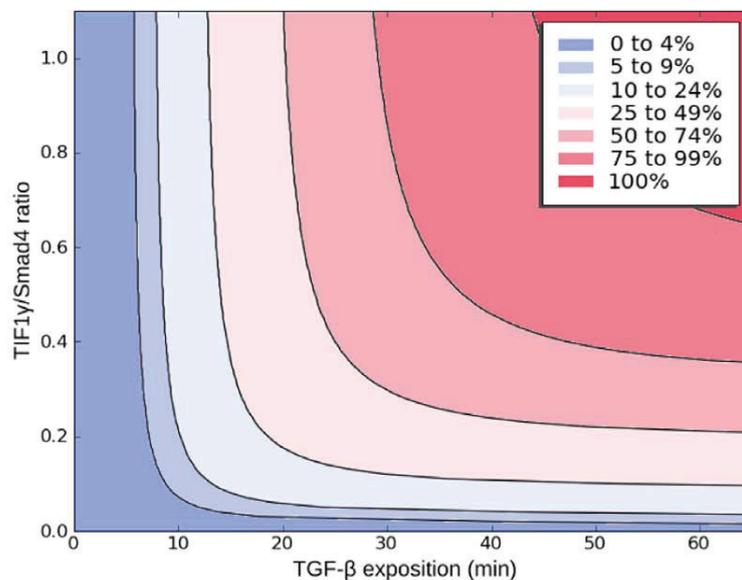


Figure 7. TGF- β time-dependent pS24n and pS2nTIF1 γ response profiles as a function of TIF1 γ /Smad4 ratios. Results are expressed as percentage of the maximum production of pS24n (A) or pS2nTIF1 γ (B). doi:10.1371/journal.pone.0033761.g007

fate. We demonstrate that the response to TGF- β signaling is highly sensitive to TIF1 γ /Smad4 ratios, especially for short stimulation times that mediate higher threshold responses. A critical role for the TIF1 γ /Smad4 ratio in the regulation of TGF- β signaling is supported by the antagonistic role of TIF1 γ and Smad4 in the epithelio-mesenchymal cell transition [12], embryonic patterning and trophoblast stem-cell differentiation

[6], suggesting that TIF1 γ acts as a negative regulator of higher TGF- β threshold responses.

Our results emphasize the significance of TIF1 γ in orchestrating the pleiotropic effects of TGF- β signaling according to the cellular context. Its sensitivity to Smad4 levels and stimulation times suggests that TIF1 γ helps define a broad landscape of TGF- β responses. We note that Agricola *et al.* recently proposed a new

model for TIF1 γ ubiquitin ligase activity that requires binding to histones [22], thus implicating chromatin dynamics in the control of Smad localization at the promoter of TGF- β target genes. According to these results, epigenetic events contribute to the transcriptional regulation of TGF- β target genes *via* acetylation and methylation processes [26–28]. In order to understand the complexity of TGF- β -dependent gene regulation and to predict cellular responses, we believe that future models will need to integrate not only the Smad canonical pathway but also Smad-independent pathways and epigenetic events. Because of the lack of quantitative data, such an ambitious goal will require the development of different modeling-based approaches that utilize discrete models [29,30].

Supporting Information

Figure S1 Effects of Smad4 and TIF1 γ knockdown on gene expression. HMEC cells were transfected with Smad4 (siSmad4) or TIF1 γ (siTIF1 γ) siRNAs and cultured in the presence (+) or absence (–) of TGF- β for the indicated times (days). Controls were cells transfected with non-targeted siRNA (Scr). Smad4 and TIF1 γ gene expression was quantified by RT-qPCR. All values were normalized to the amount of HPRT mRNA and expressed in arbitrary units (AU). Results are expressed as the mean+SD of 3 independent experiments. (PDF)

Figure S2 Expression of the CDH2 and CDH11 is induced by TGF- β through TIF1 γ - and Smad4-dependent pathways. HMEC cells were transfected with Smad4 (siSmad4) or TIF1 γ siRNAs (si TIF1 γ) and cultured in the presence (+) or absence (–) of TGF- β for 2 days. Control cells transfected with non-targeted siRNA (Scr). CH2 and CDH11 gene expression was quantified by RT-qPCR. Results are normalized to the amount of mRNA in untreated cells and expressed as the mean+SD of 3 independent experiments. (PDF)

Figure S3 TIF1 γ does not affect short-term and switch-like long-term responses to TGF- β . TGF- β depletion was

added to the integrated model and modeling analysis of the pS24n response was performed using either increasing concentrations of TGF- β (A) or increasing concentrations of TIF1 γ in the presence of 1 nM (B) 5 nM (C) and 10 nM TGF- β (D). (PDF)

Figure S4 TIF1 γ does not modify the pS24n response to a pulsed exposure to TGF- β . Model prediction of the pS24n response in the absence (A) or presence (B) of 10 nM TIF1 γ to sustained TGF- β (10 nM) stimulation (blue curve), continuous short pulses at 30-minute intervals (green curve) or 3-hour intervals (red curve), as previously described experimentally (Zi et al 2011). We use 10 nM TIF1 γ as an average dose of tested concentrations. Concentrations up to 50 nM TIF1 γ did not modify the behavior of the signal but only reduced the signal range. (PDF)

Table S1 System parameters. (PDF)

Table S2 System of ordinary differential equations. Equations in black are from Vilar *et al.*, 2006 and Schmierer *et al.*, 2008; equations in red are estimated from biological experiments from Dupont *et al.*, 2005, 09 and He *et al.*, 2006. (PDF)

Model S1 Description of the model in Systems Biology Markup Language (SBML). (PDF)

Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. Emmanuel Käs (LBME, CNRS/ Université Paul Sabatier) for help in writing this manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: GA MLB RR NT. Performed the experiments: GA LF. Analyzed the data: GA MLB RR NT. Contributed reagents/materials/analysis tools: MLB RR NT. Wrote the paper: NT.

References

1. Massague J (2008) TGFbeta in Cancer. *Cell* 134: 215–230.
2. Schmierer B, Hill CS (2007) TGFbeta-Smad signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 970–982.
3. Venturini L, You J, Stadler M, Galien R, Lallemand V, et al. (1999) TIF1gamma, a novel member of the transcriptional intermediary factor 1 family. *Oncogene* 18: 1209–1217.
4. Dupont S, Zacchigna L, Cordenonsi M, Soligo S, Adorno M, et al. (2005) Germ-layer specification and control of cell growth by Ectoderm, a Smad4 ubiquitin ligase. *Cell* 121: 87–99.
5. Dupont S, Mamidi A, Cordenonsi M, Montagner M, Zacchigna L, et al. (2009) FAM/USP9x, a deubiquitinating enzyme essential for TGFbeta signaling, controls Smad4 monoubiquitination. *Cell* 136: 123–135.
6. Morsut L, Yan KP, Enzo E, Aragona M, Soligo SM, et al. (2010) Negative control of Smad activity by ectoderm/TIF1gamma patterns the mammalian embryo. *Development* 137: 2571–2578.
7. He W, Dorn DC, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Moore MA, et al. (2006) Hematopoiesis controlled by distinct TIF1gamma and Smad4 branches of the TGFbeta pathway. *Cell* 125: 929–941.
8. Yan KP, Dolle P, Mark M, Lerouge T, Wendling O, et al. (2004) Molecular cloning, genomic structure, and expression analysis of the mouse transcriptional intermediary factor 1 gamma gene. *Gene* 334: 3–13.
9. Vincent DF, Yan KP, Treilleux I, Gay F, Arfi V, et al. (2009) Inactivation of TIF1gamma cooperates with Kras to induce cystic tumors of the pancreas. *PLoS Genet* 5: e1000575.
10. Aucagne R, Droin N, Paggetti J, Lagrange B, Largeot A, et al. (2011) Transcription intermediary factor 1gamma is a tumor suppressor in mouse and human chronic myelomonocytic leukemia. *J Clin Invest* 121: 2361–2370.
11. Herquel B, Ouarahni K, Khetchoumian K, Ignat M, Teletin M, et al. (2011) Transcription cofactors TRIM24, TRIM28, and TRIM33 associate to form regulatory complexes that suppress murine hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 8212–8217.
12. Hesling C, Fattet L, Teyre G, Jury D, Gonzalo P, et al. (2011) Antagonistic regulation of EMT by TIF1gamma and Smad4 in mammary epithelial cells. *EMBO Rep* 12: 665–672.
13. Vilar JM, Jansen R, Sander C (2006) Signal processing in the TGF-beta superfamily ligand-receptor network. *PLoS Comput Biol* 2: e3.
14. Clarke DC, Betterton MD, Liu X (2006) Systems theory of Smad signalling. *Syst Biol (Stevenage)* 153: 412–424.
15. Melke P, Jonsson H, Pardali E, ten Dijke P, Peterson C (2006) A rate equation approach to elucidate the kinetics and robustness of the TGF-beta pathway. *Biophys J* 91: 4368–4380.
16. Schmierer B, Tournier AL, Bates PA, Hill CS (2008) Mathematical modeling identifies Smad nucleocytoplasmic shuttling as a dynamic signal-interpreting system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 6608–6613.
17. Nakabayashi J, Sasaki A (2009) A mathematical model of the stoichiometric control of Smad complex formation in TGF-beta signal transduction pathway. *J Theor Biol* 259: 389–403.
18. Chung SW, Miles FL, Sikes RA, Cooper CR, Farach-Carson MC, et al. (2009) Quantitative modeling and analysis of the transforming growth factor beta signaling pathway. *Biophys J* 96: 1733–1750.
19. Zi Z, Feng Z, Chapnick DA, Dahl M, Deng D, et al. (2011) Quantitative analysis of transient and sustained transforming growth factor-beta signaling dynamics. *Mol Syst Biol* 7: 492.
20. Zi Z, Klipp E (2007) Constraint-based modeling and kinetic analysis of the Smad dependent TGF-beta signaling pathway. *PLoS One* 2: e936.
21. Elenbaas B, Spirio L, Koerner F, Fleming MD, Zimonjic DB, et al. (2001) Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. *Genes Dev* 15: 50–65.

22. Agricola E, Randall RA, Gaarenstroom T, Dupont S, Hill CS (2011) Recruitment of TIF1 γ to chromatin via its PHD finger-bromodomain activates its ubiquitin ligase and transcriptional repressor activities. *Mol Cell* 43: 85–96.
23. Bierie B, Moses HL (2006) Tumour microenvironment: TGF β : the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat Rev Cancer* 6: 506–520.
24. Hyytiäinen M, Penttinen C, Keski-Oja J (2004) Latent TGF- β binding proteins: extracellular matrix association and roles in TGF- β activation. *Crit Rev Clin Lab Sci* 41: 233–264.
25. Annes JP, Munger JS, Rifkin DB (2003) Making sense of latent TGF β activation. *J Cell Sci* 116: 217–224.
26. Bruna A, Darken RS, Rojo F, Ocana A, Penuelas S, et al. (2007) High TGF β -Smad activity confers poor prognosis in glioma patients and promotes cell proliferation depending on the methylation of the PDGF-B gene. *Cancer Cell* 11: 147–160.
27. Barter MJ, Pybus L, Litherland GJ, Rowan AD, Clark IM, et al. (2010) HDAC-mediated control of ERK- and PI3K-dependent TGF- β -induced extracellular matrix-regulating genes. *Matrix Biol* 29: 602–612.
28. Hannigan A, Smith P, Kalna G, Lo Nigro C, Orange C, et al. (2010) Epigenetic downregulation of human disabled homolog 2 switches TGF- β from a tumor suppressor to a tumor promoter. *J Clin Invest* 120: 2842–2857.
29. Assmann SM, Albert R (2009) Discrete dynamic modeling with asynchronous update, or how to model complex systems in the absence of quantitative information. *Methods Mol Biol* 553: 207–225.
30. Sreenath SN, Cho KH, Wellstead P (2008) Modelling the dynamics of signalling pathways. *Essays Biochem* 45: 1–28.

Figure S1

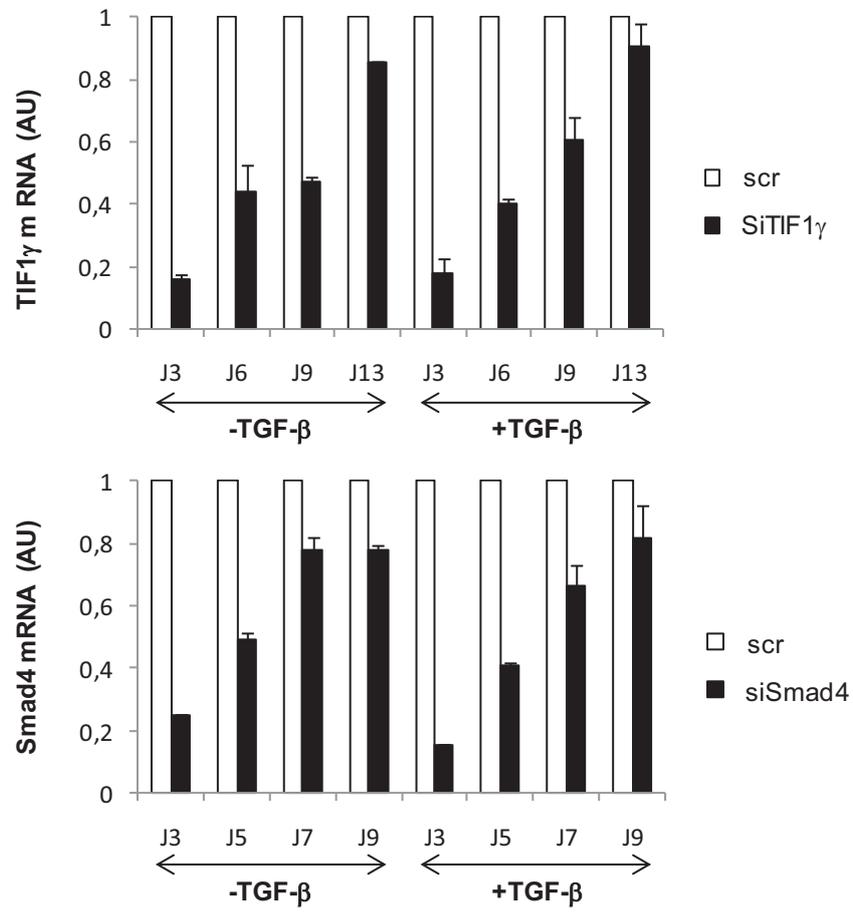


Figure S2

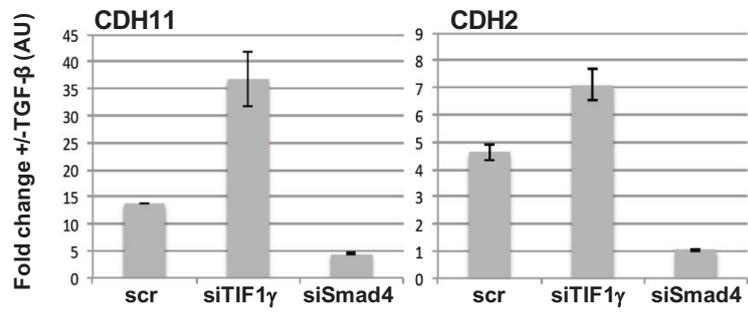


Figure S3

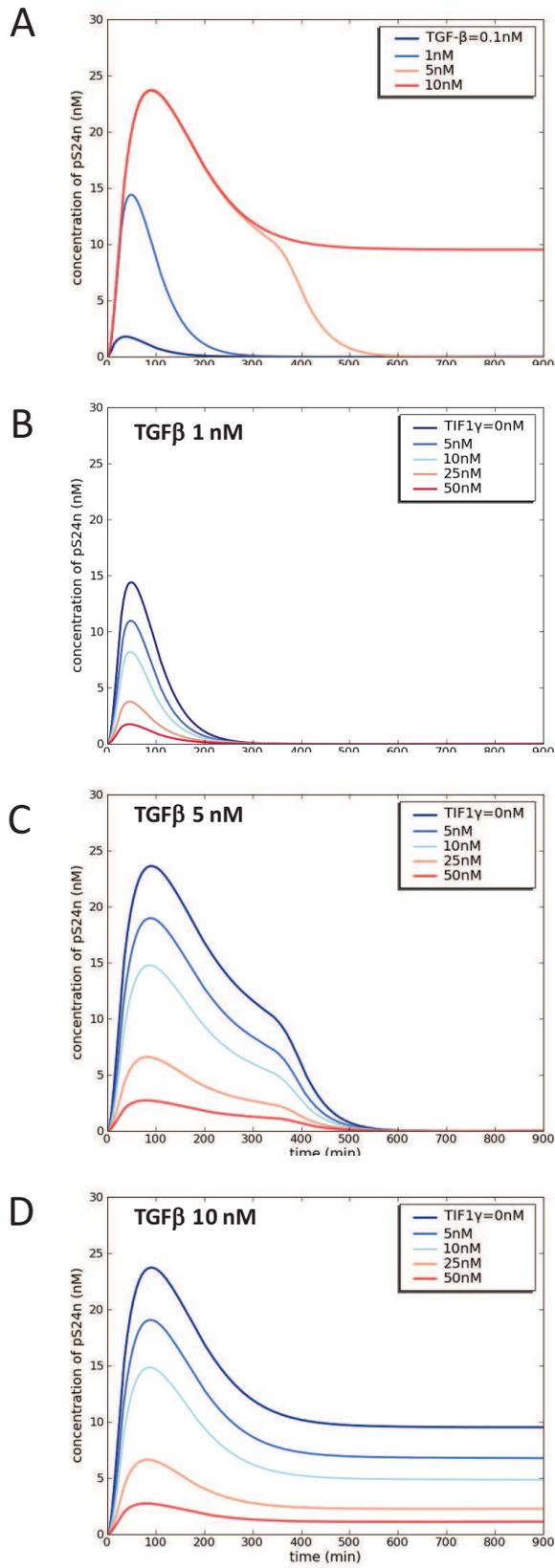


Figure S4

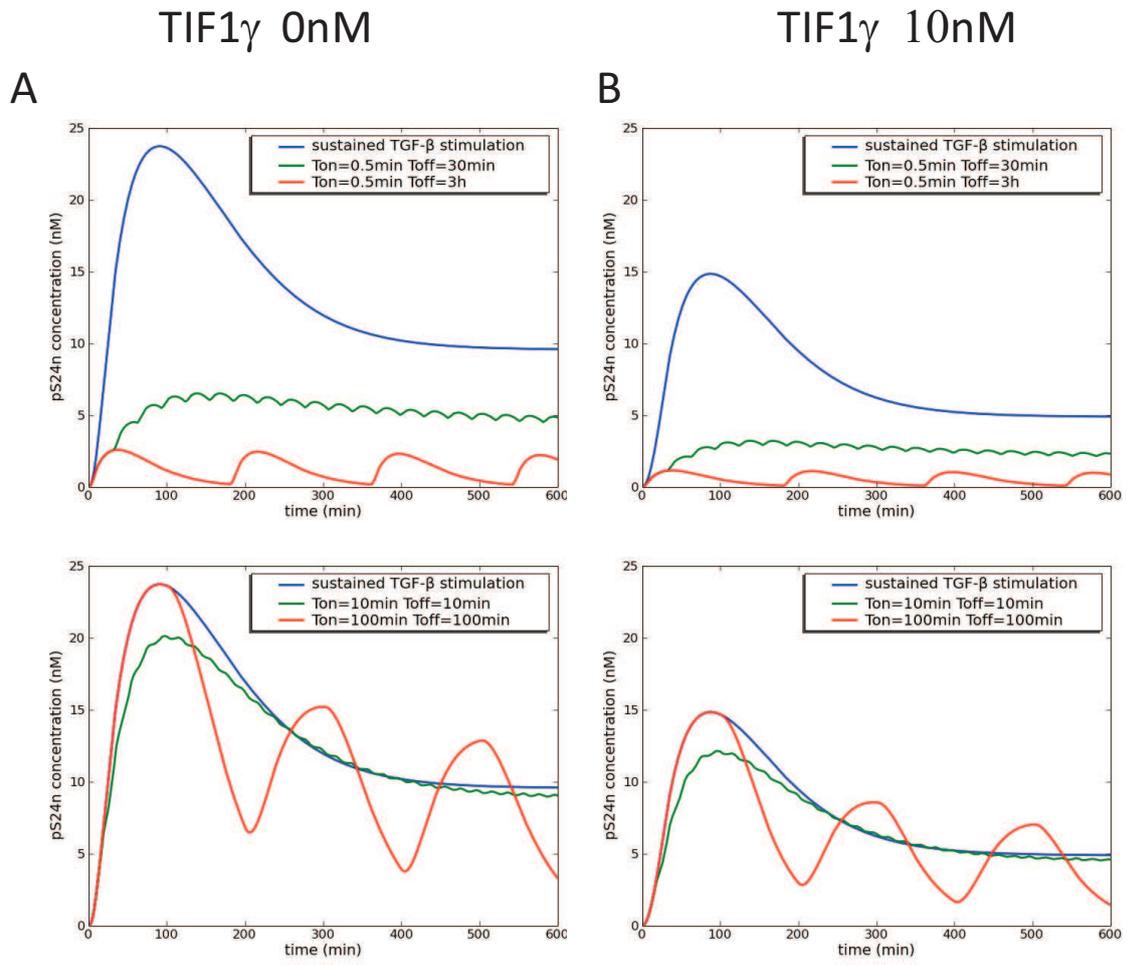


Table S1

Symbol	Definition	Value	Reference
S2c	cytoplasmic SMAD2	121.2nM	Schmierer et al, PNAS, 2008
S2n	nuclear SMAD2	57nM	Schmierer et al, PNAS, 2008
S4c	cytoplasmic SMAD4	50.8nM	Schmierer et al, PNAS, 2008
S4n	nuclear SMAD4	50.8nM	Schmierer et al, PNAS, 2008
pS2c	cytoplasmic phospho SMAD2	0nM	Schmierer et al, PNAS, 2008
pS2n	nuclear phospho SMAD2	0nM	Schmierer et al, PNAS, 2008
pS24c	cytoplasmic SMAD2 SMAD4 complex	0nM	Schmierer et al, PNAS, 2008
pS24n	nuclear SMAD2 SMAD4 complex	0nM	Schmierer et al, PNAS, 2008
pS22c	cytoplasmic SMAD2 SMAD2 complex	0nM	Schmierer et al, PNAS, 2008
pS22n	nuclear SMAD2 SMAD2 complex	0nM	Schmierer et al, PNAS, 2008
TGFβ	transforming growth factor beta	0 or 10nM	Schmierer et al, PNAS, 2008
PPase	Phosphatase	1nM	Schmierer et al, PNAS, 2008
RI	TGF type I receptor	3.66nM	Vilar et al, Plos Computational Biology, 2006
RII	TGF type II receptor	3.66nM	Vilar et al, Plos Computational Biology, 2006
LR	ligand receptor I receptor II complex	0nM	Vilar et al, Plos Computational Biology, 2006
RIe	endosomal TGF type I receptor	0nM	Vilar et al, Plos Computational Biology, 2006
RIIe	endosomal TGF type II receptor	0nM	Vilar et al, Plos Computational Biology, 2006
LR e	endosomal ligand receptor I receptor II complex	0nM	Vilar et al, Plos Computational Biology, 2006
TIF1γ	Transcriptional Intermediary Factor 1γ	from 0 to 50nM	Dupont et al, Cell, 2009
FAM	deubiquitinase	10nM	Dupont et al, Cell, 2009
pS24nTIF1γ	nuclear SMAD2 SMAD4 TIF1γ complex	0nM	Dupont et al, Cell, 2009 and He et al, Cell, 2006
pS2nTIF1γ	nuclear phospho SMAD2 TIF1γ complex	0nM	Dupont et al, Cell, 2009 and He et al, Cell, 2006
S4ub c	cytoplasmic ubiquitinate SMAD4	0nM	Dupont et al, Cell, 2009
S4ub n	nuclear ubiquitinate SMAD4	0nM	Dupont et al, Cell, 2009
k _{in}	import rate	$2.6 * 10^{-3} s^{-1}$	Schmierer et al, PNAS, 2008
k _{ex}	export rate	$5.6 * 10^{-2} s^{-1}$	Schmierer et al, PNAS, 2008
k _{phos}	phosphorylation rate	$4.04 * 10^{-4} nM^{-1} .s^{-1}$	Schmierer et al, PNAS, 2008
k _{dephos}	dephosphorylation rate	$7 * 10^{-3} nM^{-1} .s^{-1}$	Schmierer et al, PNAS, 2008
CIF	complex import factor	5.672 no unit	Schmierer et al, PNAS, 2008
k _{on}	Smad complex association rate	$2 * 10^{-3} nM^{-1} .s^{-1}$	Schmierer et al, PNAS, 2008
k _{off}	Smad complex separation rate	$1.6 * 10^{-2} s^{-1}$	Schmierer et al, PNAS, 2008
k _a	Ligand receptor association rate	$1 nM^{-2} .s^{-1}$	Vilar et al, Plos Computational Biology, 2006
k _{cd}	constitutive degradation rate	$4.68 * 10^{-4} s^{-1}$	Vilar et al, Plos Computational Biology, 2006
k _{lid}	ligand induces degradation rate	$4.16 * 10^{-3} s^{-1}$	Vilar et al, Plos Computational Biology, 2006
k _i	internalization rate	$5.55 * 10^{-3} s^{-1}$	Vilar et al, Plos Computational Biology, 2006
k _r	recycling rate	$5.55 * 10^{-4} s^{-1}$	Vilar et al, Plos Computational Biology, 2006
pRI	receptors I production rate	$9.75 * 10^{-3} nM .s^{-1}$	Vilar et al, Plos Computational Biology, 2006
pRII	receptors II production rate	$4.87 * 10^{-3} nM .s^{-1}$	Vilar et al, Plos Computational Biology, 2006
alpha	efficiency of recycling of active receptors	1 no unit	Vilar et al, Plos Computational Biology, 2006
k _{on pS24nTIF1γ}	pS24nTIF1γ complex association rate	$2 * 10^{-3} nM^{-1} .s^{-1}$	Dupont et al, Cell, 2009
k _{off pS24nTIF1γ}	pS24nTIF1γ complex dissociation rate	$1.6 * 10^{-2} s^{-1}$	Dupont et al, Cell, 2009
k _{off pS2nTIF1γ}	pS2nTIF1γ complex dissociation rate	$1.6 * 10^{-2} s^{-1}$	He et al, Cell, 2006
k _{in S4ub}	S4ub import rate	$5.2 * 10^{-4} s^{-1}$	Dupont et al, Cell, 2009
K _{dub}	S4ub c deubiquitination rate	$7 * 10^{-3} nM^{-1} .s^{-1}$	Dupont et al, Cell, 2009

Table S2

$$\begin{aligned}
 [S4c] &= k_{in}[S4n] - k_{in}[S4c] - k_{on}[S4n][pS2n] + k_{off}[pS24c] + k_{dub}[S4ubc][FAM] \\
 [S4n] &= k_{in}[S4c] - k_{in}[S4n] - k_{on}[S4n][pS2n] + k_{off}[pS24n] \\
 [S2c] &= k_{ex}[S2n] - k_{in}[S2c] - k_{phos}[S2c][LRe] \\
 [S2n] &= k_{in}[S2c] - k_{ex}[S2n] + k_{dephos}[S24n][PPase] \\
 [pS2c] &= k_{ex}[pS2n] - k_{in}[pS2c] + k_{phos}[S2c][LRe] - k_{on}[pS2c]([S4c] + 2[pS2c]) + k_{off}([pS24c] + 2[pS22c]) \\
 [pS2n] &= k_{in}[pS2c] - k_{ex}[pS2n] - k_{dephos}[pS2n][PPase] - k_{on}[pS2n]([S4n] + 2[pS2n]) + k_{off}([pS24n] + 2[pS22n]) \\
 &\quad + k_{off}[pS2nTIF1\gamma][pS2nTIF1\gamma] \\
 [pS24c] &= k_{on}[pS2c][S4c] - k_{off}[pS24c] - k_{in} * CIF * [pS24c] \\
 [pS24n] &= k_{on}[pS2n][S4n] - k_{off}[pS24n] + k_{in} * CIF * [pS24c] - k_{on}[pS24nTIF1\gamma][pS24nTIF1\gamma] \\
 [pS22c] &= k_{on} * 2[pS2c] - k_{off}[pS22c] - k_{in} * CIF * [pS22c] \\
 [pS22n] &= k_{on} * 2[pS2n] - k_{off}[pS22n] + k_{in} * CIF * [pS22c] \\
 [TGF\beta] &= 0 \\
 [PPase] &= 0 \\
 [LR] &= k_a[TGF\beta][RI][RII] - (k_{cd} + k_{id} + k_i)[LR] \\
 [RI] &= pRI - k_a[TGF\beta][RI][RII] - (k_{cd} + k_i)[RI] + k_r[RIe] + \alpha * k_r[LRe] \\
 [RII] &= pRII - k_a[TGF\beta][RI][RII] - (k_{cd} + k_i)[RII] + k_r[RIIe] + \alpha * k_r[LRe] \\
 [RIe] &= k_i[RI] - k_r[RIe] \\
 [RIIe] &= k_i[RII] - k_r[RIIe] \\
 [LRe] &= k_i[LR] - k_r[LRe] \\
 [TIF1\gamma] &= -k_{on}[pS24nTIF1\gamma][pS24nTIF1\gamma] + k_{off}[pS24nTIF1\gamma][pS24nTIF1\gamma] \\
 [FAM] &= 0 \\
 [pS24nTIF1\gamma] &= k_{on}[pS24nTIF1\gamma][pS24nTIF1\gamma] - k_{off}[pS24nTIF1\gamma][pS24nTIF1\gamma] \\
 [pS2nTIF1\gamma] &= k_{off}[pS24nTIF1\gamma][pS24nTIF1\gamma] - k_{off}[pS2nTIF1\gamma][pS2nTIF1\gamma] \\
 [S4ubc] &= k_{in}[S4ubn] - k_{dub}[S4ubc][FAM] \\
 [S4ubn] &= k_{off}[pS24nTIF1\gamma][pS24nTIF1\gamma] - k_{in}[S4ubn]
 \end{aligned}$$

Article 3 : TIF1 γ requires SUMOylation to exert its repressive activity on TGF β signaling

Résumé

La voie de signalisation du TGF β est régulée de manière fine par de nombreuses modifications post-traductionnelles (phosphorylation, ubiquitination, acétylation) des différents acteurs (récepteurs, R-Smads, Co-Smad). La SUMOylation affecte également différentes protéines de la voie du TGF β . La SUMOylation est l'addition covalente de résidus SUMO sur un substrat protéique, plus particulièrement au niveau d'un résidu lysine au sein d'un site consensus de SUMOylation.

De manière analogue à l'ubiquitination, cette modification fait intervenir des enzymes d'activation, de conjugaison (dont la seule connue est Ubc9) et de ligation. Un très grand nombre de protéines ont été décrites à ce jour comme étant SUMOylées. En fonction de la nature de la protéine ciblée par le ou les résidus SUMO, cette modification peut réguler la stabilité du substrat, sa localisation subcellulaire, son activité ou créer une nouvelle interface d'interaction. La SUMOylation est un processus très dynamique régulé par les enzymes de la SUMOylation et par les enzymes de la désSUMOylation, les SENPs, qui servent également à activer le résidu SUMO en clivant l'extrémité C-terminale (Figure 19).

Les autres membres de la famille TIF1 étant modifiés par SUMOylation, nous avons recherché si TIF1 γ pouvait être un substrat pour cette modification et quelle était sa fonction dans la voie de signalisation du TGF β . Grâce à une technique de purification de protéines SUMOylées, nous avons mis en évidence que TIF1 γ est SUMOylé sur plusieurs sites. De plus, cette modification dépend de la conjugase Ubc9 et de la ligase PIAS1 et peut être réversée par l'action de la SUMO protéase SENP1. Dans le but d'identifier les sites de SUMOylation de TIF1 γ , nous avons analysé la séquence de TIF1 γ à la recherche de sites potentiels de SUMOylation. Nous avons alors muté le résidu lysine de chaque site en arginine et observé l'effet de ces mutations, seules ou en combinaison, sur le pattern de SUMOylation de TIF1 γ . Nous avons ainsi identifié quatre sites fonctionnels de SUMOylation dont la mutation a donné naissance à un mutant non-SUMOylable (TIF1 γ -Mut) que nous avons utilisé pour caractériser l'effet de la SUMOylation de TIF1 γ dans la voie de signalisation du TGF β .

Dans un premier temps, nous avons analysé le rôle de la SUMOylation de TIF1 γ dans la formation des complexes transcriptionnels par des expériences d'immunoprécipitation. De manière intéressante, la forme mutée de TIF1 γ n'est plus capable d'inhiber la formation du

complexe Smad4-Smad2/3 comme le fait la protéine TIF1 γ sauvage. De plus, l'absence de SUMOylation de TIF1 γ inhibe l'interaction TIF1 γ -Smad2/3 induite par le TGF β . Enfin, l'interaction entre TIF1 γ et Smad4, conduisant potentiellement à la mono-ubiquitination et à l'export nucléaire de Smad4, est également régulée par la SUMOylation de TIF1 γ . En effet, nos résultats montrent que le mutant de SUMOylation présente une plus forte affinité pour Smad4.

Récemment, il a été montré que TIF1 γ pouvait lier la chromatine au niveau de régions promotrices des différents gènes cibles du TGF β . Dans le but d'analyser l'effet de la SUMOylation de TIF1 γ dans ce niveau de régulation, nous avons réalisé des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine après une cinétique courte de traitement au TGF β afin d'observer les cinétiques de recrutement des protéines TIF1 γ et Smad4 au niveau du promoteur du gène cible PAI-1. Les protéines TIF1 γ et Smad4 présentent deux cinétiques de recrutement opposées, démontrant l'effet répressif de TIF1 γ sur les fonctions de Smad4 : TIF1 γ semble être nécessaire pour limiter temporellement l'action de Smad4 sur le promoteur de PAI-1. De manière intéressante, le mutant non-SUMOylable n'est pas capable de restreindre le recrutement de Smad4 sur le promoteur.

TIF1 γ est capable d'inhiber la réponse transcriptionnelle au TGF β passant par Smad4. En accord avec les résultats précédents, l'étude de la réponse transcriptionnelle au TGF β par des essais luciférase sous le contrôle d'un promoteur répondant à Smad4 a permis de confirmer la levée d'inhibition des fonctions de Smad4 en présence du TIF1 γ -Mut. La génération de lignées épithéliales mammaires MCF10A exprimant de manière stable la forme sauvage ou mutée de TIF1 γ nous a permis d'analyser l'effet de la SUMOylation de TIF1 γ sur l'induction de la TEM par le TGF β . Comme attendu, l'expression de TIF1 γ sauvage inhibe la TEM induite par le TGF β . De manière intéressante, l'expression de la forme non-SUMOylable de TIF1 γ n'est pas capable d'inhiber la TEM et la migration cellulaire induite par le TGF β . Le mutant de TIF1 γ correspondrait à un mutant « perte-de-fonction ».

La SUMOylation de TIF1 γ serait donc un moyen supplémentaire de réguler l'activité répressive de TIF1 γ sur Smad4 dans la voie de signalisation du TGF β .

Article

TIF1 γ REQUIRES SUMOYLATION TO EXERT ITS REPRESIVE
ACTIVITY ON TGF β SIGNALING

FATTET Laurent*, AY Anne-Sophie*, BONNEAU Benjamin, JALLADES Laurent,
MIKAELIAN Ivan, TREILLEUX Isabelle, GILLET Germain, HESLING Cédric &
RIMOKH Ruth,

Journal of Cell Science

En révision

(* co-auteurs)

TIF1 γ requires sumoylation to exert its repressive activity on TGF β signaling

Laurent Fattet^{1,2,3*}, Anne-Sophie Ay^{1,2,3*}, Benjamin Bonneau^{1,2,3}, Laurent Jallades^{1,2,3}, Ivan Mikaelian^{1,2,3}, Isabelle Treilleux⁴, Germain Gillet^{1,2,3}, Cédric Hesling^{1,2,4}, Ruth Rimokh^{1,2,3,4,§}

¹ Inserm UMR-S1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Lyon, France

² CNRS UMR5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Lyon, France

³ Université de Lyon, Lyon, France

⁴ Centre Léon Bérard, Lyon, France

ASA, present address: laboratoire de Physiologie Cellulaire et Moléculaire, JE 2530, Amiens, France.

LJ, present address: Service d'Hématologie Biologique, Centre Hospitalier Lyon-Sud, Pierre-Bénite, France.

* These authors contributed equally to this work

§ **Corresponding author:** Ruth Rimokh, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Centre Léon Bérard, 69373 LYON cedex 08, France. Phone: +33 (0) 478782903; Fax: +33 (0) 478782720; E-mail: ruth.rimokh@lyon.unicancer.fr

Running title: TIF1 γ sumoylation regulates TGF β signaling

Total word count: 6876 words

SUMMARY

TIF1 γ , a new actor of TGF β signaling, inhibits the Smad4-mediated TGF β response by interaction with Smad2/3 or ubiquitination of Smad4. We have shown that TIF1 γ participates in TGF β signaling as a negative regulator of Smad4 during the TGF β -induced epithelial-to-mesenchymal transition in mammary epithelial cells and during terminal differentiation of mammary alveolar epithelial cells and lactation. We demonstrate here that TIF1 γ is sumoylated and interacts with Ubc9, the only known SUMO-conjugating enzyme. Four functional sumoylation sites lie within the *middle* domain of TIF1 γ , the Smad interaction domain. We show that a sumoylation-defective TIF1 γ mutant significantly reduces TIF1 γ inhibition of Smad complexes and that of the Smad-mediated TGF β transcriptional response. Moreover, chromatin immunoprecipitation experiments indicate that TIF1 γ sumoylation is required to limit Smad4 binding on the PAI-1 TGF β target gene promoter. Ectopic expression of TIF1 γ in mammary epithelial cells inhibits TGF β -induced EMT, an effect relieved by expression of non-sumoylated TIF1 γ . Taken together, our results identify a new TGF β regulatory layer, whereby sumoylation strengthens the TIF1 γ repressive action on canonical TGF β signaling.

[169 words]

Keywords: TIF1gamma/TRIM33/TGFbeta/sumoylation/Smad

INTRODUCTION

Transforming Growth Factor β (TGF β) has key functions in cell growth, differentiation, apoptosis, development and tumorigenesis. The TGF β signaling pathway involves a small class of signaling effectors, the Smads, that act as key mediators of the cell response to TGF β . Following ligand binding to type II/type I receptor complexes, activated type I receptors phosphorylate the receptor-activated Smads, Smad2 and Smad3. Release of activated Smad2/3 from receptors leads to the formation of a heterotrimeric complex with the common-mediator Smad (Co-Smad), Smad4. Smad complexes enter the nucleus where they interact at promoters of TGF β target genes with other transcription factors and in cooperation with tissue-specific activators and repressors to regulate gene expression (Massague, 2005). Transcriptional Intermediary factor 1 γ (TIF1 γ ; also called ectodermin, TRIM33, RFG7 or PTC7) is a member of the TIF1 family of transcriptional cofactors, characterized by an amino-terminal RING-finger B-box coiled-coil (RBCC/TRIM) motif and a carboxy-terminal bromodomain preceded by a PHD finger (Venturini *et al*, 1999; Yan *et al*, 2004). TIF1 γ has been implicated in TGF β signaling through its selective binding to phosphorylated Smad2/3 in competition with Smad4 (He *et al*, 2006; Xi *et al*, 2011). TIF1 γ could also antagonize Smad4 through its ubiquitin ligase properties (Levy *et al*, 2007; Dupont *et al*, 2005; 2009; Morsut *et al*, 2010) and, more generally, as a repressor of TGF β superfamily-induced transcription by restricting the residence time of activated Smad complexes on the promoters of target genes (Agricola *et al*, 2011). Several reports indicate that TIF1 γ is an important regulator of transcription during hematopoiesis (Ransom *et al*, 2004; He *et al*, 2006; Bai *et al*, 2010; Kusy *et al*, 2011) and may also be a key actor of tumorigenesis (Aucagne *et al*, 2011; Herquel *et al*, 2011b; Vincent *et al*, 2009; 2012). In addition, we have recently demonstrated that TIF1 γ regulates the TGF β -induced epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in mammary epithelial cells (Hesling *et al*, 2011) and during terminal differentiation of mammary alveolar epithelial cells and lactation (Hesling *et al*, 2012) through repression of Smad4 activity.

Sumoylation is a post-translational modification that involves the covalent addition of Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO) residues on a protein substrate by a mechanism similar to ubiquitination. Sumoylation is a multi-step process initiated by the E1 SUMO-activating enzymes, followed by an E2 SUMO-conjugating enzyme (ubiquitin carrier 9, Ubc9). A third enzyme (E3 ligase), forming a complex with SUMO-conjugated Ubc9 and the protein substrate, enhances the efficiency and specificity of SUMO transfer. Conjugation to SUMO is reversible and desumoylation is catalyzed by SUMO-specific proteases (SENPs). Like other

post-translational modifications, sumoylation creates an additional level of regulation and can control diverse cellular processes, including transcription, nuclear transport and signal transduction, depending on the identity of the substrate (Gareau & Lima, 2010). The identification of TIF1 α and TIF1 β as SUMO substrates (Seeler *et al*, 2001; Mascle *et al*, 2007; Ivanov *et al*, 2007) prompted us to test whether TIF1 γ might also be a substrate for this post-translational modification. In this study, we show that the *middle* region of TIF1 γ is a specific target of SUMO-1. We further demonstrate that sumoylation of TIF1 γ is required for its repressive activity on the Smad4 transcriptional response. These findings support a model whereby temporal regulation of TGF β signaling by TIF1 γ modifications implicates a blockade of Smad4 function.

RESULTS

Modification of TIF1 γ by sumoylation

We used the His6-pull down assay to determine whether TIF1 γ is a substrate for post-translational modification by SUMO. Nickel affinity purification of His-tagged protein complexes from whole-cell extracts of HMEC-TR cells transfected with TIF1 γ in the presence of exogenous (His-tagged) SUMO-1, yielded several immunoreactive bands. These bands were not perceptible in the absence of exogenously expressed His6-SUMO-1 (Fig. 1A). In support of the conclusion that these species correspond to sumoylated TIF1 γ , they were markedly increased when Ubc9, the only known SUMO-conjugase, and the SUMO-ligase PIAS1, were expressed in the presence of SUMO-1. A yeast two-hybrid screen confirmed that Ubc9 interacts with the TIF1 γ *middle* region (see Materials and Methods). To corroborate this result, we next measured the interaction of TIF1 γ and Ubc9 by co-immunoprecipitation in HMEC-TR cells transfected with expression vectors for TIF1 γ or Ubc9, used alone or in combination. Co-precipitation was observed when cell lysates were immunoprecipitated with antibodies against TIF1 γ (Fig. 1B), confirming the interaction between TIF1 γ and Ubc9. TIF1 γ immunoprecipitates of TIF1 γ -transfected HMEC-TR cells transfected or not with a SUMO-1 construct showed slow-migrating bands detected by a SUMO-1 antibody (Fig. 1C). SUMO modification of endogenous TIF1 γ was also observed in the presence of exogenous TGF β (Fig. 1D) and was strongly increased when both exogenous TIF1 γ and SUMO-1 were expressed (Fig. 1E). No accumulation of these bands was observed after specific MG132 inhibition of proteasome-dependent degradation, consistent with a post-translational modification by sumoylation rather than ubiquitination (Fig. 1F). Finally, expression of either SUMO-2 or SUMO-3 did not induce the TIF1 γ sumoylation pattern observed after SUMO-1 transfection (Fig. 1G). Accordingly, further studies were performed with SUMO-1 only. Because desumoylation is mediated by SENP-family proteases (Yeh, 2008) and to investigate the reversibility of TIF1 γ sumoylation, we expressed SENP-1 together with SUMO-1. Under these conditions, TIF1 γ sumoylation was abolished, whereas expression of the catalytically inactive mutant of SENP-1 (R630L/K631M) (SUMO-Specific Protease 1 Is Essential for Stabilization of HIF1 α during Hypoxia, 2007) restored the TIF1 γ sumoylation pattern (Fig. 1H). Taken together, these results demonstrate that TIF1 γ is efficiently modified by SUMO-1, a process that can be enhanced by TGF β treatment.

Identification of functional sumoylation sites in TIF1 γ

Where is TIF1 γ sumoylated? We first identified several consensus sumoylation sites (Ψ KX(D/E)) using the SUMOplot software (Abgent, San Diego, CA, USA). Comparison of the human TIF1 γ sites with those found in the same region in other organisms revealed a strong conservation of the positions of four potentially sumoylated lysine residues (Fig. 2A). Of note, these putative sites were all located within the *middle* domain of TIF1 γ , which has been identified as the interaction domain with Smad proteins (He *et al*, 2006). We mutated each of these lysines into arginines in an attempt to disrupt TIF1 γ sumoylation. Single point mutations only slightly inhibited TIF1 γ sumoylation (see Supplementary Fig. S1), suggesting the existence of multiple SUMO-conjugation sites, possibly acting in concert. Accordingly, we generated a series of double, triple and quadruple lysine mutants (Figs S1, 2B). Only mutation of all four lysines (K776R/K793R/K796R/K839R) into arginines fully abrogated sumoylation, identifying these residues as functional SUMO attachment sites (Fig. 2B). The fully sumoylation-defective quadruple mutant will be henceforth referred to as TIF1 γ -Mut. We also generated a Ubc9-TIF1 γ fusion protein that was efficiently sumoylated in a Ubc9-dependent manner (Jakobs *et al*, 2007), markedly more so in the presence of SUMO-1 (Fig. 2C).

Sumoylation has previously been shown to modulate protein stability. We asked whether such an effect could be observed for modified TIF1 γ using HMEC cells transfected with either flag-tagged wild-type TIF1 γ or TIF1 γ -Mut and treated with cycloheximide. Our results conclusively show that TIF1 γ sumoylation did not alter TIF1 γ stability (Fig. 2D,E). Finally, to rule out the possibility that the absence of SUMO-1 modification in cells expressing TIF1 γ -Mut is the consequence of aberrant sub-cellular localization, mammary epithelial MCF10A cells stably expressing wild-type and mutant TIF1 γ proteins (see Supplementary Fig. S2) were analyzed by immunofluorescence. As shown in Fig. 2F, the quadruple mutant displayed the same diffuse-granular nuclear distribution as its wild-type counterpart. Taken together, our results demonstrate that TIF1 γ is sumoylated on four evolutionarily conserved lysine residues (Lys-776, -793, -796 and -839) located within the *middle* domain of TIF1 γ . These modifications, which do not alter the stability of the protein, were studied further as described below.

TIF1 γ is SUMO modified in the nucleus

We first asked where in the cell TIF1 γ protein is sumoylated and whether this localization is required for modification. A putative Nuclear Localization Site (NLS) was found at the C-

terminus of TIF1 γ (Fig. 3A). We mutated lysine 1118 into glutamic acid (K1118E mutant) using arginine or glycine mutants (K1118R and K1118G mutants, respectively) as controls that preserve the basic charge of the sequence. As expected, wild-type TIF1 γ as well as K1118R and K1118G mutants displayed nuclear staining and could be sumoylated (Fig. 3B,C). In contrast, mutation of lysine 1118 into glutamic acid (K1118E mutant) had two effects: cytoplasmic localization and loss of sumoylation (Fig. 3B, 3C). Most importantly, the K1118E mutant, unlike its wild-type counterpart, could not repress the TGF β transcriptional response (Fig. 3D). These results indicate that the presumptive NLS localized at the C-terminal end of TIF1 γ protein is indeed functional and that the nuclear localization of TIF1 γ is required for the sumoylation of the protein and for its repressive activity.

TIF1 γ sumoylation regulates Smad complex formation

We next asked how TIF1 γ sumoylation might impact the TGF β pathway. Because we localized the TIF1 γ sumoylation sites within its *middle* Smad-protein interaction domain, we first examined whether TIF1 γ sumoylation could affect Smad complex formation induced by TGF β . As expected, TGF β induced the formation of the Smad3/4 complex (compare lanes 1 and 2 in Fig. 4A). Note that transfection of SUMO-1 appeared to increase the interaction between Smad3 and Smad4 (compare lanes 2 and 4 in Fig. 4A). We next investigated whether TIF1 γ -Mut could influence Smad complex formation. Unlike wild-type TIF1 γ , which strongly decreased both Smad3/Smad4 (lane 6, Fig. 4A) and Smad2/Smad4 (lane 5, Fig. 4B) interactions, the sumoylation-defective mutant could not inhibit Smad complex formation (lane 7, Fig. 4B; lane 6, Fig. 4C). In contrast, the hyper-sumoylated Ubc9-TIF1 γ fusion protein was more efficient than wild-type TIF1 γ in inhibiting Smad interactions (see lane 9, Fig. 4B and lane 8, Fig. 4C).

TIF1 γ is known to interact with Smad proteins in a TGF β -dependent manner (He *et al*, 2006). Accordingly, TGF β stimulation enhanced the interaction of wild-type TIF1 γ with Smad2 or Smad3 (lane 5, Fig.s 4B; lane 3, Fig. 4D). Note that this interaction was favored upon SUMO-1 expression (lanes 5 and 6, Fig. 4D). In contrast, expression of the SENP-1 SUMO protease inhibited formation of the TIF1 γ /Smad3 complex (lanes 6 and 7, Fig. 4D). In addition, TIF1 γ -Mut did not interact with Smad2 (lanes 6 and 7, Fig. 4B), while the Ubc9-TIF1 γ fusion protein strongly did (lanes 8 and 9, Fig. 4B). Finally, we analyzed the interaction of Smad4 with TIF1 γ using mutual co-immunoprecipitation in HMEC-TR cells expressing wild-type or mutant TIF1 γ . We found that overexpressing sumoylation-defective TIF1 γ -Mut

led to a moderate but reproducible enhancement of binding to Smad4 in the presence of TGF β (Fig. 4E,F). Taken together, these results show that lack of TIF1 γ sumoylation significantly reduces the ability of TIF1 γ to inhibit Smad4-Smad2/3 complex formation, suggesting that TIF1 γ sumoylation is crucial for the repressive activity of TIF1 γ on Smad4 function. We address this hypothesis next.

TIF1 γ sumoylation restricts Smad4 residence on the PAI-1 promoter

In addition to a role in the regulation of Smad complex formation, TIF1 γ has recently been shown to bind chromatin in the promoter region of TGF β target genes (Agricola *et al*, 2011; Hesling *et al*, 2011; Xi *et al*, 2011). We are particularly interested in a group of genes antagonistically regulated by TIF1 γ and Smad4 and involved in TGF β -induced EMT. Our own results have shown that PAI-1 transcriptional activation by TGF β is enhanced upon TIF1 γ depletion and severely inhibited upon Smad4 depletion (Hesling *et al*, 2011). To determine what role, if any, TIF1 γ sumoylation might play in these regulatory processes, we performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays in HMEC-TR cells known to express PAI-1 in response to TGF β in a Smad-dependent manner. To analyze the sequence of events at the chromatin level, we followed the kinetics of Smad4 and TIF1 γ recruitment at the Smad-binding region of the PAI-1 promoter (-791 to -546) after TGF β treatment.

Consistent with its described role as a transcriptional repressor, TIF1 γ was detected at the PAI-1 promoter in the absence of TGF β treatment. TGF β stimulation induced Smad4 enrichment onto the promoter, which was correlated with transient TIF1 γ dissociation (Fig. 5A). The optimal enrichment of TIF1 γ at the promoter seen two hours after TGF β stimulation suggests that TIF1 γ is required for limiting Smad4 residence on the PAI-1 promoter and thus acts as a repressor of Smad4 functions. Comparable kinetics were observed upon ectopic expression of TIF1 γ (Fig. 5B), although this reduced the time span of Smad4 residence on the PAI-1 promoter. Of marked interest is the observation that sumoylation-defective TIF1 γ -Mut was not capable of interfering with Smad4 residence on the PAI-1 promoter (Fig. 5C), suggesting that lack of sumoylation renders TIF1 γ unable to limit Smad4 association with this region, which still increased after 2 hours of TGF β stimulation. We confirmed this requirement for sumoylated TIF1 γ for termination of Smad4 signaling by performing a ChIP kinetic analysis in HMEC-TR cells upon ectopic expression of the hyper-sumoylated Ubc9-TIF1 γ fusion protein. As expected if TIF1 γ sumoylation serves as a signal to restrict Smad4 residence

on the PAI-1 promoter, this led to strongly reduced Smad4 occupancy on the PAI-1 promoter (Fig. 5D).

TIF1 γ sumoylation regulates TGF β -induced EMT

We have shown that TIF1 γ down-regulation facilitates the contribution of Smad4 to TGF β -induced EMT (Hesling *et al*, 2011). As demonstrated above, sumoylation of TIF1 γ can regulate its interaction with Smad protein, leading us to investigate next the functional role of this post-translational modification in the regulation of TGF β signaling. We first checked whether sumoylation of TIF1 γ could affect its ability to repress TGF β signaling. Using HMEC-TR cells expressing sumoylation-defective TIF1 γ -Mut and a luciferase construct driven by the activated Smad complex, we observed that lack of TIF1 γ sumoylation significantly reduced the ability of TIF1 γ to repress the TGF β transcriptional response (Fig. 6A). This result strongly suggests a correlation between TIF1 γ repressive activity and its sumoylation capacity.

We then used MCF10A mammary epithelial cells (see Supplementary Fig. S2), stably expressing either wild-type TIF1 γ (TIF1 γ -WT) or its sumoylation-defective mutant (TIF1 γ -Mut) and analyzed by RT-qPCR the expression of the *PAI-1*, *CDH2* and *CDH11* TIF1 γ -dependent genes implicated in EMT in these cells. The TGF β -induced upregulation of *PAI-1*, *CDH2* and *CDH11* observed in control cells (empty vector) was inhibited in TIF1 γ -WT cells but not in TIF1 γ -Mut cells (Fig. 6B). This outcome indicates that the sumoylation-defective mutant acts as a loss-of-function mutation and further establishes that sumoylation of TIF1 γ is required for its repressive effect on TGF β -dependent transcription.

Does sumoylation of TIF1 γ , or lack thereof, affect processes other than transcriptional regulation? We addressed this question by testing the possible implication of TIF1 γ sumoylation in TGF β -induced EMT. To do so, we analyzed E-cadherin expression, cytoskeleton remodeling and cell migration in stably transfected MCF10A cells. Cells were treated with the T β RI kinase inhibitor SB-431542 (SB, which blocks any signaling arising from autocrine production of TGF β) as control or with TGF β for 96 hours. As expected, a 96h-TGF β treatment induced a complete loss of E-Cadherin expression in control cells (Fig. 6C, left bottom panel). In contrast to the effect of the wild-type protein (middle bottom panel), expression of TIF1 γ -Mut failed to interfere with the TGF β -induced loss of E-cadherin (compare the left and right bottom panels), establishing that TIF1 γ sumoylation is also required for the repressive effects of the protein on this other aspect of TGF β signaling.

This result was confirmed by studying actin cytoskeleton remodeling. Following stimulation with TGF β , control cells (empty vector) underwent an EMT characterized by a transition to a spindle-like mesenchymal phenotype (Fig. 6D, compare upper and bottom left panels), whereas TIF1 γ -WT expressing cells retained a much more regular epithelial morphology (middle panel). In this case as well, the sumoylation-defective mutant of TIF1 γ failed to inhibit the reorganization of actin fibers induced by TGF β treatment (right panel). Finally, to correlate these effects with an additional hallmark of the EMT phenotype, cell motility, we performed a Boyden chamber migration assay using MCF10A cells stably transfected with vectors expressing an shRNA directed against TIF1 γ , TIF1 γ -WT or TIF1 γ -Mut (see Supplementary Fig. S2). As shown in Fig. 6E, compared to empty-vector control cells, TGF β -induced cell migration was clearly enhanced in MCF10A cells expressing the TIF1 γ shRNA. As expected, cell migration was significantly reduced when wild-type TIF1 γ was expressed. As a third line of evidence in support of a direct role for TIF1 γ sumoylation in the repression of TGF β -induced EMT, TIF1 γ -Mut again acted as a loss-of-function mutation which did not interfere with TGF β -dependent cell migration. Based on the results of the three independent assays illustrated in Fig. 6, we conclude that sumoylation of TIF1 γ enhances its inhibitory effect on TGF β -induced EMT. Conversely, lack of TIF1 γ sumoylation fully abolishes this repressive function.

DISCUSSION

Substrate modification by SUMO regulates protein–protein interactions, intracellular localization or protein functions and can therefore regulate diverse cellular processes, including transcription, replication and DNA repair (Gareau & Lima, 2010). Post-translational modifications of TGF β receptors and Smad proteins play a key role in the regulation of TGF β signaling and participate to the elaboration of appropriately tuned TGF β responses (Xu *et al*, 2012). Sumoylation can play both positive and negative roles in the TGF β pathway. In the case of T β RI, its sumoylation stabilizes Smad2/3 binding to the T β RI receptor, leading to enhanced Smad activation (Kang *et al*, 2008). Sumoylation of Smad3 stimulates its nuclear export and inhibits Smad-dependent transcription (Imoto *et al*, 2008). Smad4 can also be sumoylated; this may prevent Smad4 ubiquitination and protects it from degradation, thus enhancing TGF β -induced Smad signaling (Lin *et al*, 2003b; Lee *et al*, 2003; Ohshima & Shimotohno, 2003). However, Smad4 sumoylation was also reported to repress Smad-mediated transcription (Long *et al*, 2004; Miles *et al*, 2008). The sum total of the effects of sumoylation on TGF β signaling are therefore complex (Lönn *et al*, 2009).

In this study, we have extended the analysis of the effects of sumoylation of another modulator of TGF β signaling, TIF1 γ . A broad search for sumoylated proteins in brain cells recently identified TIF1 γ as a substrate for sumoylation (Tirard *et al*, 2012) and, in keeping with this observation, we show here that TIF1 γ is indeed covalently conjugated to SUMO-1 in the nucleus at lysines 776, 793, 796 and 839. In support of their functional significance, these four lysine residues are evolutionarily conserved and are all located within the *middle* domain of TIF1 γ , which has been identified as the interaction domain with Smad proteins (He *et al*, 2006). The Ubc9 E2 enzyme and members of the E3 SUMO ligase PIAS family catalyze TIF1 γ sumoylation. A major finding reported here is that TIF1 γ sumoylation enhances its inhibitory effects on TGF β signaling.

TGF β signaling is negatively regulated by several proteins such as Smad7 or SnoN (Moustakas & Heldin, 2009; Deheuninck & Luo, 2009). It has been demonstrated that TIF1 γ is also a negative regulator of TGF β superfamily signaling. TIF1 γ acts as a E3 ubiquitin ligase that targets Smad4 for ubiquitination, thus limiting Smad4 nuclear residence on its target promoters (Dupont *et al*, 2009; Agricola *et al*, 2011). Ubiquitination-mediated degradation of Smad4 can be antagonized by the FAM/USP9x de-ubiquitylase, thus restoring Smad4 function (Dupont *et al*, 2009). Results from others as well as our own have shown that TIF1 γ is a potent inhibitor of Smad4 functions during TGF β -induced EMT (Hesling *et al*, 2011),

terminal differentiation of mammary alveolar epithelial cells and lactation (Hesling *et al*, 2012) and during specification of the ectoderm in *Xenopus* embryos (Dupont *et al*, 2005). Moreover the negative regulation of Smad4 by TIF1 γ is essential to achieve proper dosage of Nodal responsiveness in mouse embryos (Morsut *et al*, 2010).

While TIF1 γ expression inhibits TGF β -induced transactivation, Smad4 is more available for association with Smad2/3 in TIF1 γ -depleted cells, leading to an enhanced TGF β response. Thus, varying TIF1 γ /Smad4 ratios plays a critical role in the modulation of the transcriptional signal induced by TGF β (Andrieux *et al*, 2012). Using promoter constructs driven by the activated Smad complex, we show that the sumoylation-defective mutant of TIF1 γ significantly reduces the ability of TIF1 γ to repress the TGF β transcriptional response. This finding provides what is, to our knowledge, the first report showing that TIF1 γ sumoylation is required for the inhibition of Smad4-dependent transcription. Smad4 is essential for TGF β -induced EMT in mammary epithelial MCF10A cells and stable expression of either wild-type TIF1 γ or a sumoylation-null mutant demonstrates that TIF1 γ sumoylation is required to inhibit the TGF β -induced EMT process.

It was recently proposed that TIF1 γ could act as a repressor of TGF β superfamily-induced transcription by restricting the residence time of activated Smad complexes at the promoter of target genes (Agricola *et al*, 2011). According to this model, TIF1 γ ubiquitin ligase activity requires binding to histone H3 tails. Activated TIF1 γ would then ubiquitinate chromatin-bound Smad4, leading to the disruption of Smad complexes and promoting their release from the promoter of TGF β target genes. TIF1 γ has also been involved in TGF β signaling through selective binding to phosphorylated Smad2/3 in competition with Smad4 (He *et al*, 2006). Massagué's laboratory recently demonstrated that TIF1 γ -Smad2/3 complexes bind to H3K9me3 through recognition by PHD- and Bromo-domains, with an affinity higher than that of HP1 γ (Heterochromatin Protein 1 γ), the "guardian" of the poised transcriptional state. Such a substitution of chromatin readers leads to chromatin decompaction and allows Smad4-Smad2/3 complexes to access their binding sites and switch master regulators of stem cell differentiation from the poised to the active state (Xi *et al*, 2011). Accordingly, it has been proposed that, in erythroid cells, the canonical Smad4-Smad2/3 arm mediates homeostatic gene responses while the TIF1 γ -Smad2/3 arm stimulates differentiation (He *et al*, 2006; Xi *et al*, 2011).

Our own results confirm that TIF1 γ expression inhibits the formation of Smad4-Smad2/3 complexes required for Smad-dependent transcription and promotes instead the

formation of TIF1 γ -Smad2/3 complexes. We show that this is significantly reduced by lack of TIF1 γ sumoylation, as is the ability of TIF1 γ to inhibit formation of Smad4-Smad2/3 complexes, enhancing instead binding of TIF1 γ to Smad4. The simplest conclusion, then, is that TIF1 γ sumoylation is required for inhibition of Smad4-Smad2/3 complex formation. Results of our ChIP experiments confirm that TIF1 γ is required for limiting Smad4 residence onto the PAI-1 promoter. Moreover, we have previously shown that TIF1 γ silencing enhanced Smad4 binding to DNA (Hesling *et al*, 2011). Interestingly, the sumoylation-defective TIF1 γ mutant no longer interferes with Smad4 residence, suggesting that, in this case as well, TIF1 γ sumoylation serves to limit Smad4 binding to target promoters. In support of this view, basal binding of the sumoylation-defective TIF1 γ mutant on the PAI-1 promoter is reduced relative to wild-type TIF1 γ . We postulate that TIF1 γ sumoylation might strengthen its binding to histone H3 tails in response to TGF β treatment, therefore promoting its inhibitory effects on Smad4-dependent transcription.

Our results strongly suggest that the transcriptional repression mediated by TIF1 γ requires its post-translational modification by SUMO, an observation also made for TIF1 β (Masclé *et al*, 2007). TIF1 β sumoylation is needed for recruitment of the SETDB1 histone methyl-transferase and the CHD3 chromatin remodeling factor and stimulates their activity, leading to gene silencing (Ivanov *et al*, 2007). In the same way that TIF1 β sumoylation is required for KRAB domain-mediated repression, TIF1 γ sumoylation would then be required for the transcriptional repression of TGF β signaling through negative regulation of Smad complex formation and of their residence on the promoter of target genes. One could suppose that sumoylation of TIF1 γ might also coordinate the recruitment of factors regulating the chromatin state. The extremely dynamic interconnections between transcription factors, co-repressors and co-activators allow for proper and optimal transcriptional responses to a given signal. While more biochemical studies will be required to analyze in detail the interplay between different post-translational modifications in the TGF β signaling pathway, it appears likely that the dynamics of sumoylation/desumoylation events help regulate the effect of TIF1 γ on Smad4 functions.

MATERIALS AND METHODS

Plasmids

Expression vectors encoding flag-Smad2, flag-Smad3 and flag-Smad4 were kindly provided by P. Ten Dijke (Leiden, Netherlands). For sumoylation experiments, His6-SUMO-1, SUMO-2, SUMO-3, Ubc9 and PIAS1 expression vectors were kindly provided by S. Sentis (Lyon, France). SENP-1 and (R630L/K631M) catalytically inactive mutant of SENP-1 expression vectors were provided by E. T. Yeh (Houston, Texas). Sumoylation mutant plasmids were obtained by site-directed mutagenesis on the pSG5-hTIF1 γ vector (a gift from R. Losson, Strasbourg, France) using the QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis kit purchased from Stratagene. Lysines within different consensus sumoylation sites were mutated into arginines and verified by sequencing to generate the sumoylation-deficient TIF1 γ -Mut mutant. N-terminus HA-tagged and flag-tagged TIF1 γ -WT and TIF1 γ -Mut expression vectors were generated using the pSG5-hTIF1 γ vector. To achieve sumoylation directed by the Ubc9-TIF1 γ fusion, the full-length cDNA of human Ubc9 was obtained from the pSG5-Ubc9 plasmid and the PCR product was inserted in an open-reading frame in the pSG5-TIF1 γ expression vector.

Cell culture and transient transfection

Human mammary epithelial cells, immortalized by hTERT and Ras-transformed (HMEC-TR), kindly provided by R. A. Weinberg, have been previously described (Elenbaas *et al*, 2001). Cells were cultured in 1:1 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)/HAMF12 medium (Invitrogen) supplemented with 10% FBS (Cambrex), 1% penicillin-streptomycin, Cambrex), 5 ng/ml human epidermal growth factor (PromoCell), 0.5 μ g/ml hydrocortisone (Sigma) and 10 μ g/ml insulin (Sigma). The MCF10A mammary epithelial cell line was obtained from the American Type Culture Collection. MCF10A cells were cultured in 1:1 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)/HAMF12 medium (Invitrogen) supplemented with 5% horse serum (Cambrex), 1% penicillin-streptomycin (Cambrex), 10 ng/ml human epidermal growth factor (PromoCell), 0.5 μ g/ml hydrocortisone (Sigma) 10 μ g/ml insulin (Sigma) and 100 ng/ml cholera toxin (Sigma). Recombinant TGF β 1 (Peprotech) was used at 5 ng/ml. To block any signaling arising from autocrine production of TGF β , experiments without TGF β were performed using the T β RI kinase inhibitor SB-431542 (Sigma) at 10 μ M for the indicated times. HMEC-TR cells were transiently transfected using

Xtrem-GENE transfection reagents (Roche Applied Science) according to the manufacturer's instructions.

Lentiviral infection

MCF10A cells were infected with the pLVX-based lentiviral vector (Clontech Laboratories) expressing TIF1 γ -WT or TIF1 γ -Mut. Stably knocked down MCF10A cells were generated by lentiviral infection with TIF1 γ shRNA (Open Biosystems). Stably infected cell populations were generated following Puromycin selection (1 μ g/ml) and then cultured in classical medium supplemented with 0.5 μ g/ml Puromycin. TIF1 γ expression levels were assessed by western blotting and RT-qPCR analysis.

Immunofluorescence

Cells were fixed in 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS), permeabilized with 0.4% Triton X-100 in PBS for 5 min, blocked with 3% FBS-5% BSA in PBS for 30 min and subsequently stained with 0.25 mM tetramethyl rhodamine isothiocyanate-conjugated phalloidin (Sigma), anti-E-cadherin (BD Biosciences) or anti-TIF1 γ (Euromedex) antibodies. Cells were incubated with AlexaFluor®488 anti-mouse antibody (Invitrogen) and mounted with media containing Hoescht nuclear stain. Fluorescence was examined by confocal laser scanning microscopy (Carl Zeiss).

His6 pull-down assay

Cells were seeded in 100mm dishes and transfected with expression vectors encoding His6-tagged SUMO-1 and different mutants of TIF1 γ . 48 hours post-transfection, cells were harvested, lysed and sonicated in buffer A (6 M guanidine-HCl; 0.1 M NaH₂PO₄; 0.01 M Tris-HCl, pH 8). His6-tagged SUMO-1 was immobilized by column chromatography using Ni-NTA beads (Qiagen). After four washes in buffer A and three washes in buffer B (8 mM urea; 0.1 M NaH₂PO₄; 0.01 M Tris-HCl, pH 6.5), elution was performed using 120 μ l sample buffer. Supernatants were loaded on SDS-PAGE and immunoblotted with mouse anti-TIF1 γ antibody (Euromedex).

Yeast two-hybrid screen

Automated yeast two-hybrid screens were performed at the DKFZ facility (German Cancer Research Center) as described (Albers *et al*, 2005). Briefly, a library of individually

cloned full-length open reading frames from cDNAs of 10,070 different genes in pGAD424 were screened to a coverage of 6.8 million clones. Yeast strains harboring the bait protein and the prey library were mated in YPDA medium containing 20% PEG 6000 before selection of positive colonies in selective medium containing 0.4 mM 3-amino triazole. Positives were identified by activation of the HIS3 and MEL1 reporters as described, and library inserts were isolated by PCR and analyzed by DNA sequence analysis. The *middle* domain of TIF1 γ used as bait was expressed from the pGBT9 vector (Clontech). Among 65 positive clones, Ubc9 was isolated 21 times in interaction pairs with the bait.

Immunoprecipitation and Western Blotting analysis

For protein-protein interactions, cells were transfected with expression vectors encoding flag-tagged Smad2, flag-tagged Smad3, flag-tagged Smad4, HA-tagged TIF1 γ -WT, HA-tagged TIF1 γ -Mut, flag-tagged TIF1 γ , TIF1 γ , Ubc9 and/or His6-SUMO1. 48 hours post-transfection, cells were treated or not for 2h with TGF β 1 (5 ng/ml) and lysed in RIPA lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5; 100 mM NaCl; 1% NP40; 0.25% NaDeoxycholate; 1 mM EDTA) supplemented with protease and phosphatase inhibitors (Roche) and 10 mM N-ethylmaleimide. 500 μ g of total extracts were pre-cleared with protein A-protein G agarose beads (FastFlow, Millipore) for 10 minutes at 4°C. Pre-cleared extracts were incubated overnight at 4°C with agitation with 2 μ g of rabbit anti-flag antibody (Sigma) to form immune complexes. Immunoprecipitation was completed by incubation with protein A-protein G agarose beads during 1 hour at 4°C under agitation, followed by three washes of 5 min at 4°C under agitation in the same buffer. Beads were recovered with 60 μ l sample buffer and supernatants were loaded on SDS-PAGE gels, followed by Western transfer and immunoblotting as described in the Figures. Mouse monoclonal anti-flag antibody (EL1B11, Euromedex), mouse monoclonal anti-HA antibody (12CA5, Roche), rabbit polyclonal anti-Ubc9 antibody (#10759, SantaCruz), mouse monoclonal anti-Smad4 B8 antibody (#7966, SantaCruz), rabbit polyclonal anti-TIF1 γ antibody (A301-060A, Bethyl), rabbit polyclonal anti-SUMO-1 antibody (SantaCruz), mouse monoclonal anti-TIF1 γ antibody (TIF3E9, Euromedex) were used for immunoblotting. Mouse monoclonal anti-GAPDH antibody (Covalab) was used for loading controls. Peroxidase-linked anti-mouse (P0260, Dako) and anti-rabbit (P0448, Dako) secondary antibodies and ECL detection reagents (Roche) were used according to the manufacturer's instructions.

Transcription Reporter Assays

HMEC-TR cells were plated in 24-well plates and then co-transfected with 150 ng of pGL3(CAGA)₉-Luc (Dennler *et al*, 1998) luciferase construct and 100 ng of the indicated expression vectors constructs. The pRL-SV40 vector (10 ng; Promega) was used as internal control for transfection efficiency. When increasing amounts of expression vectors were transfected, the amount of transfected vectors was kept constant (260 ng) by addition of an empty vector (pSG5) to the transfection mixture. After transfection, cells were cultured for an additional 24h in complete medium with SB-431542 or TGFβ1. Transfected cells were then washed and collected. Luciferase activity was measured in equivalent amounts of each lysate using the dual luciferase kit (Promega). In all experiments, luciferase firefly activity was normalized to the *Renilla* luciferase activity of the pRL-SV40 vector. Experiments were performed in triplicate and each experiment was repeated at least three times.

Chromatin immunoprecipitation

HMEC-TR cells were transfected with 3 μg of PAI-I promoter (p800-Luc) in 100-mm culture dishes and treated with SB-431542 or TGFβ1 for the indicated times. The chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay was carried out using the ChIP assay kit from Upstate Biotechnology. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-Smad4 (rabbit polyclonal, SantaCruz) or anti-TIF1γ (rabbit polyclonal, Bethyl laboratories) and rabbit IgG (Abcam) was used as a negative control. Following reverse cross-linking, DNA was treated with proteinase K and purified using the Nucleospin Tissue XS kit (Macherey-Nagel). Smad4- or TIF1γ-precipitated genomic DNA was subjected to PCR. The 351 bp PAI-1 promoter region harboring the Smad-binding elements (SBE) was amplified with the forward primer 5'-AGCCAGACAAGGTTGTTG-3' and the reverse primer 5'-GACCACCTCCAGGAAAG-3. An unrelated genomic DNA sequence (corresponding to an actin allele) was amplified with primers 5'-AGCCATGTACGTTGCTATCCAG-3' and 5'-CTTCTCCTT-AATGTCACGCACG-3'. In order to quantify the levels of Smad4 and TIF1γ at the PAI-1 promoter, we next carried out real-time quantitative PCR on the immunoprecipitated DNA and the inputs. Results are presented as "percent input" values, calculated to quantify the abundance of the DNA fragment of interest added to the ChIP reaction relative to the abundance of the DNA fragment found in the final immunoprecipitate.

Boyden chamber migration assay

Cell migration assays were performed in FluoroBlok 96-Multiwell Insert plates (BD Falcon) with an 8 µm pore-size PET membrane. Stably infected MCF10A cells (empty vector, shTIF1γ, TIF1γ-WT and TIF1γ-Mut) were pre-treated with SB-431542 or TGFβ1 for 48h. Cells were cultured in serum-free medium 12h before the cell migration assay. 1.25×10^4 cells were plated in the upper chamber in serum-free medium and medium with 5% serum was used as a chemo-attractant in the lower wells. The plates were incubated for 22h at 37°C and migrating cells were stained with 2 µM Calcein AM Fluorescent Dye (Interchim). Cells were counted from random fields from each well under a Zeiss inverted fluorescence microscope. Experiments were performed in triplicate and each set was repeated three times.

RNA preparation and RT-qPCR

Total RNA was extracted using TriReagent (Sigma) and precipitation by isopropanol. RNA (1 µg) was used for complementary DNA synthesis with the SuperScript II Reverse Transcriptase system (Invitrogen). mRNA levels were quantified using the SYBR Green StepOne Plus Real Time PCR system (Applied Biosystems). All values were normalized to the amount of HPRT messenger RNA and expressed relative to the value obtained for TGFβ1-untreated controls. Primer pairs for TGFβ1 target genes (*PAI-1*, *CDH2* and *CDH11*) were used as previously described (Hesling *et al*, 2011).

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from Inserm, CNRS, the Ligue Nationale contre le Cancer (Savoie) and Fondation ARC (Association pour la Recherche sur le Cancer). LF is supported by fellowships from MESR (Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche) and next from Fondation ARC, and CH from INCa (Institut National du Cancer) and next from the Centre Léon Bérard.

We thank S. Borel and C. Languilaire for excellent technical assistance. The authors thank Dr Emmanuel Käs (LBME, CNRS/Université Paul Sabatier, Toulouse) for help in writing this manuscript, and S. Sentis and J. Lopez for helpful discussion.

AUTHORS CONTRIBUTIONS

Conceived and designed the experiments: RR, GG, CH

Performed the experiments: LF, ASA, BB, LJ, IM, IT, CH

Analysed the data: RR, LF, ASA, BB, LJ, IM, CH, GG

Wrote the paper: RR, LF

COMPETING INTERESTS

The authors of this work declare that they have no competing interests.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. SUMO modification of TIF1 γ . (A) HMEC-TR cells were transfected with either TIF1 γ expression vector alone or in combination with His6-tagged SUMO-1, Ubc9 or PIAS1 expression vectors. Cell lysates were subjected to His6 pull-down assay with Ni-NTA beads and immunoblotted with anti-TIF1 γ antibody. (B) Cells lysates of HMEC-TR cells transfected with TIF1 γ and Ubc9 were immunoprecipitated (IP) and immunoblotted (IB) as indicated. Protein expression was monitored by immunoblot analysis of total cell extracts (Input). (C) Cell lysates of HMEC-TR cells transfected with TIF1 γ and SUMO-1 were immunoprecipitated (IP) and immunoblotted (IB) as indicated. (D) HMEC-TR cells were treated or not with TGF β for the indicated times. Total protein extracts lysed in the presence of 10 mM N-ethylmaleimide were immunoblotted with anti-TIF1 γ antibody. GAPDH was used as a loading control. (E) HMEC-TR cells were transfected with TIF1 γ and SUMO-1 and treated with TGF β as indicated. Total protein extracts were immunoblotted with anti-TIF1 γ antibody. GAPDH loading controls are as above. (F) HMEC-TR cells were treated or not with TGF β for 24h and then with the proteasome inhibitor MG132 for indicated time. Total protein extracts were immunoblotted with anti-TIF1 γ antibody. GAPDH loading controls are as above. (G, H) Cell lysates of HMEC-TR cells transfected with the indicated expression vectors were immunoblotted with anti-TIF1 γ antibody. GAPDH was used as a loading control. SENP-1m is a catalytically inactive mutant of SENP-1 (R630L/K631M). GAPDH loading controls are as above.

Figure 2. Identification of TIF1 γ sumoylation sites. (A) Conservation of the Ψ KxD/E sumoylation motifs in TIF1 γ from various species. The TIF1 γ sequence harboring the SUMO attachment sites was compared between the indicated species. Four conserved SUMO-targeted lysine residues (K) are shown in red. “*” and “:” denote identical or related amino acids, respectively. (B) HMEC-TR cells were transfected with His6-tagged SUMO-1 and TIF1 γ mutants as indicated. Lysates were subjected to a His6 pull-down using Ni-NTA beads and immunoblotted with anti-TIF1 γ antibody. (C) Cell lysates from HMEC-TR cells transfected with the indicated constructs were processed as in B. (D) HMEC-TR cells were transfected with flag-tagged wild-type (TIF1 γ -WT) or the sumoylation-defective mutant (TIF1 γ -Mut) and treated with 20 μ g/ml cycloheximide (CHX) for the indicated times. Protein expression was monitored by immunoblot analysis of total cell extracts using anti-flag antibody. GAPDH was used as a loading control. (E) Band intensities in (D) were quantified

using a densitometer. Data are representative of two independent experiments. (F) HMEC-TR cells were transfected with the indicated constructs. TIF1 γ nuclear localization was visualized by immunofluorescence using an anti-TIF1 γ antibody (magnification x40).

Figure 3. TIF1 γ is SUMO modified in the nucleus. (A) The TIF1 γ NLS: basic amino acids are underlined, the mutated lysine (K1118) is shown in bold. (B) TIF1 γ immunofluorescence in HMEC-TR cells transfected with the indicated constructs. (C) Cell lysates from HMEC-TR cells transfected with indicated constructs were subjected to His6 pull-down using Ni-NTA beads and immunoblotted with anti-TIF1 γ antibody. (D) HMEC-TR cells were co-transfected with the pGL3(CAGA)₉-Luc reporter vector together with the pRL-SV40 internal control vector as well as with the indicated TIF1 γ expression vectors and treated with T β RI kinase inhibitor SB-431542 (SB) or TGF β for 24h. Relative luciferase activity is given in arbitrary units as the mean \pm s.d. of an experiment performed in triplicate, representative of three independent experiments. Protein expression (TIF1 γ , GAPDH) was monitored by immunoblot analysis of total cell extracts.

Figure 4. Lack of sumoylation compromises the ability of TIF1 γ to inhibit Smad complex formation. HMEC-TR cells were transfected with the indicated vectors. 48h post-transfection, cells were treated or not with TGF β for 2h. Lysates were immunoprecipitated (IP) and immunoblotted (IB) as indicated in panels A-F. Protein expression was monitored by immunoblot analysis of total cell extracts (Input).

Figure 5. TIF1 γ sumoylation restricts Smad4 residence on the PAI-1 promoter. HMEC-TR cells were transfected with either empty vector (A), flag-TIF1 γ -WT (B) or flag-TIF1 γ -Mut (C) and treated with SB-431542 (SB) or TGF β for the indicated times. ChIP assays were carried out using anti-Smad4, anti-TIF1 γ or anti-flag antibodies as indicated. Precipitated genomic DNA was subjected to quantitative PCR to amplify the PAI-1 promoter region harboring the Smad-binding elements. (D) HMEC-TR cells were transfected with either empty vector, TIF1 γ -WT or Ubc9-TIF1 γ and treated with SB-431542 or TGF β for indicated time. ChIP assays were carried out using anti-Smad4 antibody. Precipitated genomic DNA was subjected to quantitative PCR to amplify the PAI-1 promoter region harboring the Smad-binding elements. In all panels, results are shown as "percent input" values. Error bars

represent the standard deviation from triplicate samples and each panel is representative of three independent experiments.

Figure 6. TIF1 γ sumoylation regulates TGF β -induced EMT processes. (A) HMEC-TR cells cotransfected with the pGL3(CAGA)₉-Luc reporter vector (known to be driven by the activated Smad complex) together with increasing amounts of either wild-type (WT) or mutated (Mut) TIF1 γ were treated with TGF β for 24h before measurement of luciferase activities. Error bars represent s.d. (n=3). Expression levels of TIF1 γ and GAPDH proteins are shown. (B-D) Stably infected MCF10A cells expressing wild-type (WT) or mutated (Mut) TIF1 γ were treated with SB-431542 (SB) or TGF β for 24h (B) or 96h (C-D). (B) Expression of PAI-1 (serpine 1), CDH2 (N-Cadherin) and CDH11 (OB-Cadherin) was determined by RT-qPCR. Values were normalized to the amount of HPRT mRNA and expressed relative to the value obtained in TGF β -untreated controls (expressed as fold induction by TGF β). Error bars represent s.d. *: p<0,05; **: p<0,01. (C) E-cadherin expression was monitored by immunofluorescence. Scale bars, 26 μ m. DAPI was used for nuclear staining. (D) The subcellular localization of actin was detected by imaging phalloidin-TRITC. Scale bars, 26 μ m. (E) Stably transfected MCF10A cells inactivated for TIF1 γ (sh-TIF1 γ) or expressing WT (TIF1 γ -WT) or mutated TIF1 γ (TIF1 γ -Mut) were treated with SB-431542 or TGF β for 48h prior to performing the Boyden chamber migration assay. 5% serum was used as a chemo-attractant during 22h. Migrating cells were stained with Calcein AM and counted from random fields. Error bars represent s.d. The experiment shown is representative of three separate experiments performed in triplicate.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

to

TIF1 γ requires sumoylation to exert its repressive activity on TGF β signaling

SUPPLEMENTARY FIGURES

Supplementary Figure S1. Identification of TIF1 γ sumoylation sites. Lysates from HMEC-TR cells transfected with His6-tagged SUMO-1 and with the indicated TIF1 γ mutants were subjected to His6 pull-down assays using Ni-NTA beads and immunoblotted with anti-TIF1 γ antibody.

Supplementary Figure S2. Validation of stably infected MCF10A cells. (A) Phase-contrast images of MCF10A cells stably infected with empty lentiviral vector, vector encoding shRNA directed against TIF1 γ , or expression vectors for TIF1 γ -WT or TIF1 γ -Mut (magnification x10). TIF1 γ expression levels were assessed by western blotting (B) and RT-qPCR analysis (C). GAPDH was used as a loading control. Values were normalized to the amount of HPRT mRNA. Error bars represent the standard deviation from triplicate samples, panel C is representative of three independent experiments.

Figure 1

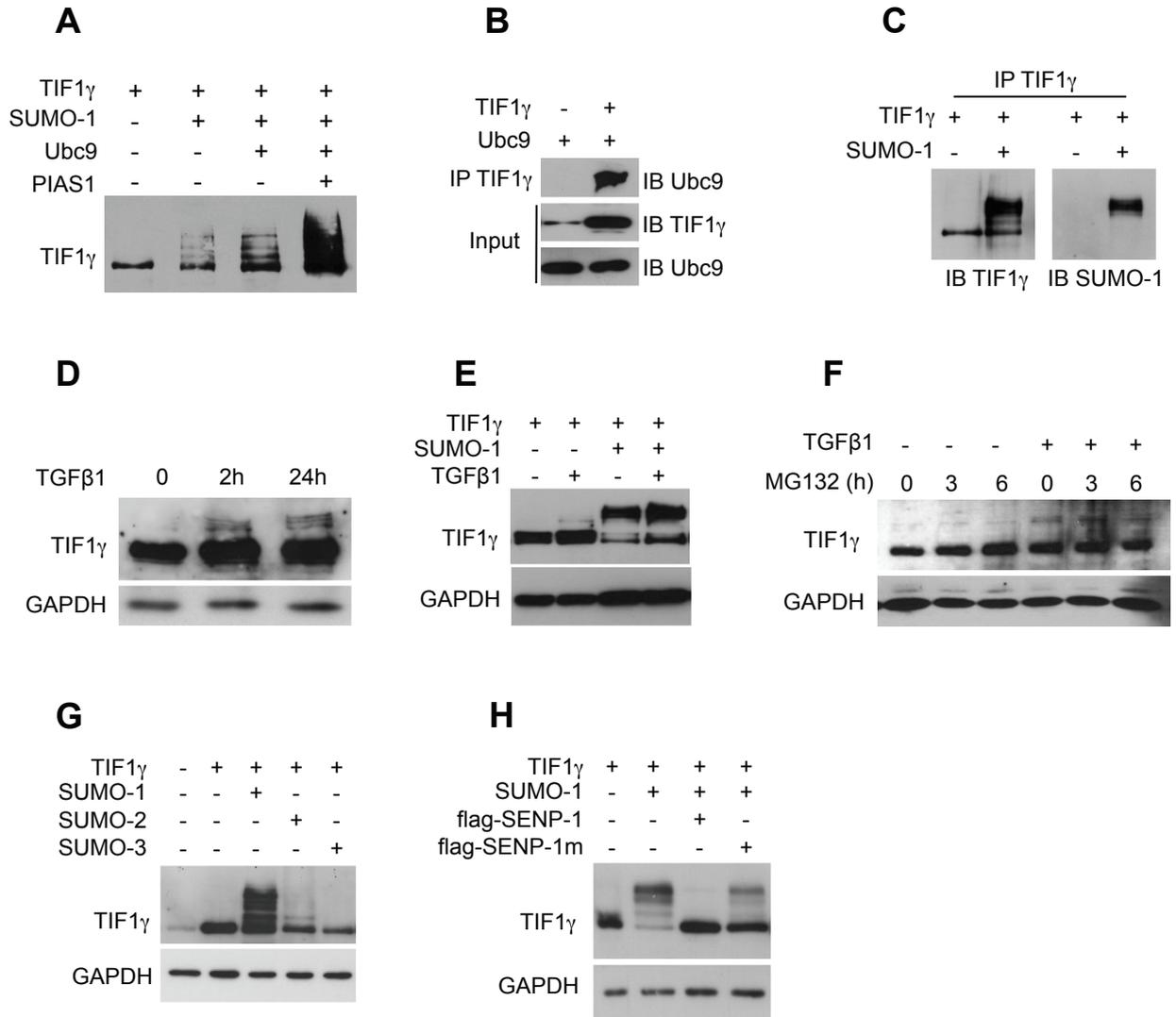


Figure 2

A

Human 769 KSDQVKVKQEPGTEDEICSFSGGVKQEKTEGDGRRSACMLSSPESSLTPPLSTNLHLESELDALASLENHVKTEPADMNESCK 850
 Mouse 782 KSDQVKVKQEPGTEEEICSFSGAVKQEKTEGDGRRSACMLSSPESSLTPPLSTNLHLESELDTLTGLENHVKTEPTDISESCK 863
 Chicken 628 KSDQVKVKQEPGTEEEICSFSGAVKQEKTEGDGRRSACMLSSPESSLTPPLSTNLHLESELEALGLENHVKTEPGDLSSECK 711
 Xenopus 708 KSDPVKVKQEPGTEEEVCSFSGPVKQEKAEFDGRRSACMLSSPESSLTPPLTTNVHLETDLESALAELENHVKTEPNNTSQSCR 811
 *** *****:;:***** ***** *****:;:*****:;: * ***** : **:

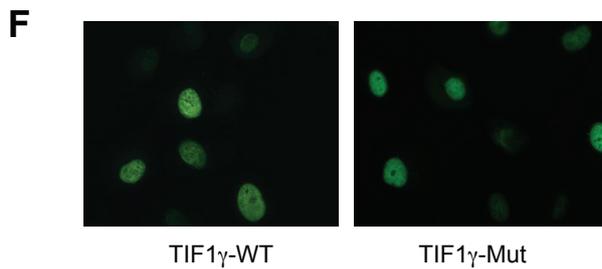
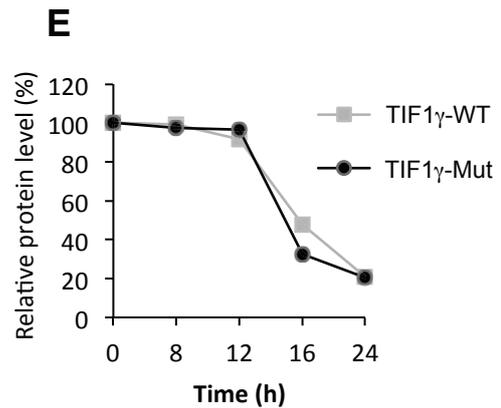
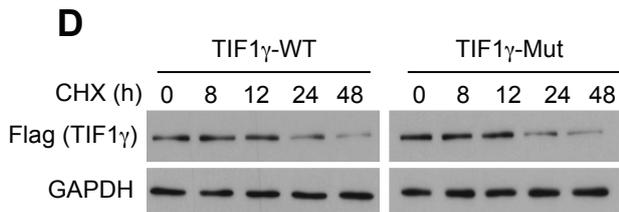
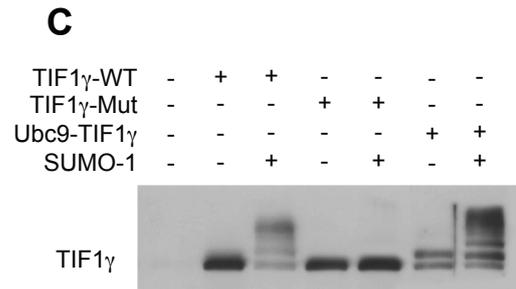
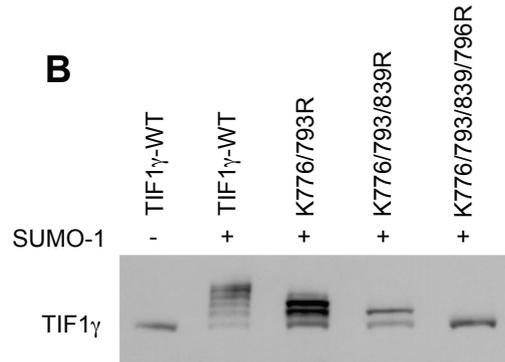
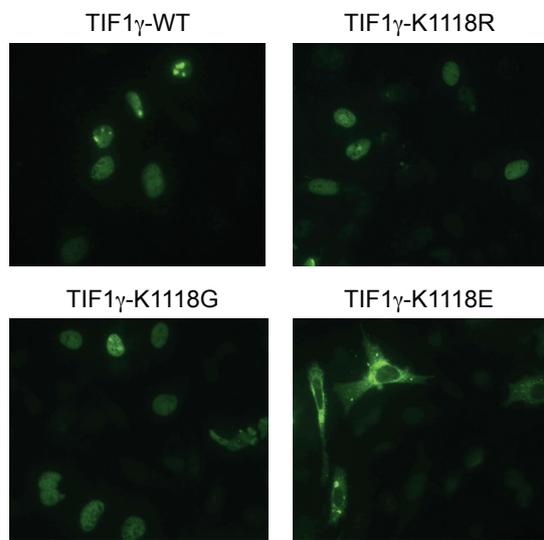


Figure 3

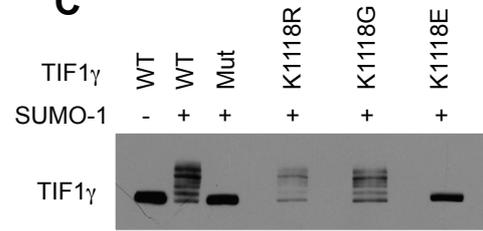
A

1110 - IQPRRKRLKSDERPVIK - 1127

B



C



D

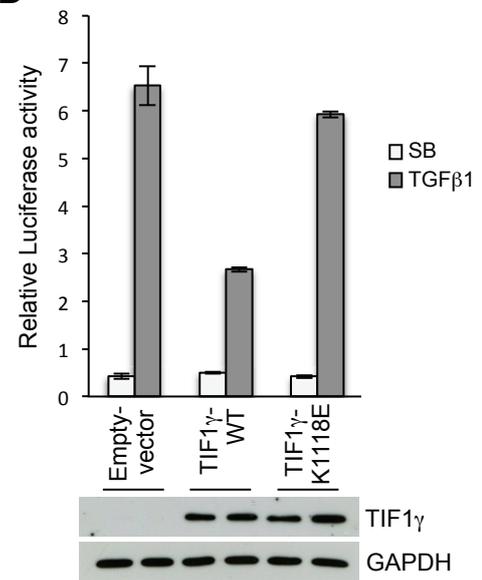


Figure 4

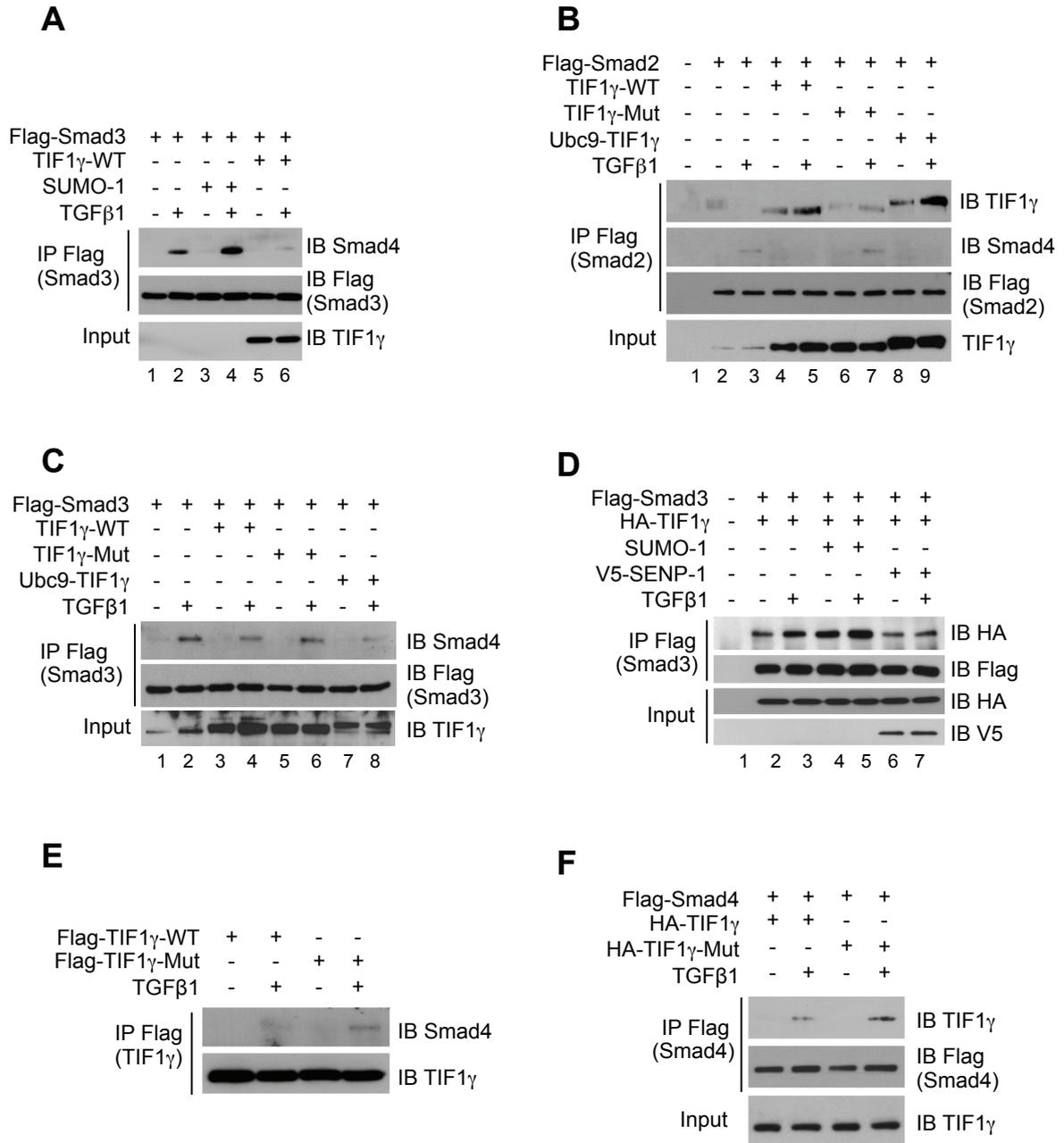


Figure 5

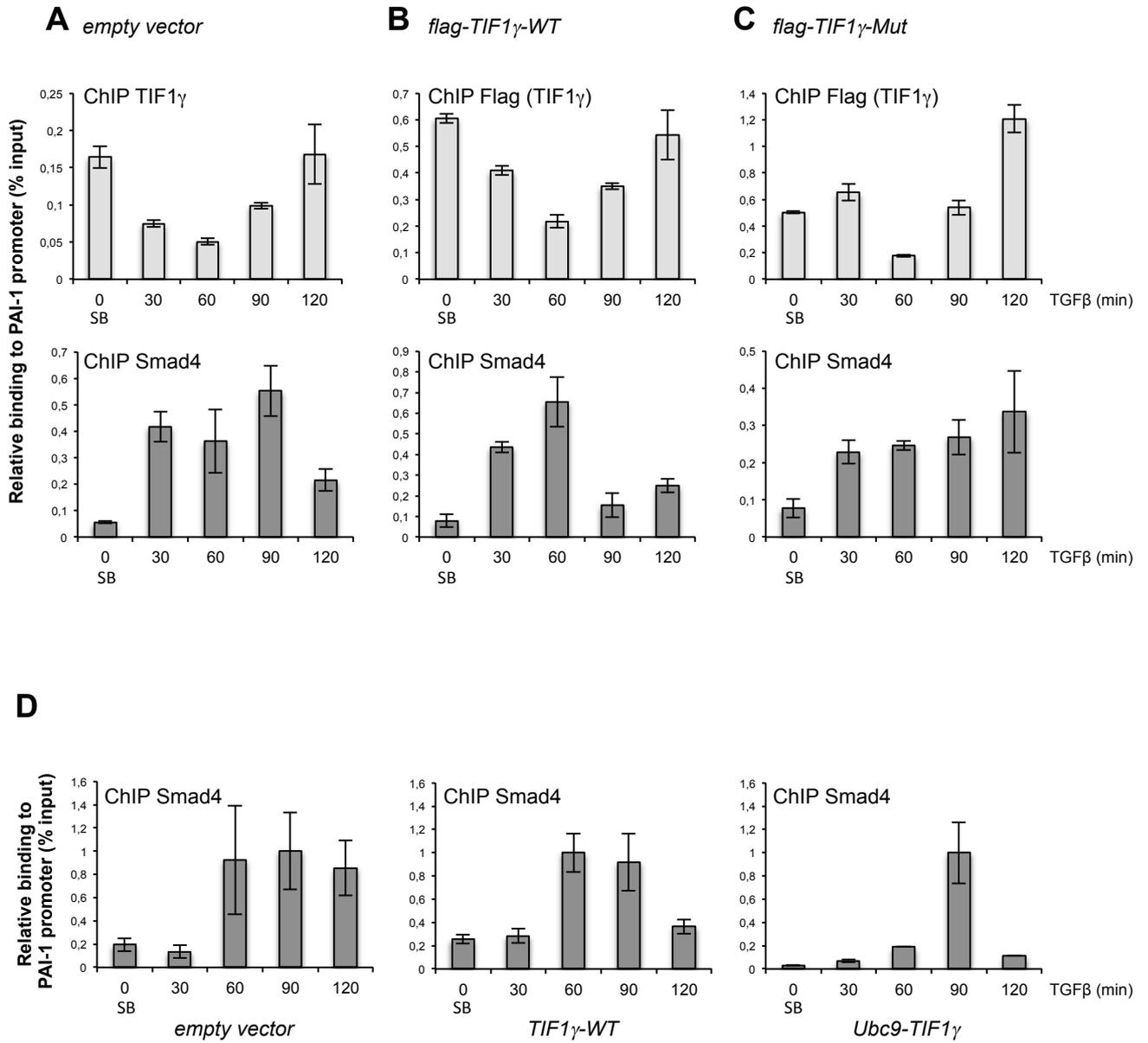


Figure 6

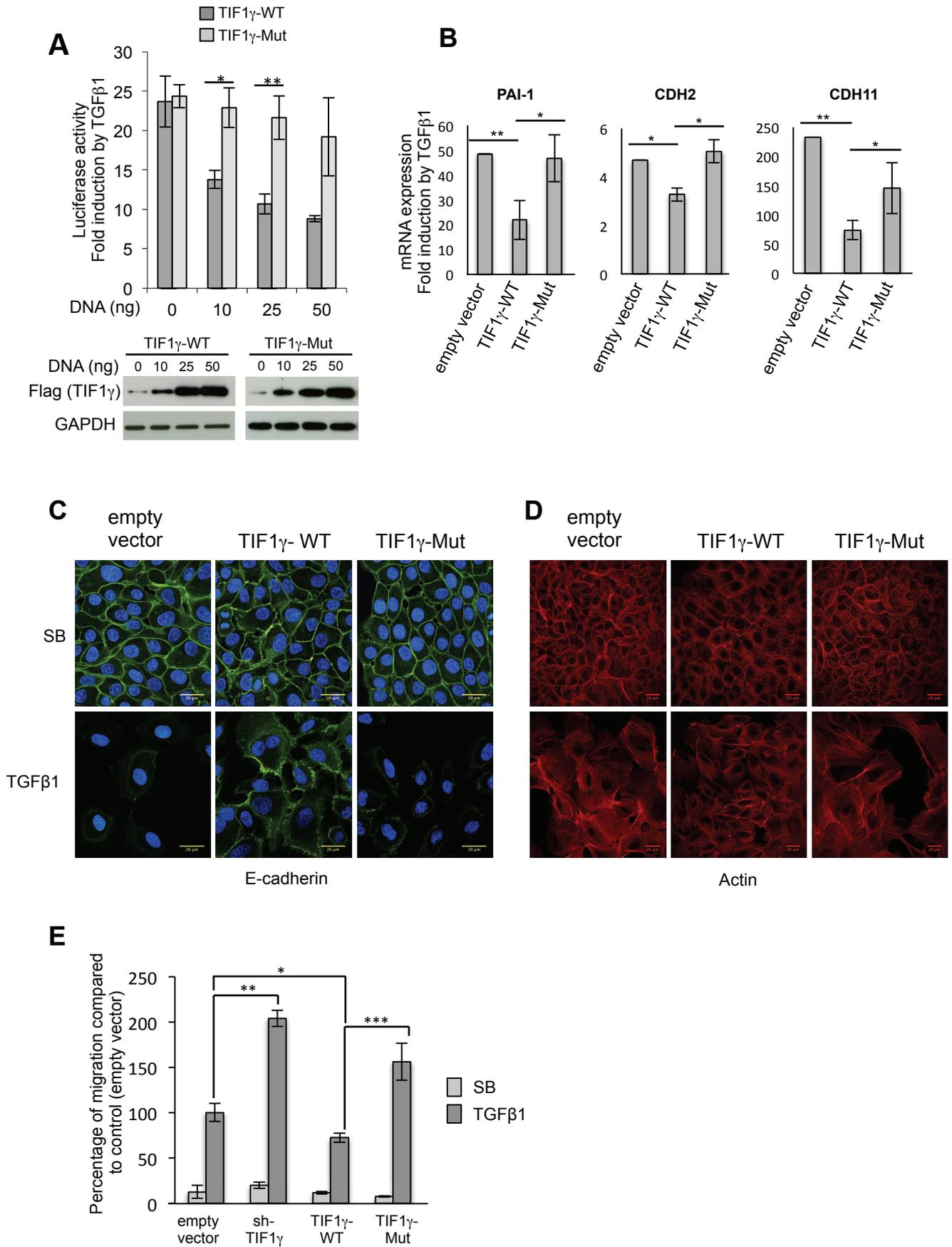


Figure S1

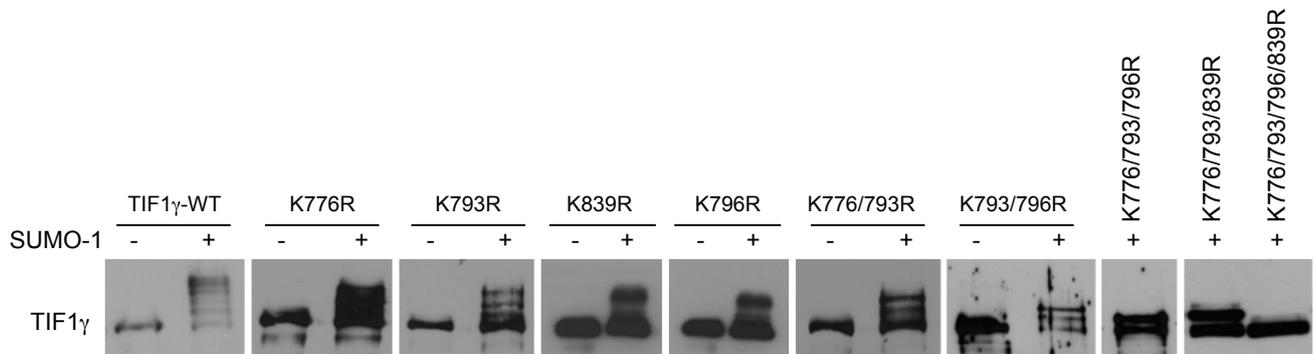
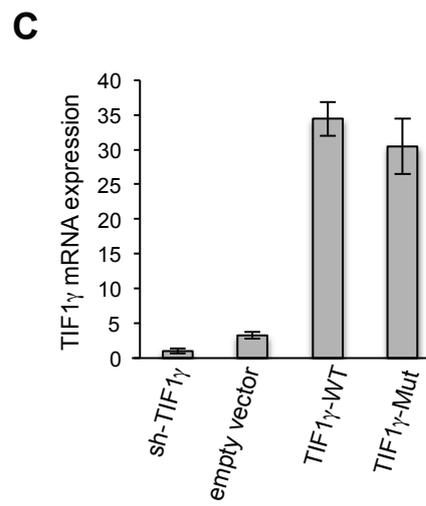
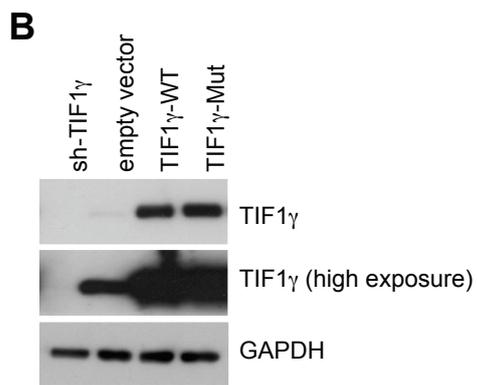
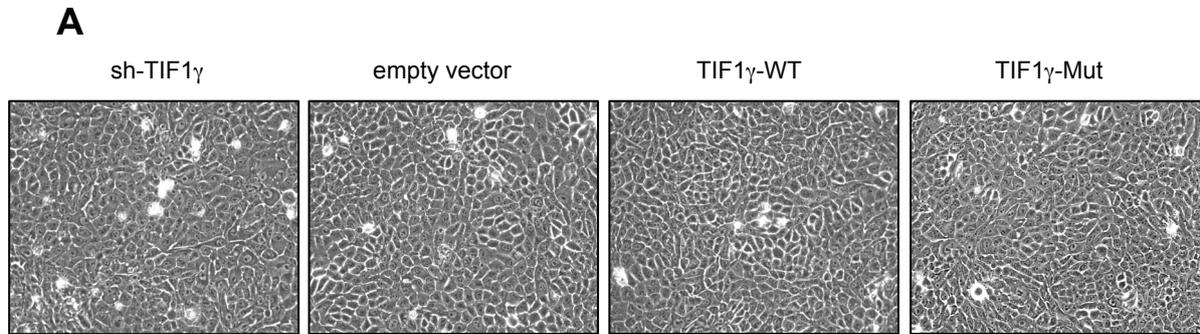


Figure S2



Article 4 : TIF1 γ is essential for the terminal differentiation of mammary alveolar epithelial cells and for lactation through Smad4 inhibition

Résumé

La voie de signalisation du TGF β joue un rôle important au cours du développement embryonnaire et de la vie adulte. Le développement de la glande mammaire est un processus complexe qui débute pendant la vie fœtale et continue jusqu'à la grossesse. Différentes hormones et facteurs de croissance contrôlent le développement de la glande mammaire, comme la Prolactine (PRL), produite au niveau de l'hypophyse, qui va notamment réguler la production des protéines du lait au cours de la lactation. Le développement de la glande mammaire est également régi par une cinétique précise d'expression du TGF β qui, notamment au cours de l'involution, est fortement exprimé pour inhiber l'expression des protéines du lait et activer une apoptose massive des structures sécrétrices.

Le développement de la glande mammaire chez la souris débute au jour embryonnaire E11 par l'invagination de l'ectoderme dans le mésoderme ventral sous-jacent. Ensuite un bourgeon mammaire se forme au jour E15 et son élongation donne naissance au tissu adipeux mammaire primitif composé d'une dizaine de branches. À la puberté, la combinaison des hormones ovariennes déclenche le développement de bourgeons terminaux (TEB pour Terminal End Bud) qui envahissent rapidement le tissu adipeux. La glande mammaire adulte subit des cycles de prolifération, de différenciation et d'apoptose, en réponse aux changements hormonaux. La gestation induit la différenciation des cellules épithéliales productrices de lait et des structures lobulo-alvéolaires le long des canaux pré-existants. La lactation est alors possible grâce à une glande mammaire fonctionnelle organisée de manière à produire et sécréter du lait. Après sevrage, la glande mammaire revient à un état quiescent grâce à un processus appelé involution, caractérisé par une apoptose massive des structures lactogènes et un remodelage intense de la matrice.

L'importance de la voie de signalisation du TGF β dans le développement mammaire a été montrée dès 1987 grâce à des implants contenant du TGF β utilisé dans le tissu adipeux mammaire de souris vierges (Silberstein & Daniel, 1987). Ces implants inhibent la croissance des bourgeons terminaux et leur progression dans le tissu adipeux pendant la puberté, et ainsi empêchent l'élongation des canaux (Figure 20, panel 1). Ensuite il a été montré que cet effet anti-prolifératif du TGF β est réversible, spécifique des cellules épithéliales et qu'il n'a aucun

effet sur la prolifération des cellules stromales (Daniel *et al*, 1989). Le laboratoire de Robinson a montré que les niveaux d'expression des différentes isoformes de TGF β augmentent au cours de la gestation et chutent drastiquement au moment de la lactation (Robinson *et al*, 1991). Les patterns d'expression des différents TGF β suggèrent un rôle important du TGF β dans la régulation de la morphogenèse des canaux, de la lactation et de l'involution. De nombreux modèles murins ont confirmé le rôle crucial du TGF β dans le développement de la glande mammaire. En particulier, plusieurs études ont montré que des souris hétérozygotes pour le TGF β 1 dans l'épithélium mammaire (exprimant seulement 10% du TGF β 1 par rapport aux individus sauvages) présentent une prolifération accrue des structures lobulo-alvéolaires (Ewan *et al*, 2002). Ces résultats sont en corrélation avec des précédentes données obtenues grâce à la génération de souris exprimant un mutant dominant négatif de T β RII sous le contrôle du promoteur MMTV (Gorska *et al*, 1998). Cette stratégie d'inhibition de la voie du TGF β a mis en évidence une hyperplasie alvéolaire associée à une différenciation terminale précoce, reliant ainsi la voie de signalisation du TGF β à la régulation de la réponse des cellules épithéliales mammaires *in vivo*. Cela a été confirmé par l'étude de souris transgéniques surexprimant le TGF β 1 dans l'épithélium mammaire et présentant un phénotype hypoplastique, associé à un taux de prolifération de l'épithélium mammaire fortement réduit par rapport aux souris sauvages (Pierce *et al*, 1995). De plus, des expériences de transplantation, mettant en évidence que la communication entre le stroma et l'épithélium est cruciale pour le développement de la glande mammaire (Crowley *et al*, 2005), montrent que le TGF β est important pour réguler les branchements latéraux des canaux grâce à son action sur le stroma (Ewan *et al*, 2002) (Figure 20, panel 2). Il a également été montré que le TGF β inhibe la formation et la différenciation des bourgeons alvéolaires nécessaires à la lactation (Robinson *et al*, 1991) (Figure 20, panel 3). Enfin, la génération de souris inactivées pour T β RII spécifiquement dans les cellules épithéliales mammaires montrent que le TGF β joue un rôle majeur en régulant l'apoptose de l'épithélium alvéolaire au cours du processus d'involution (Bierie *et al*, 2009) (Figure 20, panel 5).

La physiologie de la glande mammaire est donc régie de manière très importante par le TGF β dont le rôle est d'inhiber le développement des bourgeons terminaux à la puberté, de contrôler le développement des branchements latéraux chez la souris mature, d'empêcher le développement alvéolaire et la production précoce de lait pendant la gestation et de déclencher l'apoptose massive des structures alvéolaires au moment de l'involution.

La signalisation du TGF β a donc un rôle crucial dans le développement de la glande mammaire. La protéine Smad4 étant le médiateur central de ces effets du TGF β au cours du développement de la glande mammaire, nous nous sommes intéressés à caractériser l'implication de TIF1 γ , connu pour être un répresseur des fonctions de Smad4, dans la régulation de l'interaction entre les voies de signalisation du TGF β et de PRL au cours du développement de la glande mammaire.

Au cours de notre travail, nous avons tout d'abord analysé l'expression de la protéine TIF1 γ pendant le développement de la glande mammaire par immunohistochimie. De manière très intéressante, le pattern d'expression de TIF1 γ est quasiment symétriquement opposé au pattern d'expression du TGF β , suggérant un rôle important dans la régulation de la voie du TGF β au cours du développement de la glande mammaire. Nous avons généré des souris dans lesquelles l'expression de TIF1 γ est inactivée spécifiquement dans la glande mammaire grâce à l'utilisation d'une Cre recombinase dont l'expression est contrôlée par les promoteurs MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus) ou WAP (Whey Acidic Protein). Nous avons alors pu montrer que la perte de TIF1 γ n'affecte pas le développement des canaux chez les souris vierges mais inhibe de manière très importante la production de lait durant la lactation, causant la mort de la portée. L'étude de la morphologie des glandes mammaires des souris TIF1 $\gamma^{-/-}$ a révélé une absence de développement et de différenciation des structures lobulo-alvéolaires sécrétrices de lait ainsi qu'une baisse de l'expression des gènes codant les protéines du lait. Nous avons confirmé ces résultats avec des expériences de différenciation *in vitro* sur la lignée épithéliale mammaire murine HC11.

La voie de signalisation de PRL passe par l'activation de la voie JAK2/STAT5. La voie du TGF β est connue pour inhiber la phosphorylation de STAT5 via la voie canonique des Smads. Nous avons démontré que l'effet de l'inactivation de TIF1 γ sur la lactation passe par la levée de la répression des fonctions de Smad4. L'inhibition de la phosphorylation de STAT5, associée au défaut de développement et de différenciation des structures lobulo-alvéolaires observé dans les souris déficientes pour TIF1 γ , dépend donc du signal apporté par le TGF β dépendant de Smad4.

En conclusion, la protéine TIF1 γ joue un rôle important dans la régulation des interactions entre les voies de signalisation du TGF β et de PRL en inhibant les fonctions de Smad4 dans le but de contrôler la phosphorylation de STAT5 et l'activation des gènes cibles de la PRL. L'expression de TIF1 γ en fin de grossesse et durant la lactation contribuerait donc

à inhiber Smad4 pour empêcher toute activité provenant du signal TGF β résiduel et ainsi permettre le développement lobulo-alvéolaire et la lactation.

TIF1 γ IS ESSENTIAL FOR THE TERMINAL DIFFERENTIATION
OF MAMMARY ALVEOLAR EPITHELIAL CELLS AND FOR
LACTATION THROUGH SMAD4 INHIBITION

HESLING Cédric*, LOPEZ Jonathan*, FATTET Laurent, GONZALO Philippe,
TREILLEUX Isabelle, BLANCHARD Daphné, LOSSON Régine, GOFFIN Vincent, PIGAT
Natasha, PUISIEUX Alain, MIKAELIAN Ivan, GILLET Germain & RIMOKH Ruth

Development,

2012

(* co-auteurs)

Development 140, 167-165 (2013) doi:10.1242/dev.085068
 © 2013. Published by The Company of Biologists Ltd

Tif1 γ is essential for the terminal differentiation of mammary alveolar epithelial cells and for lactation through SMAD4 inhibition

Cédric Hesling^{1,*}, Jonathan Lopez^{1,2,3,*}, Laurent Fattet¹, Philippe Gonzalo^{1,2,3}, Isabelle Treilleux¹, Daphné Blanchard¹, Régine Losson^{4,‡}, Vincent Goffin⁵, Natascha Pigat⁵, Alain Puisieux^{1,2}, Ivan Mikaelian^{1,2}, Germain Gillet^{1,2} and Ruth Rimokh^{1,2,§}

SUMMARY

Transforming growth factor β (TGF β) is widely recognised as an important factor that regulates many steps of normal mammary gland (MG) development, including branching morphogenesis, functional differentiation and involution. Tif1 γ has previously been reported to temporally and spatially control TGF β signalling during early vertebrate development by exerting negative effects over SMAD4 availability. To evaluate the contribution of Tif1 γ to MG development, we developed a Cre/LoxP system to specifically invalidate the *Tif1g* gene in mammary epithelial cells *in vivo*. *Tif1g*-null mammary gland development appeared to be normal and no defects were observed during the lifespan of virgin mice. However, a lactation defect was observed in mammary glands of *Tif1g*-null mice. We demonstrate that Tif1 γ is essential for the terminal differentiation of alveolar epithelial cells at the end of pregnancy and to ensure lactation. Tif1 γ appears to play a crucial role in the crosstalk between TGF β and prolactin pathways by negatively regulating both PRL receptor expression and STAT5 phosphorylation, thereby impairing the subsequent transactivation of PRL target genes. Using HC11 cells as a model, we demonstrate that the effects of *Tif1g* knockdown on lactation depend on both SMAD4 and TGF β . Interestingly, we found that the Tif1 γ expression pattern in mammary epithelial cells is almost symmetrically opposite to that described for TGF β . We propose that Tif1 γ contributes to the repression of TGF β activity during late pregnancy and prevents lactation by inhibiting SMAD4.

KEY WORDS: Tif1 γ (Trim33), TGF β , SMAD4, STAT5, Lactation, Mouse

INTRODUCTION

The development of the mammary gland (MG) is a complex process, beginning during fetal life and continuing until pregnancy. At birth, a rudimentary ductal structure forms within the fat pad. During puberty, rapid ductal growth and branching morphogenesis are induced by cyclic production of ovarian hormones. By contrast, during pregnancy, the MG is characterised by the development of lobuloalveolar structures along the existing ductal tree. At the end of pregnancy, alveolar epithelial cells are terminally differentiated and acquire the capacity to synthesise milk components (Hennighausen and Robinson, 2005). Various steroids, polypeptides, hormones and growth factors tightly control all the steps of mammary growth and development. Among them, the lactogenic hormone prolactin (PRL) and the transforming growth factor β (TGF β) family members play crucial antagonistic roles in the lactation process.

The PRL polypeptide hormone is required for lobuloalveolar formation and functional differentiation of alveolar epithelial cells, allowing the MG to synthesise milk proteins. At parturition, the transition from late-pregnancy to lactation, referred to as the

secretory step, is stimulated by a rise in PRL and a decrease in serum progesterone. Copious production of milk during lactation is stimulated and maintained by PRL, which induces expression of milk protein genes, including β -casein, α -lactalbumin and lipid biosynthetic enzymes. Prolactin also maintains the viability of mammary epithelial cells (MECs) throughout lactation and until weaning (Kelly et al., 1991; Guyette et al., 1979). At the beginning of involution, suckling stops and TGF β fulfills its competing effect on PRL functions, inducing cell apoptosis and inhibition of milk protein expression (Jhappan et al., 1993; Nguyen and Pollard, 2000). Binding of PRL to its receptor activates Janus kinase 2 (JAK2) (Argetsinger et al., 1993; Campbell et al., 1994), which in turn phosphorylates STAT transcription factors (Ihle and Kerr, 1995). STAT5A and STAT5B, hereafter referred to as STAT5, are the main STAT proteins that transduce the effects of PRL in the mammary gland. Deletion of STAT5 causes an attenuation of mammary alveolar development and milk secretion (Hennighausen and Robinson, 2005). STAT5 also promotes cell-cycle progression and suppresses apoptosis, thus contributing to cellular transformation (Yu and Jove, 2004). Interestingly, it was recently demonstrated that STAT3 and STAT5 are activated in a high proportion of breast tumours (Diaz et al., 2006) and both have been shown to be mammary oncogenes in the mouse (Barbieri et al., 2010; Vafaizadeh et al., 2010).

During postnatal MG development and pregnancy, the three TGF β isoforms (TGF β 1, TGF β 2 and TGF β 3) are abundantly expressed in mammary alveoli, ducts and fat pad. Upon parturition and during lactation, TGF β is significantly downregulated, whereas all three isoforms are markedly upregulated during involution (Nguyen and Pollard, 2000). In addition to inhibition of ductal and

¹Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Inserm UMR-S1052, CNRS UMR5286, Centre Léon Bérard, Lyon, France. ²Université de Lyon, Lyon, France. ³Fédération de Biochimie Nord – Hôpital de la Croix-Rousse – Hospices Civils de Lyon, Lyon, France. ⁴Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch, France. ⁵Centre de Recherche Croissance et Signalisation, Inserm U845, Paris, France.

*These authors contributed equally to this work

‡Deceased 8 February 2010

§Author for correspondence (ruth.rimokh@lyon.unicancer.fr)

branching morphogenesis during puberty, TGF β also inhibits alveolar formation, disrupts the alveolar structure, inhibits synthesis of milk proteins and induces apoptosis after weaning (Bierie et al., 2009; Serra and Crowley, 2005).

Transcriptional intermediary factor 1 γ (Tif1 γ ; also called ectodermin, Trim33, RFG7 or PTC7) has been recently implicated in the activities promoted by TGF β superfamily pathways. Tif1 γ is a member of the TIF family of transcriptional co-factors. The TIF family is characterised by an N-terminal RING-finger B-box coiled-coil (RBCC/TRIM) motif and a C-terminal bromodomain preceded by a PHD finger (Yan et al., 2004). One study indicates that Tif1 γ acts as a co-factor for phosphorylated SMAD2/3 in competition with SMAD4 to promote an alternative SMAD4-independent TGF β pathway (He et al., 2006). Others studies show that Tif1 γ acts as a repressor of TGF β superfamily responses through mono-ubiquitylation of SMAD4 (Levy et al., 2007; Dupont et al., 2009; Morsut et al., 2010). Recent data suggest a tumour suppressor role in different types of mouse and human tumours, including leukaemia, hepatocellular carcinoma and pancreatic cancer (Vincent et al., 2009; Aucagne et al., 2011; Herquel et al., 2011). By contrast, a recent study has demonstrated that overexpression of Tif1 γ occurs during the early stages of colorectal carcinogenesis, suggesting a role in promoting colorectal cancer (Jain et al., 2011). We recently demonstrated that Tif1 γ can function as a repressor of SMAD4 in the TGF β -induced epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in human mammary epithelial cell lines (Hesling et al., 2011). Because EMT favours metastasis (Thiery et al., 2009), our data suggest that Tif1 γ might interfere with MG tumour progression. These observations raise the important question of the involvement of Tif1 γ in MG development and tumorigenesis, which we have addressed in this work.

As *Tif1g*-null mice are embryonic-lethal at day 9.5 and exhibit a dramatic developmental delay (Kim and Kaartinen, 2008), we used two *in vivo* Cre/LoxP systems that lead to conditional deletion of *Tif1g* in the mammary gland, allowing us to analyse the impact of *Tif1g* inactivation on MG development and function. Using these mouse models and an immortalized mouse epithelial cell line, we demonstrate that *Tif1g* is essential for the terminal proliferation of ducts and differentiation of alveolar epithelial cells. We also show that PRL-induced STAT5 phosphorylation is inhibited upon inactivation of *Tif1g*, an effect that depends on the TGF β /SMAD pathway. Taking these results together, we propose that Tif1 γ , as a negative regulator of SMAD4 function, could be a crucial factor that regulates the crosstalk between PRL and TGF β signalling during MG development.

MATERIALS AND METHODS

Generation of *Tif1g*-deficient mice in the mammary gland

Tif1g^{flox/flox} mice harbouring floxed exons 2-4 have been previously described (Morsut et al., 2010). These mice were mated with Mouse Mammary Tumor Virus-Cre (MMTV-Cre) [Tg(MMTV-cre)4-MamJ, stock 003553] or Whey Acidic Protein-Cre (WAP-Cre) [B6.Cg-Tg(WapCre)11738Mam, strain number 01XA8] transgenic mice to generate MMTV- and WAP-Cre/*Tif1g*^{mammary-flox-deleted/+} (*Tif1g*^{md/+}). Heterozygous mice were then mated together to generate MMTV- and WAP-Cre/*Tif1g*^{md/md}, Cre/*Tif1g*^{md/+} and Cre/*Tif1g*^{+/+}. This mating scheme allowed us to generate the MMTV- and WAP-Cre/*Tif1g*^{+/+} control mice. To study lactation defects, MMTV- and WAP-Cre/*Tif1g*^{md/md}, *Tif1g*^{md/+} and *Tif1g*^{+/+} females were mated with wild-type males. Mice were housed and bred in the AniCan pathogen-free animal facility (Centre Léon Bérard, Lyon, France). Experiments were performed in accordance with the animal care guidelines of the European Union and French laws and were validated by the local Animal Ethics Evaluation Committee (CECCAPP).

Genotyping analysis

Offspring were genotyped by PCR performed on genomic tail DNA extracted using standard procedures. The genotype of *Tif1g* floxed mice was determined by multiplex PCR using three different primers in the same reaction (A, 5'-GGTAGTACTTGTATGGAGGT-3'; B, 5'-GGTAAGTCAGCAAGAGCTCA-3'; and C, 5'-AGCTCTGGAGGAACGTCGTC-3'). The wild-type and floxed *Tif1g* alleles were detected using primers A and B located on either side of the LoxP insertion. These primers amplify a 498 bp fragment in wild-type mice and a 531 bp fragment from the floxed allele. The deleted allele was detected using primers C and B. This primer pair amplifies a 360 bp fragment from the deleted allele but yields no amplification products from the floxed and wild-type alleles. MMTV-Cre and WAP-Cre recombinase transgenes were also detected by PCR using primers 5'-TGCCACGACCAAGTGACAGC-3' and 5'-CCAGGT-TACGGATATAGTTCATG-3' located within Cre recombinase sequences. The MMTV-Cre and WAP-Cre transgenes produce a 675 bp fragment. All products were separated in 2% agarose gels.

Whole-mount and histological analysis

For each developmental stage, mice were sacrificed by cervical dislocation and the fourth inguinal gland was collected and fixed in 10% neutral buffered formalin for at least 2 hours. Haematoxylin-stained wholemounts were prepared as previously described (Robinson et al., 1991) and were examined for ductal outgrowth using a microscope-mounted camera. For histological analysis, dissected mammary glands were fixed in 10% neutral buffered formalin, embedded in paraffin wax, sectioned (5 μ m), and stained with Haematoxylin and Eosin. Immunohistochemical analysis was performed as previously described (Razanajaona et al., 2007) using anti-Tif1 γ (TIF-3E9, Euromedex) or anti-pSTAT5 (C11C5, Cell Signaling) antibodies. After washing in PBS, a biotinylated secondary antibody bound to a streptavidin-peroxidase conjugate (LSAB+ kit, Dako) was added. The bound antibody was revealed with 3,3'-diaminobenzidine. Slides were counterstained with Haematoxylin after washing.

PRL quantification in serum

Intra-cardiac blood was collected from mice on day 2 of lactation. Sera were collected after blood coagulation followed by a 10-minute centrifugation at 500 *g*. Serum prolactin (PRL) was quantified using the RayBio Mouse Prolactin ELISA kit according to the manufacturer's instructions (RayBiotech).

Quantitative RT-PCR analysis

Total RNA (1 μ g) was used for cDNA synthesis using the SuperScript II Reverse Transcriptase system (Invitrogen). mRNA levels were quantified using the SYBR Green StepOne Plus Real Time PCR system (Applied Biosystems) and normalized relative to mouse hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT). Quantification of gene expression was performed using the comparative $\Delta\Delta$ CT method. Primers used for each gene are: *Tif1g* and HPRT (Hesling et al., 2011); β -casein (5'-ACAGCTGCAGGCAGAGGAT-3'; 5'-GAATGTTGTGGAGTGGCAGG-3'); α -lactalbumin, (5'-TCTGTGGCATCTCCTGTGACAAGT-3'; 5'-TGGGCTTGAGGCTTCCAGTAGT-3'); mPRLR total (5'-GTGG-AATCCTGGGTTCAGATG-3'; 5'-GGGCCACTGGTTTTGTAGTC-3'); and mPRLR long isoform (5'-ATAAAAGGATTTGATACTCATCTGCTAGAG-3'; 5'-TGTCATCCACTCCAAGAACTCC-3').

In vitro differentiation of HC11

Mouse mammary epithelial cell line HC11 was routinely maintained in RPMI 1640 medium containing 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 5 μ g/ml bovine insulin (Sigma-Aldrich) and 10 ng/ml human recombinant epidermal growth factor (EGF; Upstate Biotechnology). To induce cell differentiation, confluent cell cultures, deprived of EGF for 24 hours, were treated with lactogenic hormone mix (DIP: 1 μ M dexamethasone (Sigma-Aldrich), 5 μ g/ml insulin and 5 μ g/ml mouse recombinant PRL) for the indicated time. Mouse PRL was produced following in-house routine protocols and its activity was validated using a classical STAT5 reporter luciferase gene assay (Bernichtein et al., 2003). In some experiments, cells were pretreated with TGF β 1 (5 ng/ml, Peprotech) or SB-431542 (10 μ M, TGF β type I receptor

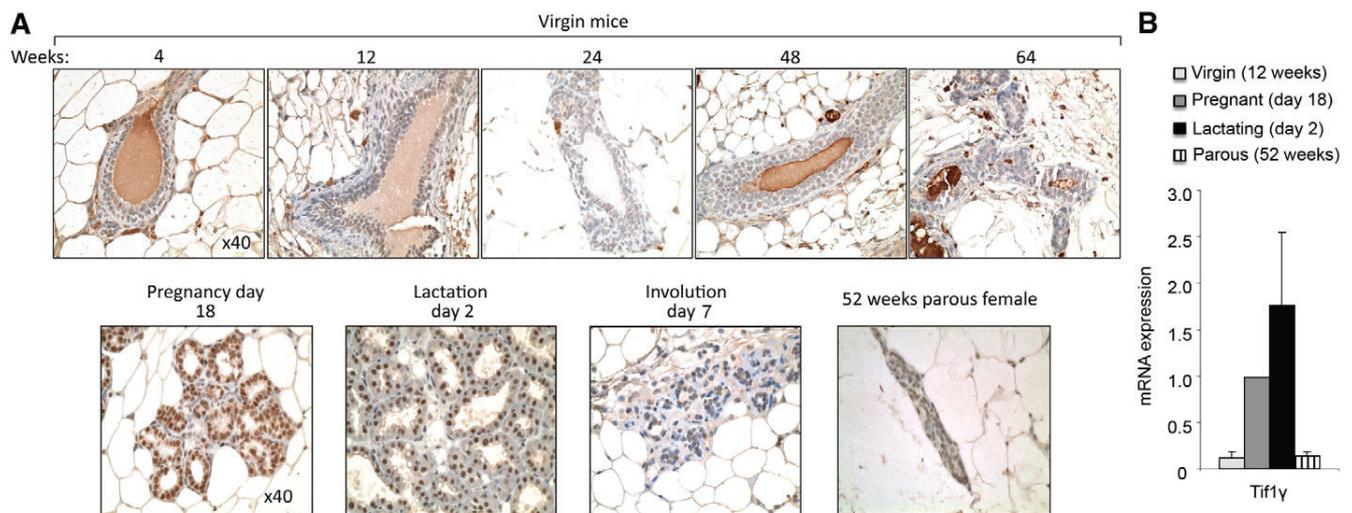


Fig. 1. *Tif1 γ* expression in epithelial ducts during mammary development. (A) Immunohistochemical localization of *Tif1 γ* was performed for each developmental stage from non-transgenic control mice. Pregnancy, lactation and involution were observed in 20-week-old mice (bottom row). Photographs are representative of at least five mice per stage. (B) Total RNA was extracted from MGs collected at the indicated developmental stages. *Tif1 γ* expression was determined by RT-qPCR. Values were normalized to the amount of HPRT mRNA (\pm s.d.) and expressed relative to the value obtained in pregnant mice.

inhibitor; Sigma) for 24 hours before adjunction of PRL. Cells treated with medium containing dexamethasone and insulin (DI) without PRL were used as controls. mRNAs and/or proteins were then extracted and purified.

For knockdown experiments, 2.5×10^5 cells were transfected with 5 nM siRNA and 0.5 μ l/ml lipofectamine RNAiMax (Invitrogen). For double silencing (*Tif1 γ* and SMAD4), cells were transfected with 10 nM siRNAs (5 nM of each siRNA). Controls cells were transfected by 10 nM Scramble siRNA (Qiagen). Cells were plated overnight in antibiotic-free medium and cultured in complete fresh medium until confluence. Two distinct mouse *Tif1 γ* siRNA sequences were used, yielding similar results: siRNA#1 (5'-CCGUCUGUUACAGCAAUAGAAUUA-3' and 5'-UUAAUUCUAUUGCUGUAACAGACGG-3'); siRNA#2 (5'-UACCUCUAUUGUCA-CGAAUUA-3' and 5'-UAAUUCGUGACAAUAGAGGUA-3'). The mouse SMAD4 siRNA sequences were 5'-CCCACAGCCUUUAG-ACUGA-3' and 5'-UCAGUCUAAAGGCUGUGGG-3'. For rescue experiments, 2.5×10^5 cells were transfected with 5 nM siRNA#1 targeting *TIF1 γ* and 0.5 μ l/ml lipofectamine RNAiMax (Invitrogen). Cells were plated overnight in antibiotic-free medium and then infected with the pLVX-based lentiviral vector expressing human *TIF1 γ* . Cells were grown to confluence in complete fresh medium before measuring STAT5 phosphorylation levels.

Immunoblot analysis

Cells were lysed using RIPA buffer. Cell lysates containing equal amounts of proteins were subjected to SDS-PAGE, transferred to a PVDF membrane and probed with antibodies. Proteins were visualized using an ECL kit (Millipore). Phospho-STAT5 (Tyr694) was detected using rabbit monoclonal antibody C11C5 (Cell Signaling). Total STAT5 was semi-quantified using rabbit polyclonal antibody C17 (Sc-835; Santa Cruz). Mouse tubulin was used as a loading control; tubulin was detected using mouse polyclonal antibody DM1A (Sigma).

RESULTS

Expression of *Tif1 γ* during mammary gland development

To determine *Tif1 γ* expression patterns, we first studied its cellular distribution by immunohistochemistry during developmental stages 4, 12, 24, 32, 48 and 64 weeks of virgin mice. MGs collected from late-pregnancy (day 18), lactating (day 2), involuting (day 2) and

52-week old parous mice were also studied. A weak immunoreactivity of the anti-*Tif1 γ* antibody was observed in the mammary epithelia of virgin mice at all developmental stages (Fig. 1A, upper panel). A dramatic increase in *Tif1 γ* expression became apparent in MEC nuclei during pregnancy, peaking during lactation before declining by day 7 of involution (Fig. 1A, lower panel). Comparable staining was observed in 52-week old parous glands. This pattern of expression strongly suggests that *Tif1 γ* is active predominantly during late-pregnancy and lactation, as confirmed by measurements of *Tif1 γ* mRNA levels detected at the indicated stages (Fig. 1B). Intermediary *Tif1 γ* staining indicates that, after parturition, *Tif1 γ* expression does not return to the basal level observed in 48- and 64-week old nulliparous mice. Taken together, these results establish that high *Tif1 γ* expression levels are a hallmark of late-pregnancy and lactation, suggesting a role in at least some aspects of MG development.

Loss of *Tif1 γ* does not affect duct development in virgin mice

Is *Tif1 γ* a direct actor of MG development, differentiation and, in addition, of tumorigenesis? To address this question, we generated two transgenic lines selectively inactivated for *Tif1 γ* in MECs: MMTV-Cre/*Tif1 γ* and WAP-Cre/*Tif1 γ* , which express Cre recombinase prior to lactation. Heterozygous (Cre/*Tif1 γ* ^{mf δ /+}) mice were mated to generate litters in which the three resulting genotypes (Cre/*Tif1 γ* ^{mf δ /mf δ} , Cre/*Tif1 γ* ^{mf δ /+} and Cre/*Tif1 γ* ^{+/+}) were found among females (supplementary material Fig. S1A). Because *Tif1 γ* expression is maximal during lactation (Fig. 1B), we verified the deletion of *Tif1 γ* during the first lactation of MMTV- and WAP-Cre/*Tif1 γ* females. For the MMTV-Cre/*Tif1 γ* line, most MECs of homozygous mutants were devoid of *Tif1 γ* and intermediate staining was observed in MECs of heterozygous mice compared with control (supplementary material Fig. S1B). In the WAP-Cre/*Tif1 γ* line, mosaic expression was observed in MECs of Cre/*Tif1 γ* ^{mf δ /mf δ} females, whereas intermediate expression was found in MECs of WAP-Cre/*Tif1 γ* ^{mf δ /+} relative to the control.

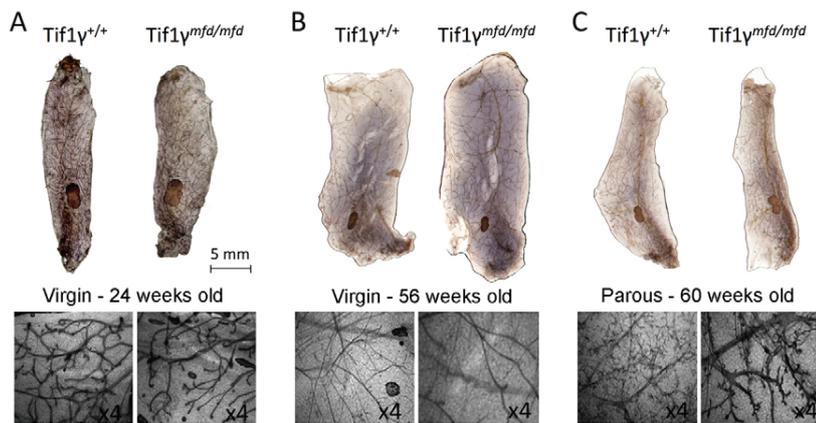


Fig. 2. Knockout of *Tif1g* in mammary epithelium does not affect virgin mammary development. (A–C) Wholemounts of control and MMTV-Cre/*Tif1g^{mfd/mfd}* MGs collected from 24-week-old virgin mice (A), 56-week-old virgin mice (B) and parous 60-week-old mice (C). Images are representative of five mice from each genotype. The lower photographs show a higher magnification (×4) of the whole mounts.

Cre/Tif1g^{mfd/mfd} mice developed normally, with body sizes comparable with those of *Cre/Tif1g^{+/+}* and *Cre/Tif1g^{mfd/+}*, for both MMTV-Cre and WAP-Cre/*Tif1g* lines. To investigate whether *Tif1g* deletion in MECs might promote mammary cancer, virgin and parous mice of the MMTV-Cre/*Tif1g* line were kept alive until 56 and 60 weeks, respectively. Mammary glands from five mutant and five control virgin mice were compared at 24 and 56 weeks after birth using whole-mount analysis. For both stages, no histological difference in MG morphogenesis was observed between mutants and controls, suggesting that *Tif1g* deletion does not influence ductal elongation and branching during puberty (Fig. 2A,B). No tumour or neoplastic lesions could be detected. Ductal trees of MGs collected from 10 mutants (five homozygous and five heterozygous) of 60-week-old parous females were similar to those observed for the five control mice. Once again, no tumours were observed (Fig. 2C). These results show that conditional *Tif1g* knockout neither affects duct development in virgin mice nor favours spontaneous mammary tumour formation.

Lack of *Tif1g* in the mammary epithelium induces lactation failure

In the course of this analysis, we observed that the offspring of homozygous MMTV-Cre/*Tif1g^{mfd/mfd}* females died just after birth and had a very small quantity of milk in their stomach (data not shown). We investigated this phenomenon further by crossing a total of 10 MMTV-Cre/*Tif1g* females of each genotype with wild-type males. Offspring from controls and heterozygous females were fed and gained weight normally, confirming that the presence of the MMTV-Cre transgene in the MG had no effect on lactation efficiency, as previously reported (Robinson and Hennighausen, 2011). By contrast, pups of the 10 *Cre/Tif1g^{mfd/mfd}* females, although born with normal size and weight, all died by 2 days postpartum. Importantly, if pups were exchanged between mutant and control mothers, pups born of a mutant survived when fed by a foster mother. These results show that MG-specific *Tif1g* deletion affects lactation in the mutant mothers. As observed with the MMTV-Cre/*Tif1g* line, pups from WAP-Cre/*Tif1g* homozygous mutants also died within a few days of birth, whereas pups from control mothers survived. Because, in the WAP-Cre line, conditional gene inactivation occurs at mid-pregnancy, i.e. prior to lactation, (Wagner et al., 1997), our results demonstrate that *Tif1g* inactivation just prior to lactation is sufficient to induce lactation failure. These observations strongly suggest that *Tif1g* is required for the latest steps of MG differentiation, such as lactation, which are predominantly controlled by signalling of the lactogenic hormone prolactin.

The absence of *Tif1g* results in a lack of lobuloalveolar development

To characterise lactation failure in more detail, MGs from mutant and control mice from both lines were compared 1 day after parturition and before the death of pups to conserve secretory activation in response to suckling. Whole-mount analysis clearly demonstrated significant morphological differences between mutants and controls at this stage. First, MGs from controls appeared to be optically opaque, revealing the presence of a large amount of milk in lobuloalveolar units, whereas MGs from homozygous mutants retained a clear appearance (Fig. 3A). At higher magnification, we observed that the alveolar-like units of homozygous mutants were dramatically condensed and less developed than those observed in controls, possibly because MECs never acquired the capacity to produce milk components (Fig. 3B). Of note, underdeveloped alveoli were also observed in MGs from WAP-Cre-*Tif1g* homozygous mutants, confirming that defects in ductal terminal growth and differentiation at parturition are likely to be responsible for lactation failure. Interestingly, we also observed similar but smaller defects in lactating MGs of heterozygous females in both lines, suggesting a correlation between efficiency of lactation and nuclear *Tif1g* expression. Although we observed a similar number of lobuloalveolar units in controls and mutant mice (Fig. 3D), they failed to expand and differentiate in mutant mice. Histological sections of MGs from control lactating mice revealed the presence of large lobuloalveolar units with expanded lumina as a consequence of milk secretion, whereas lobuloalveolar units from homozygous mutants contained fewer acini without lactation (Fig. 3). Moreover, controls and heterozygous alveolar cells actively secreted milk, as judged by the presence of lipid droplets in the cytoplasm. By contrast, lobuloalveolar units of homozygous mutant mice exhibited no lipid droplets, confirming the absence of secretory activity. We conclude from these observations that *Tif1g* inactivation results in a failure of terminal proliferation of ducts and differentiation of alveolar epithelial cells, thus impairing lactation.

Pituitary and serum prolactin levels are not altered in *Tif1g* mutant mice

Tif1g inactivation-induced lactation failure could result from a defect in production or secretion of the lactogenic hormone prolactin. The staining intensity of PRL in pituitary glands of homozygous mutants was comparable with that observed in control mice (supplementary material Fig. S2A), demonstrating that PRL synthesis is not altered by *Tif1g* deletion in the MG and/or by the

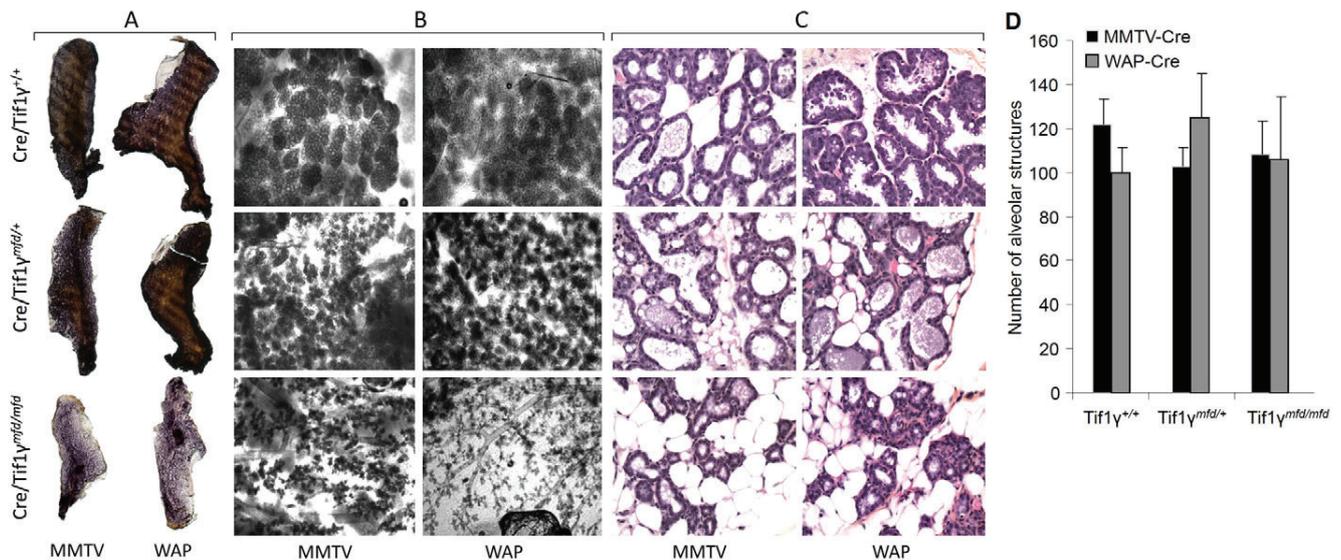


Fig. 3. Lack of *Tif1 γ* in the mammary epithelium leads to alveolar defects during lactation. The fourth inguinal gland was collected 2 days after parturition (10 mice per genotype for the MMTV-Cre/*Tif1g* line and five mice per genotype for the WAP-Cre/*Tif1g* line). (A) Whole-mount analysis. (B) Wholemounts. (C) Histological sections from mammary glands stained with haematoxylin phloxine saffron are also shown for each genotype. Images are representative of 10 mice per genotype for the MMTV-Cre/*Tif1g* line and five mice per genotype for the WAP-Cre/*Tif1g* line. (D) The number of alveolar structures were counted on wholemounts of the fourth inguinal gland collected 2 days after parturition for MMTV and WAP lines. Data are mean \pm s.d.

MMTV-Cre transgene. The amount of PRL was also quantified in the sera of virgin and lactating mice. As expected, a strong increase in PRL concentration was found in sera of lactating mice compared with virgins, but PRL levels were comparable in the three genotypes (supplementary material Fig. S2B). We conclude from these observations that lactation failure does not result from impaired production or secretion of PRL in homozygous mutant mice.

Lack of *Tif1g* strongly decreases expression of genes encoding milk proteins

As PRL levels are not affected by *Tif1g* deletion, we further checked by qRT-PCR the expression of two PRL target genes, β -casein and α -lactalbumin (*Csn2* and *Lalba*), which encode milk proteins. Although both genes were expressed in MGs of control lactating mice, mRNA expression was reduced in heterozygous mutants and was barely detectable in MGs of homozygous mutants (Fig. 4A). These results confirm that inactivation of *Tif1g* in mutant MGs inhibits the production of milk components. Further support for this observation was obtained by using the mouse mammary epithelial HC11 cell line, which can be differentiated upon lactogenic hormone stimulation, as measured by the induction of milk protein synthesis, including β -casein synthesis (Fig. 4B). β -Casein mRNA expression was strongly induced in control cells treated with PRL (si-ctrl, DIP lane). This induction was strongly counteracted by TGF β 1 (si-ctrl, DIPT lane), confirming the antagonistic actions of PRL and TGF β on target genes encoding milk proteins (Mieth et al., 1990; Cocolakis et al., 2008). We next transiently silenced *Tif1g* expression in HC11 cells by siRNA-mediated knockdown. In this and subsequent experiments, siRNA#1 was used for silencing (see Materials and methods). This, interestingly, also led to the inhibition of β -casein induction upon PRL treatment (si-1 *Tif1g*, DIP lane). Because this effect is independent of PRL levels per se, it might be due to alterations in

PRL receptor (PRLR) expression upon *Tif1g* inactivation. We tested this possibility by measuring expression of PRLR in mutant mice by qRT-PCR, using primers allowing detection of either the long PRLR isoform or all PRLR isoforms. High levels of mRNA encoding PRLR were detected in control mice. Mutant mice also expressed PRLR mRNA, albeit at a much lower level than control mice (Fig. 5A). We further confirmed this observation in the HC11 model. Whereas *Tif1g* inactivation had no effect on PRLR gene expression in HC11 cells, TGF β -induced downregulation of all

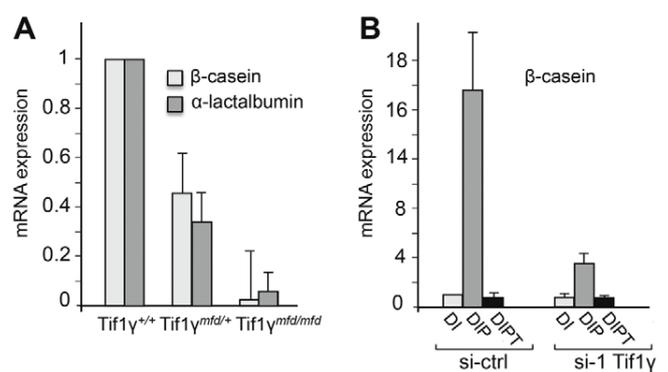


Fig. 4. Lack of *Tif1g* in mammary epithelial cells induces a strong decrease in the expression of milk proteins. (A) Total RNA was extracted from MGs collected 2 days after parturition and expression of β -casein, α -lactalbumin and PRLR was determined by RT-qPCR. Values were normalized to the amount of HPRT mRNA and expressed relative to the value obtained in control mice (\pm s.d.). (B) HC11 cells transiently silenced for *Tif1g* (si-1 *Tif1g*) or transfected with a control siRNA (si-ctrl) were treated with dexamethasone (D), insulin (I), prolactin (P) and TGF β 1 (T) (as indicated) for 48 hours. Total mRNA was then extracted and RT-qPCR was performed as in A.

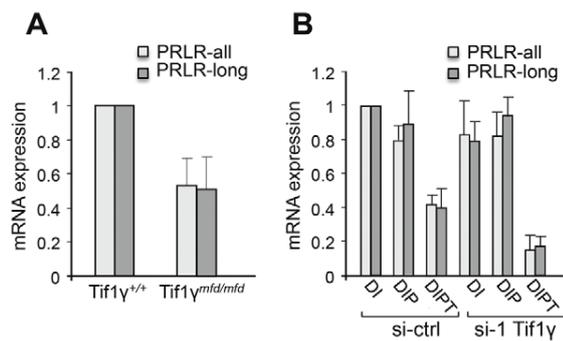


Fig. 5. TGF β induces a strong decrease in the expression of PRLR. (A,B) Total RNA was extracted from MGs collected 2 days after parturition (A) and from HC11 cells transiently silenced for *Tif1g* (si-1 *Tif*) or transfected with a control siRNA (si-ctrl) and treated with dexamethasone (D), insulin (I), prolactin (P) and TGF β (T) (as indicated) for 48 hours (B). Expression of PRLR (PRL-R all, all isoforms; PRLR-long, long isoform) was determined by RT-qPCR as described in Fig. 4. Data are mean \pm s.d.

PRLR species was significantly enhanced by *Tif1g* silencing (Fig. 5B). Taken together, these results demonstrate that TGF β decreases PRLR expression and that the siRNA-mediated knockdown of *Tif1g* counteracts PRL signalling, as TGF β does, consistent with the known role of *Tif1γ* as an antagonist of TGF β activity (Dupont et al., 2009).

Loss of *Tif1g* decreases STAT5 phosphorylation

Because transcription of milk protein genes requires PRLR-mediated phosphorylation of STAT5 by JAK2 (Ihle and Kerr, 1995), we checked phosphorylation of STAT5 on Tyr⁶⁹⁴ in MGs collected 2 days after parturition of MMTV-Cre/*Tif1g^{mfd/mfd}* mice. A dramatic decrease in STAT5 phosphorylation was observed in homozygous mutant MGs compared with controls (Fig. 6A). We further confirmed this observation in the HC11 model. As expected, treatment with PRL for 30 minutes induced a strong increase in STAT5 phosphorylation (Fig. 6B, DIP si-ctrl), which, importantly, was not observed in *Tif1g* siRNA-mediated knockdown cells (Fig. 6B, DIP si-1 *Tif1g*). We verified that another siRNA targeting *Tif1g* (si-2 *Tif1g*) yielded similar results and that ectopic expression of *Tif1g* could indeed rescue the effect of *Tif1g* inactivation on STAT5 phosphorylation (supplementary material Fig. S3). Taken together, these results support the hypothesis that loss of *Tif1g* affects PRLR-mediated phosphorylation of STAT5, a possibility we examined in more detail (described below).

The effect of *Tif1g* silencing on STAT5 phosphorylation depends on SMAD4 and TGF β pathways

TGF β had previously been shown to inhibit PRL/STAT5 signalling via mechanisms that involve SMAD proteins (Cocolakis et al., 2008; Wu et al., 2008) and *Tif1γ* is known to inhibit the SMAD4-dependent TGF β pathway (Dupont et al., 2009; Morsut et al., 2010). Accordingly, we observed that co-treatment with TGF β 1 counteracted STAT5 phosphorylation induced by PRL (Fig. 6B, DIPT lanes), while *Tif1g* siRNA-mediated knockdown potentiated the inhibitory effect of TGF β (Fig. 6B, DIPT si-1 *Tif1g*). Moreover, increasing the concentration of TGF β in the culture medium led to a dose-dependent decrease of PRL-induced STAT5

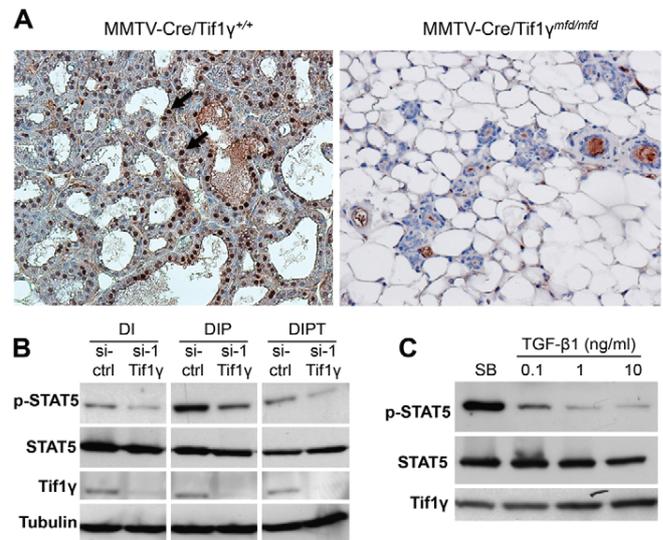


Fig. 6. STAT5-phosphorylation is altered by *Tif1g* deletion. (A) Phosphorylation of STAT5 was assayed by immunohistochemistry on MGs collected 2 days after parturition from MMTV-Cre/*Tif1g^{+/+}* and MMTV-Cre/*Tif1g^{mfd/mfd}* mice. Arrows show the nuclear staining of STAT5 in control mice that almost disappears in mutant alveolar-like units. Images are representative of three mice per genotype. (B) HC11 cells, silenced for *Tif1g*, were treated with dexamethasone (D), insulin (I) and prolactin (P) (as indicated) for 30 minutes. DIPT indicates TGF β 1 pre-treatment for 24 hours followed by D, I and P treatment for 30 minutes. STAT5 phosphorylation and expression were assayed by immunoblotting. Mouse tubulin was used as loading control and efficiency of the *Tif1g* siRNA-mediated knockdown (si-1 *Tif*) was verified as shown. (C) HC11 cells were treated for 24 hours with the TGF β type I receptor inhibitor SB-431542 (SB) or the indicated amount of TGF β 1 followed by D, I and P treatment (as indicated) for 30 minutes. STAT5 phosphorylation and expression were assayed as described in B.

phosphorylation, without affecting STAT5 expression (Fig. 6C). The known inhibitory activity of *Tif1γ* on the SMAD4-dependent TGF β pathway (Dupont et al., 2009) led us to suspect that inhibition of STAT5 phosphorylation by *Tif1g* siRNA-mediated knockdown might be attributed to TGF β and mediated by SMAD4. We tested this hypothesis using HC11 cells transiently silenced for *Tif1g* or *Smad4* and treated for 30 minutes with PRL. Results shown in Fig. 7A confirm that TGF β 1 abolished PRL-induced STAT5 phosphorylation. Inversely, siRNA-mediated knockdown of SMAD4 (si-S4) fully counteracted inhibition by TGF β , demonstrating the role of SMAD4 in this process. This conclusion is further reinforced by the observation that STAT5 phosphorylation could still be induced by PRL in cells co-silenced for *Tif1g* and *Smad4* expression (Fig. 7B).

In all these experiments carried out in HC11 cells, we observed that *Tif1γ* inactivation could decrease STAT5 phosphorylation even in the absence of TGF β treatment, leading us to ask whether this effect was independent of TGF β . We tested this possibility by treating HC11 cells with SB-431542 before induction by PRL. Interestingly, this TGF β type I receptor inhibitor fully abolished the effect of *Tif1g* depletion (Fig. 7C), demonstrating its dependence on TGF β signalling. Of note, the small amount of bovine TGF β (present in serum) and/or autocrine mouse TGF β (produced by cells) seemed to be

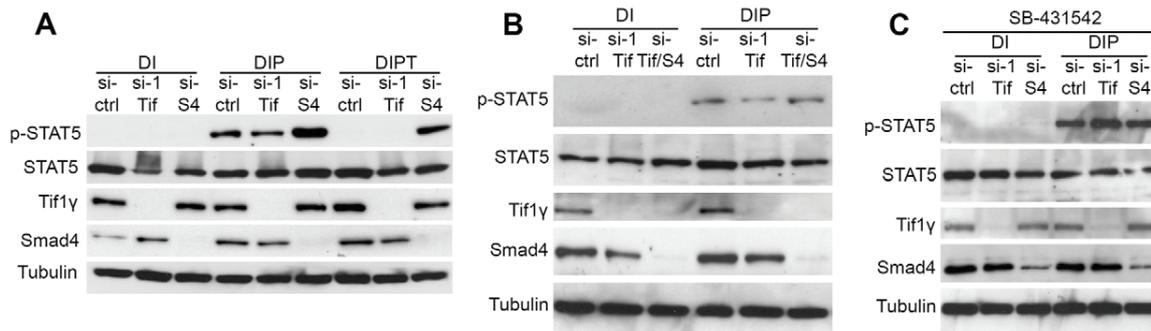


Fig. 7. Tif1 γ acts as a repressor of SMAD4-mediated effects on STAT5 phosphorylation. (A) HC11 cells, silenced for *Tif1g* (si-1 Tif) or *Smad4* (si-S4), were treated with dexamethasone (D), insulin (I) and prolactin (P) (as indicated) for 30 minutes. Scrambled siRNAs (si-ctrl) were used as controls. DIPT indicates TGF β 1 pre-treatment for 24 hours followed by D, I and P treatment for 30 minutes. (B) HC11 cells, silenced for *Tif1g* (si-1 Tif) or both *Tif1g* and *Smad4* (si-Tif/S4), were treated with D, I and P (as indicated) for 30 minutes. (C) HC11 cells were silenced for *Tif1g* (si-1 Tif) or SMAD4 (si-S4) and pre-treated with SB-431542 for 24 hours before D, I and P treatment (as indicated) for 30 minutes. STAT5 phosphorylation and expression were assayed by immunoblotting. The efficiency of *Tif1g* and *Smad4* knockdown was verified as shown. Mouse tubulin was used as loading control.

sufficient to activate SMAD signalling in cells in which *Tif1g* was inactivated. This might explain the decrease in STAT5 phosphorylation observed in cells depleted of *Tif1g* (Fig. 6B; Fig. 7A,B, DIP si-1 *Tif1g*) and the increase in STAT5 phosphorylation in cells depleted of *Smad4* (Fig. 7A, DIP si-S4).

These results clearly demonstrate that the inhibition of STAT5 phosphorylation associated with the failure of lactogenic differentiation observed in *Tif1g*-depleted cells depends on TGF β stimulation and is mediated by SMAD4. They also highlight the antagonistic roles played by SMAD4 and Tif1 γ in TGF β signalling and by the TGF β and PRL pathways. As discussed below, these observations are consistent with the inverse correlation that exists between the pattern of expression of *Tif1g* during MG development (Fig. 1A) and that of TGF β , the three isoforms of which show dramatically reduced expression in lactating tissue (Robinson et al., 1991).

DISCUSSION

TGF β is widely recognised as an important factor that regulates normal mammary gland development and also plays a role in breast cancer. Use of genetically engineered mouse models has helped show that TGF β regulates many steps of normal mammary gland development, including branching morphogenesis, functional differentiation, cell-lineage decisions and involution (Serra and Crowley, 2005). Tif1 γ has been described as a negative regulator of the TGF β pathway through mono-ubiquitylation of SMAD4 (Dupont et al., 2009). To establish more clearly the possible contributions of Tif1 γ in mammary gland development and, possibly, tumorigenesis, we developed a Cre/LoxP system to specifically inactivate the *Tif1g* gene in mammary epithelial cells of mice. We demonstrate that Tif1 γ is essential for terminal duct proliferation and differentiation of alveolar epithelial cells at the end of pregnancy (Fig. 3), but does not affect duct development in virgin mice (Fig. 2). Moreover, the lactation failure observed in MMTV-Cre/*Tif1g*^{mjd/mjd} mice is also observed in WAP-Cre/*Tif1g*^{mjd/mjd} mice, in which gene inactivation occurs prior to lactation (Fig. 3), clearly pointing to a key function of Tif1 γ during late pregnancy and lactation. Of note is the absence of any detectable effects on tumorigenesis upon *Tif1g* gene inactivation (Fig. 2 and see below).

Importantly, we found an unexpected Tif1 γ expression pattern in the epithelium of developing MGs. The protein appeared to be weakly expressed in MECs over the life of virgin mice, whereas a peak of expression was observed during pregnancy and lactation (Fig. 1). Strikingly, this pattern is almost symmetrically opposed to that described for the three isoforms of TGF β . All three isoforms are downregulated during pregnancy and lactation, whereas they are upregulated during mammary gland involution to suppress lactation (Robinson et al., 1991; Berie et al., 2009). These results concur with previous work showing that Tif1 γ temporally and spatially controls TGF β signalling during early vertebrate development by reducing SMAD4 availability (Morsut et al., 2010).

This report uncovers a novel mechanism whereby the TGF β pathway could control PRL signalling. It has previously been shown that TGF β signalling – via SMAD3/4 – could block the association of STAT5 with its co-activator CBP (CREB-binding protein), leading to inhibition of the transactivation of STAT5 target genes (Cocolakis et al., 2008). We note that the authors of this study did not report a modification of PRL-induced STAT5 phosphorylation by TGF β . Inversely, and in agreement with our data, Wu et al. clearly demonstrated that TGF β inhibits both PRL-induced tyrosine phosphorylation of STAT5 and suppression of β -casein expression in primary mouse MECs (Wu et al., 2008), but did not implicate SMAD4 in this inhibition. These discrepancies may be due to the absence of prolonged pre-treatment (24 hours) with TGF β by Cocolakis et al. Our own results demonstrate that PRL-induced STAT5 phosphorylation decreases upon depletion of Tif1 γ , leading to the silencing of PRL target genes (β -casein and α -lactalbumin). We also show that TGF β -induced downregulation of PRLR is enhanced by *Tif1g* silencing. It is important to note the absence of a decrease in PRLR expression in HC11 cells in which *Tif1g* was depleted, supporting the conclusion that loss of *Tif1g* can also affect PRL-mediated phosphorylation of STAT5 independently of its effect on PRLR levels. Tif1 γ can control STAT5 phosphorylation by negatively regulating SMAD4 functions during late-pregnancy and lactation. We show that, as TGF β does, *Tif1g* knockdown counteracts PRL signalling. This is consistent with the observation that mice overexpressing WAP promoter-driven TGF β display increased apoptosis in pregnant and lactating mammary

glands that is associated with decreased lobuloalveoli formation and decreased lactation (Jhappan et al., 1993), and that mice lacking SMAD4 in MECs show alveolar hyperplasia and transdifferentiation (Li et al., 2003).

None of the MMTV- or WAP-Cre-*Tif1g^{mfl/mfl}* females, including old multiparous ones, studied as part of our work developed spontaneous mammary tumours. This is consistent with a previous study showing that the conditional knockout of SMAD4 in MG induces cell proliferation, alveolar hyperplasia and transdifferentiation of mammary epithelial cells into squamous epithelial cells (Li et al., 2003), but contrasts with reports that loss of *Tif1g* promotes tumorigenesis in blood, pancreas and liver (Vincent et al., 2009; Aucagne et al., 2011; Herquel et al., 2011; Hesling et al., 2011). To reconcile our apparently contradictory results, we propose that, in these tissues, the potent tumour suppressive effects of *Tif1γ* could be independent of SMAD4, as shown in the pancreas (Vincent et al., 2012), and may be due to its ubiquitin ligase activity on other substrates. Conversely, in the mammary gland, as well as in the embryo, SMAD4 activity has to be tightly controlled to spatially and temporally restrict TGFβ signalling (Morsut et al., 2010), leading to significantly different effects in response to conditional *Tif1g* inactivation.

The lactation defect observed in *Tif1g*-null mammary glands hence stands out as the most significant phenotype resulting from the absence of *Tif1g*. We conclude from our results that it is due to a loss of balance in the crosstalk between TGFβ/SMADs and PRL/STAT5 pathways in mammary epithelial cells. According to this hypothesis, *Tif1γ* should play a critical role in the crosstalk between TGFβ and PRL pathways by negatively regulating SMAD4 functions to control STAT5 phosphorylation and subsequent transactivation of PRL target genes. We propose that *Tif1g* expression during late-pregnancy and lactation contributes to the inhibition of residual TGFβ activity by inhibiting SMAD4 during these crucial stages of MG development.

Acknowledgements

We thank S. Léon, A. Colombe and C. Languilaire for excellent technical assistance. The authors thank Dr Emmanuel Käs (LBME, CNRS/Université Paul Sabatier, Toulouse) for help in writing this manuscript. We are grateful to the staff of the animal facility (AniCan, Centre Léon Bérard and ALECS, SFR Lyon-Est, CNRS UMS3453-INSERM US7) for excellent support during the mouse studies.

Funding

This work was supported by grants from Inserm, CNRS, the Ligue Nationale contre le Cancer (Savoie) and Association pour la Recherche sur le Cancer. C.H. is supported by fellowships from the Centre Léon Bérard.

Competing interests statement

The authors declare no competing financial interests.

Author contributions

C.H., J.L., P.G., A.P., G.G. and R.R. designed experiments and analysed data. C.H. performed breeding. C.H., J.L., L.F., D.B. and V.G. performed colony genotyping, real-time PCR, differentiation of HC11 cells, immunoblot, whole-mount and histological studies with P.G., I.T., N.P. and I.M. R.L. designed and generated the *Tif1g* knockout alleles; C.H., J.L. and R.R. wrote the paper.

Supplementary material

Supplementary material available online at <http://dev.biologists.org/lookup/suppl/doi:10.1242/dev.085068/-DC1>

References

- Argetsinger, L. S., Campbell, G. S., Yang, X., Witthuhn, B. A., Silvennoinen, O., Ihle, J. N. and Carter-Su, C. (1993). Identification of JAK2 as a growth hormone receptor-associated tyrosine kinase. *Cell* **74**, 237-244.
- Aucagne, R., Droin, N., Paggetti, J., Lagrange, B., Largeot, A., Hammann, A., Bataille, A., Martin, L., Yan, K.-P., Fenaux, P. et al. (2011). Transcription

- intermediary factor 1γ is a tumor suppressor in mouse and human chronic myelomonocytic leukemia. *J. Clin. Invest.* **121**, 2361-2370.
- Barbieri, I., Pensa, S., Pannellini, T., Quagliano, E., Maritano, D., Demaria, M., Voster, A., Turkson, J., Cavallo, F., Watson, C. J. et al. (2010). Constitutively active Stat3 enhances neu-mediated migration and metastasis in mammary tumors via upregulation of Cten. *Cancer Res.* **70**, 2558-2567.
- Bernichtein, S., Jeay, S., Vaudry, R., Kelly, P. A. and Goffin, V. (2003). New homologous bioassays for human lactogens show that agonism or antagonism of various analogs is a function of assay sensitivity. *Endocrine* **20**, 177-190.
- Bierie, B., Gorska, A. E., Stover, D. G. and Moses, H. L. (2009). TGF-β promotes cell death and suppresses lactation during the second stage of mammary involution. *J. Cell. Physiol.* **219**, 57-68.
- Campbell, G. S., Argetsinger, L. S., Ihle, J. N., Kelly, P. A., Rillema, J. A. and Carter-Su, C. (1994). Activation of JAK2 tyrosine kinase by prolactin receptors in Nb2 cells and mouse mammary gland explants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 5232-5236.
- Cocolakis, E., Dai, M., Drevet, L., Ho, J., Haines, E., Ali, S. and Lebrun, J.-J. (2008). Smad signaling antagonizes STAT5-mediated gene transcription and mammary epithelial cell differentiation. *J. Biol. Chem.* **283**, 1293-1307.
- Diaz, N., Minton, S., Cox, C., Bowman, T., Gritsko, T., Garcia, R., Eweis, I., Wloch, M., Livingston, S., Seijo, E. et al. (2006). Activation of stat3 in primary tumors from high-risk breast cancer patients is associated with elevated levels of activated SRC and survivin expression. *Clin. Cancer Res.* **12**, 20-28.
- Dupont, S., Mamidi, A., Cordenonsi, M., Montagner, M., Zacchigna, L., Adorno, M., Martello, G., Stinchfield, M. J., Soligo, S., Morsut, L. et al. (2009). FAM/USP9x, a deubiquitinating enzyme essential for TGFβ signaling, controls Smad4 monoubiquitination. *Cell* **136**, 123-135.
- Guyette, W. A., Matusik, R. J. and Rosen, J. M. (1979). Prolactin-mediated transcriptional and post-transcriptional control of casein gene expression. *Cell* **17**, 1013-1023.
- He, W., Dorn, D. C., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Moore, M. A. S. and Massagué, J. (2006). Hematopoiesis controlled by distinct TIF1γ and Smad4 branches of the TGFβ pathway. *Cell* **125**, 929-941.
- Hennighausen, L. and Robinson, G. W. (2005). Information networks in the mammary gland. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 715-725.
- Herquel, B., Ouarrhni, K., Khetchoumian, K., Ignat, M., Teletin, M., Mark, M., Béchade, G., Van Dorselaer, A., Sanglier-Cianféran, S., Hamiche, A. et al. (2011). Transcription cofactors TRIM24, TRIM28, and TRIM33 associate to form regulatory complexes that suppress murine hepatocellular carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 8212-8217.
- Hesling, C., Fattet, L., Teyre, G., Jury, D., Gonzalo, P., Lopez, J., Vanbelle, C., Morel, A. P., Gillet, G., Mikaelian, I. et al. (2011). Antagonistic regulation of EMT by TIF1γ and Smad4 in mammary epithelial cells. *EMBO Rep.* **12**, 665-672.
- Ihle, J. N. and Kerr, I. M. (1995). Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet.* **11**, 69-74.
- Jain, S., Singhal, S., Francis, F., Hajdu, C., Wang, J. H., Suriawinata, A., Wang, Y. Q., Zhang, M., Weinschel, E. H., Francois, F. et al. (2011). Association of overexpression of TIF1γ with colorectal carcinogenesis and advanced colorectal adenocarcinoma. *World J. Gastroenterol.* **17**, 3994-4000.
- Jhappan, C., Geiser, A. G., Kordon, E. C., Bagheri, D., Hennighausen, L., Roberts, A. B., Smith, G. H. and Merlino, G. (1993). Targeting expression of a transforming growth factor beta 1 transgene to the pregnant mammary gland inhibits alveolar development and lactation. *EMBO J.* **12**, 1835-1845.
- Kelly, P. A., Djiane, J., Postel-Vinay, M. C. and Ederly, M. (1991). The prolactin/growth hormone receptor family. *Endocr. Rev.* **12**, 235-251.
- Kim, J. and Kaartinen, V. (2008). Generation of mice with a conditional allele for Trim33. *Genesis* **46**, 329-333.
- Levy, L., Howell, M., Das, D., Harkin, S., Episkopou, V. and Hill, C. S. (2007). Arkadia activates Smad3/Smad4-dependent transcription by triggering signal-induced SnoN degradation. *Mol. Cell Biol.* **27**, 6068-6083.
- Li, W., Qiao, W., Chen, L., Xu, X., Yang, X., Li, D., Li, C., Brodie, S. G., Meguid, M. M., Hennighausen, L. et al. (2003). Squamous cell carcinoma and mammary abscess formation through squamous metaplasia in Smad4/Dpc4 conditional knockout mice. *Development* **130**, 6143-6153.
- Mieth, M., Boehmer, F. D., Ball, R., Groner, B. and Grosse, R. (1990). Transforming growth factor-beta inhibits lactogenic hormone induction of beta-casein expression in HC11 mouse mammary epithelial cells. *Growth Factors* **4**, 9-15.
- Morsut, L., Yan, K.-P., Enzo, E., Aragona, M., Soligo, S. M., Wendling, O., Mark, M., Khetchoumian, K., Bressan, G., Chambon, P. et al. (2010). Negative control of Smad activity by ectoderm/Tif1γ patterns the mammalian embryo. *Development* **137**, 2571-2578.
- Nguyen, A. V. and Pollard, J. W. (2000). Transforming growth factor beta3 induces cell death during the first stage of mammary gland involution. *Development* **127**, 3107-3118.
- Razanajaona, D., Joguet, S., Ay, A.-S., Treilleux, I., Goddard-Léon, S., Bartholin, L. and Rimokh, R. (2007). Silencing of FLRG, an antagonist of activin, inhibits human breast tumor cell growth. *Cancer Res.* **67**, 7223-7229.

- Robinson, G. W. and Hennighausen, L.** (2011). MMTV-Cre transgenes can adversely affect lactation: considerations for conditional gene deletion in mammary tissue. *Anal. Biochem.* **412**, 92-95.
- Robinson, S. D., Silberstein, G. B., Roberts, A. B., Flanders, K. C. and Daniel, C. W.** (1991). Regulated expression and growth inhibitory effects of transforming growth factor-beta isoforms in mouse mammary gland development. *Development* **113**, 867-878.
- Serra, R. and Crowley, M. R.** (2005). Mouse models of transforming growth factor beta impact in breast development and cancer. *Endocr. Relat. Cancer* **12**, 749-760.
- Thiery, J. P., Aclouque, H., Huang, R. Y. J. and Nieto, M. A.** (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* **139**, 871-890.
- Vafaizadeh, V., Klemmt, P., Brendel, C., Weber, K., Doebele, C., Britt, K., Grez, M., Fehse, B., Desrivieres, S. and Groner, B.** (2010). Mammary epithelial reconstitution with gene-modified stem cells assigns roles to Stat5 in luminal alveolar cell fate decisions, differentiation, involution, and mammary tumor formation. *Stem Cells* **28**, 928-938.
- Vincent, D. F., Yan, K.-P., Treilleux, I., Gay, F., Arfi, V., Kaniewski, B., Marie, J. C., Lepinasse, F., Martel, S., Goddard-Leon, S. et al.** (2009). Inactivation of TIF1 γ cooperates with Kras to induce cystic tumors of the pancreas. *PLoS Genet.* **5**, e1000575.
- Vincent, D. F., Gout, J., Chuvin, N., Arfi, V., Pommier, R. M., Bertolino, P., Jonckheere, N., Ripoche, D., Kaniewski, B., Martel, S. et al.** (2012). Tif1 suppresses murine pancreatic tumoral transformation by a Smad4-independent pathway. *Am. J. Pathol.* **180**, 2214-2221.
- Wagner, K. U., Wall, R. J., St-Onge, L., Gruss, P., Wynshaw-Boris, A., Garrett, L., Li, M., Furth, P. A. and Hennighausen, L.** (1997). Cre-mediated gene deletion in the mammary gland. *Nucleic Acids Res.* **25**, 4323-4330.
- Wu, W.-J., Lee, C.-F., Hsin, C.-H., Du, J.-Y., Hsu, T.-C., Lin, T.-H., Yao, T.-Y., Huang, C.-H. and Lee, Y.-J.** (2008). TGF- β inhibits prolactin-induced expression of β -casein by a Smad3-dependent mechanism. *J. Cell. Biochem.* **104**, 1647-1659.
- Yan, K. P., Dollé, P., Mark, M., Lerouge, T., Wendling, O., Chambon, P. and Losson, R.** (2004). Molecular cloning, genomic structure, and expression analysis of the mouse transcriptional intermediary factor 1 gamma gene. *Gene* **334**, 3-13.
- Yu, H. and Jove, R.** (2004). The STATs of cancer – new molecular targets come of age. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 97-105.

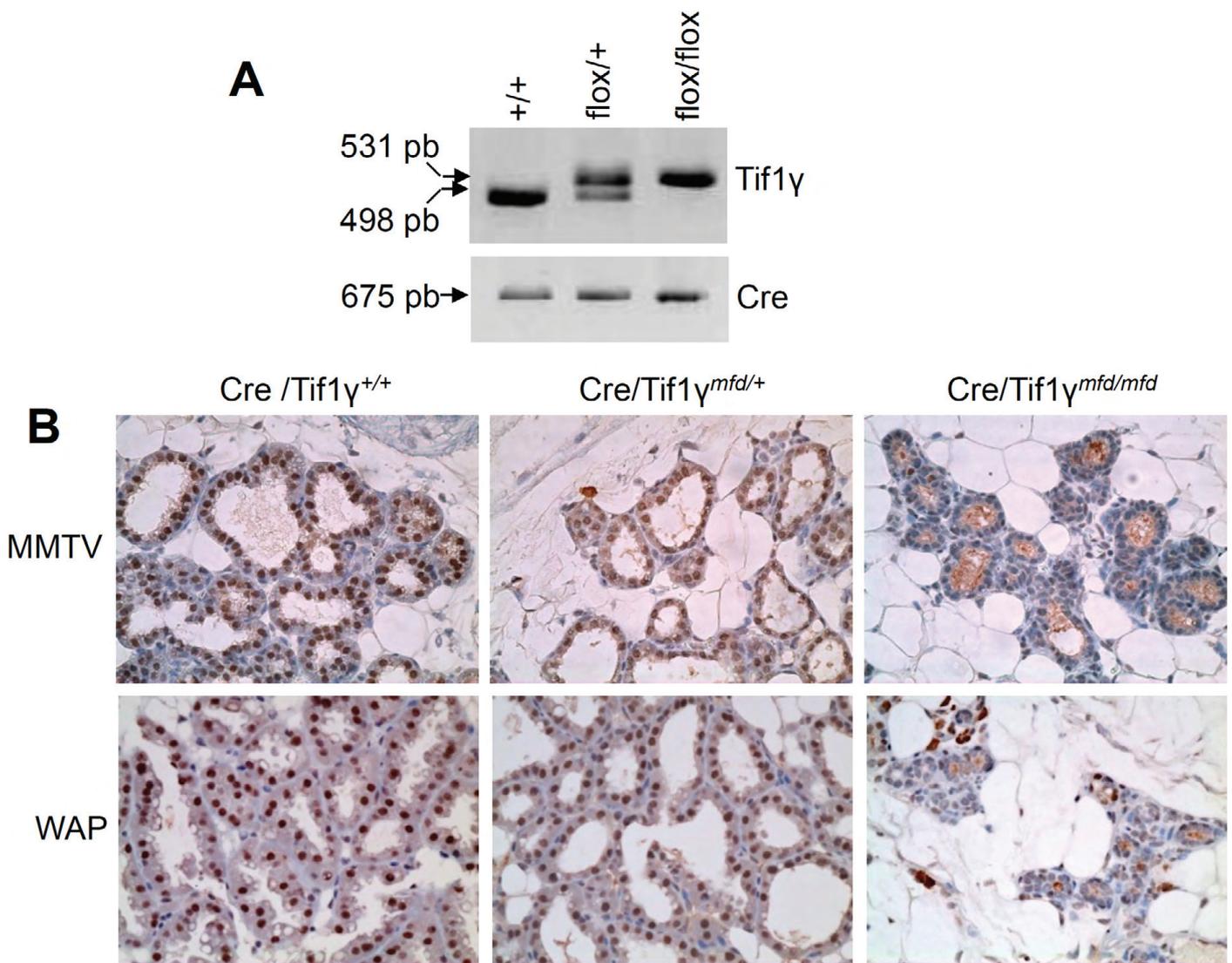


Fig. S1. Knockout of *Tif1g* in the mammary epithelium of MMTV- and WAP-Cre/*Tif1g*^{mfd/mfd} mice. (A) The genotype of *Tif1g* floxed mice was determined by multiplex PCR performed using extracted tail DNA (see Materials and methods). Photographs are representative of the three possible genotypes generated by mating heterozygous mice together. (B) *Tif1γ* protein expression in MGs collected 2 days after parturition. immunohistochemistry shows that *Tif1γ* staining is lost in MMTV- and WAP-Cre/*Tif1g*^{mfd/mfd} mice. Mice from each line were 20-week-old sisters from the same litter. Images are representative of 10 mice for each genotype of the MMTV-Cre/*Tif1g* line and five for each genotype of the WAP-Cre/*Tif1g* line.

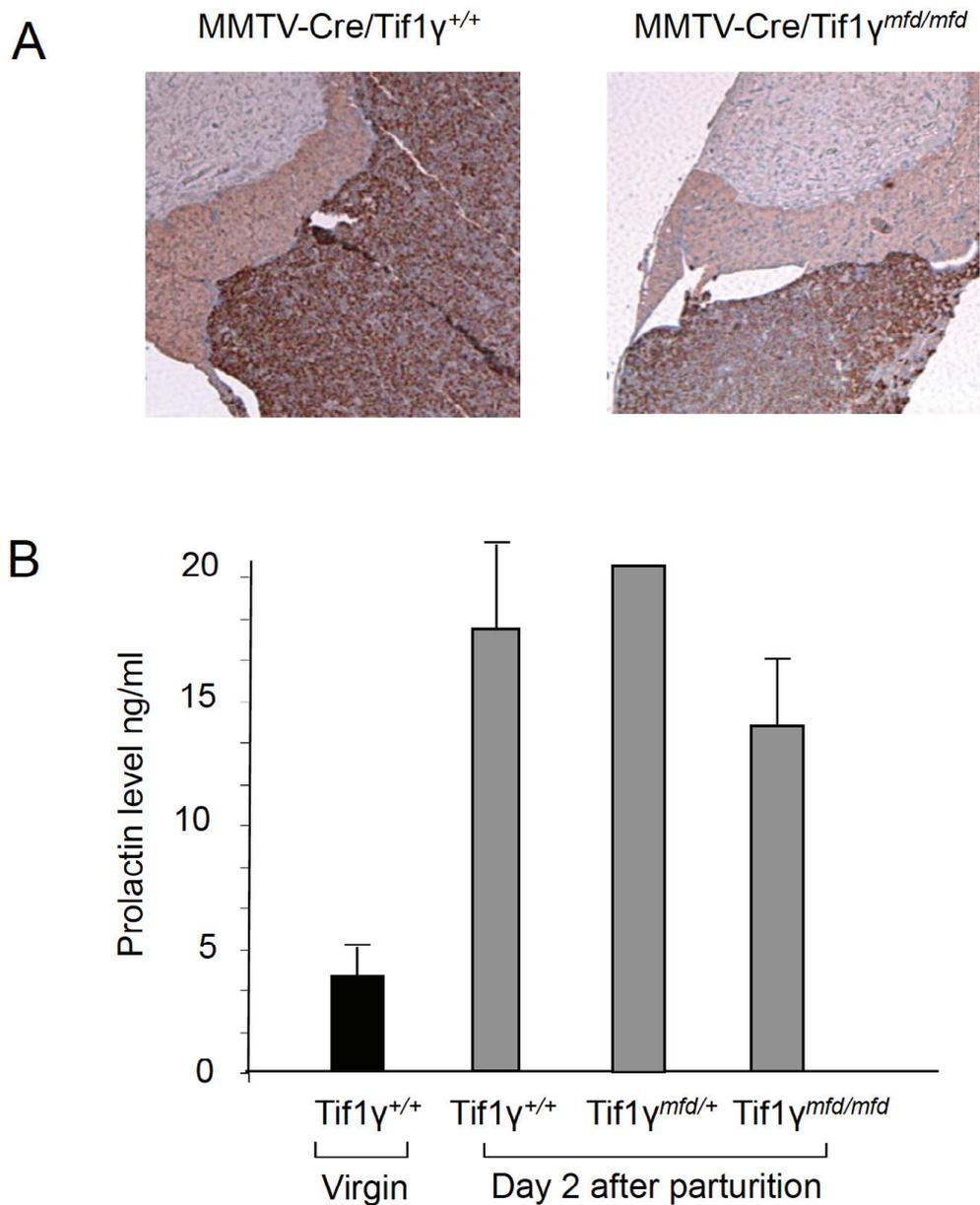


Fig. S2. PRL expression in the pituitary gland and PRL serum levels. (A) Expression of PRL in the pituitary gland. PRL immunohistochemistry in pituitary glands using anti-prolactin C17 (Santa Cruz). Staining intensity in the anterior pituitary of homozygous mutants was comparable with that in control mice. (B) Quantification of PRL in sera. PRL was quantified by ELISA in sera collected from virgin mice and 2 days after parturition from MMTV-Cre/*Tif1*^{+/+}, MMTV-Cre/*Tif1*^{mfd/+} and MMTV-Cre/*Tif1*^{mfd/mfd} mice. Serum PRL levels were comparable in the three genotypes of lactating mice.

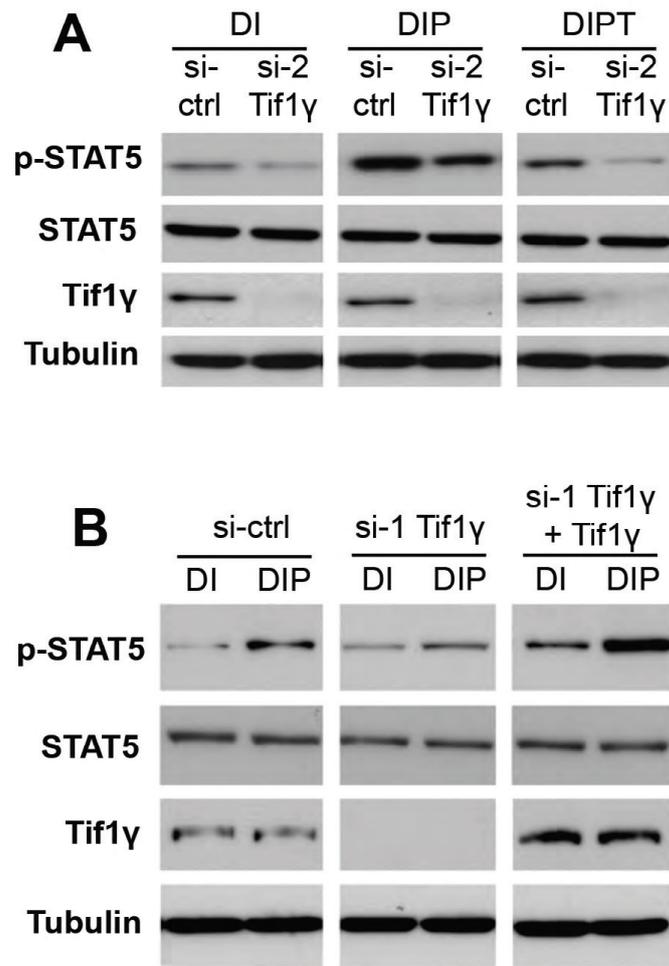


Fig. S3. Loss of *Tif1g* decreases STAT5 phosphorylation. (A) HC11 cells, silenced for *Tif1g* using siRNA#2 (si-2 Tif1 γ , see Materials and methods), were treated with dexamethasone (D), insulin (I) and prolactin (P) as indicated for 30 minutes. DIPT indicates TGF β 1 pre-treatment for 24 hours followed by D, I and P treatment for 30 minutes. STAT5 phosphorylation and expression were assayed by immunoblotting. Mouse tubulin was used as a loading control and efficiency of the *Tif1g* knockdown was verified as shown. (B) HC11 cells, silenced for *Tif1g* using siRNA#1 (si-1 *Tifg*, see Materials and methods), were infected with the pLVX-based lentiviral vector expressing human *TIF1G* and treated with D, I and P (as indicated) for 30 minutes.

II - Discussion

La famille du TGF β a été identifiée au début des années 1980, et les bases des mécanismes de transduction des signaux TGF β ont été comprises dans les années 1990. Ces recherches pionnières ont engendré de nombreux travaux pour explorer l'implication du TGF β dans la plupart des étapes de l'embryogenèse, de la différenciation des cellules souches à la formation de l'axe antéro-postérieur et la morphogenèse des tissus et des organes, mais aussi dans la régulation de l'homéostasie des tissus et des systèmes immunitaire ou hématopoïétique pendant la vie adulte. Le système TGF β s'est révélé être actif dans la plupart des types cellulaires pour réguler la prolifération, la motilité, la polarité, l'adhésion ou encore la survie cellulaire. Cependant, de nombreux aspects de la transduction du signal par le TGF β restent encore mal compris.

En contrepartie de l'importance du TGF β dans la régulation de ces processus cruciaux, le moindre dysfonctionnement de la voie de signalisation cause des désordres pathologiques comme le cancer. Ainsi, bien que le TGF β maintienne l'homéostasie tissulaire et empêche les tumeurs naissantes de progresser vers la malignité, les cellules cancéreuses génétiquement instables ont la capacité d'éviter voire de corrompre cet effet suppresseur du TGF β . De nombreuses altérations des acteurs de la voie canonique du TGF β , tels que les récepteurs ou les protéines Smad, sont retrouvées dans différents cancers. Ces altérations du signal TGF β favorisent la croissance tumorale, l'échappement aux systèmes de surveillance immunitaire, la dissémination des cellules tumorales, notamment en induisant la transition épithélio-mésenchymateuse, et la formation de métastases (Roberts & Wakefield, 2003) (Figure 21).

Cette voie de signalisation nécessite d'être finement régulée, que ce soit au niveau de la disponibilité du ligand, de la reconnaissance par les récepteurs, des interactions entre les messagers du signal que sont les protéines Smad ou encore de l'activation transcriptionnelle des gènes cibles du TGF β . Les modifications post-traductionnelles, affectant la totalité des acteurs de la voie du TGF β , ajoutent un degré de régulation supplémentaire.

Dans ce contexte, notre équipe s'intéresse aux rôles respectifs des protéines TIF1 γ et Smad4 dans la voie de signalisation du TGF β . Dans une première étude, nous avons montré que ces deux protéines régulent de manière antagoniste l'induction de la TEM par le TGF β dans des cellules épithéliales mammaires humaines. Un second travail a permis de générer un nouveau modèle mathématique de simulation de la voie canonique du TGF β confirmant l'importance des ratios de TIF1 γ et Smad4 pour l'orientation du signal TGF β . Nous avons

également démontré le rôle indispensable de TIF1 γ au cours du développement de la glande mammaire et au cours de la lactation par son action sur Smad4. Dans la dernière étude, nous montrons que la SUMOylation de TIF1 γ est capable de réguler cette connexion entre TIF1 γ et Smad4, notamment au cours de la TEM induite par le TGF β . L'ensemble de nos résultats montre que la protéine TIF1 γ est un régulateur négatif des fonctions de Smad4.

La voie de signalisation du TGF β est régulée négativement par plusieurs protéines. Par exemple, en interagissant avec Smad2, Smad3 et Smad4 dans le noyau et dans le cytoplasme, la protéine SnoN (Ski novel protein) empêche l'activation des gènes cibles du TGF β . Pour cela, le régulateur négatif SnoN perturbe la formation du complexe fonctionnel des Smads, recrute des co-répresseurs transcriptionnels et inhibe le recrutement de co-activateurs des Smads. Cependant, au cours de l'embryogenèse, l'activité de régulateur négatif de SnoN est nécessaire pour orchestrer les étapes du développement dépendantes du TGF β (Zhu & Luo, 2012). Il a été démontré que TIF1 γ agit également comme un régulateur négatif de la signalisation des membres de la superfamille du TGF β . Grâce à son domaine RING, TIF1 γ exerce un rôle d'ubiquitine ligase E3 responsable de la monoubiquitination de Smad4 (Dupont *et al*, 2009). Ainsi, la protéine TIF1 γ va limiter le temps de résidence de Smad4 dans le noyau et donc réduire son action au niveau des promoteurs des gènes cibles du TGF β (Agricola *et al*, 2011). Cette répression des fonctions de Smad4 par TIF1 γ peut être contrecarrée par l'action de la déubiquitinase cytoplasmique FAM/USP9x (Dupont *et al*, 2009). De plus, il a été montré que TIF1 γ est un puissant inhibiteur des fonctions de Smad4 au cours de la spécification de l'ectoderme dans l'embryon du Xénope (Dupont *et al*, 2005). Le développement de l'embryon du Xénope est donc régi par deux facteurs maternels présents aux antipodes de l'œuf, à savoir TIF1 γ au pôle animal (Dupont *et al*, 2005) et VegT au pôle végétatif (Zhang *et al*, 1998). Au cours de l'embryogenèse chez la Souris, la régulation négative de TIF1 γ sur Smad4 est également essentielle pour doser finement l'activité de Nodal pour la structuration de l'embryon. *In vivo*, l'activité du TGF β résulterait de la combinaison entre la disponibilité du ligand Nodal extracellulaire et le contrôle négatif de TIF1 γ sur Smad4 (Morsut *et al*, 2010). Au cours de l'embryogenèse, TIF1 γ permettrait donc d'interpréter le signal apporté par Nodal pour structurer correctement l'embryon.

Le TGF β a un rôle majeur au cours du développement de la glande mammaire. Afin d'analyser le rôle de TIF1 γ dans le développement de la glande mammaire, nous avons généré

des souris pour lesquelles l'expression de TIF1 γ est abolie spécifiquement dans la glande mammaire. Notre travail a permis de démontrer que TIF1 γ est nécessaire à la différenciation des structures lobuloalvéolaires en fin de gestation. Le développement des canaux chez les souris vierges, qui n'est pas affecté par l'inactivation de TIF1 γ , dépend de l'effet anti-prolifératif du TGF β , ce qui pourrait expliquer la perte de TIF1 γ dans la glande mammaire ne prédispose pas à l'apparition de tumeur. Les défauts de lactation observés chez les souris TIF1 $\gamma^{-/-}$, causant la mort des souriceaux, confirment la fonction clé de TIF1 γ pendant la gestation tardive et la lactation. De manière intéressante, la cinétique d'expression de TIF1 γ au sein de l'épithélium au cours du développement de la glande mammaire est presque symétriquement opposée à celle des différentes isoformes du TGF β (Figure 22). Le développement de la glande mammaire serait donc dépendant du même type de régulation temporelle et spatiale du signal TGF β présentée pour le développement embryonnaire précoce (Dupont *et al*, 2005; Morsut *et al*, 2010).

La régulation de la lactation fait intervenir une hormone produite par l'hypophyse, la Prolactine (PRL), requise pour la formation des structures lobuloalvéolaires et la différenciation des cellules épithéliales alvéolaires nécessaires à la production de lait. La PRL transmet son signal jusque dans le noyau grâce à la reconnaissance de son récepteur membranaire PRLR (PRL Receptor), active la protéine JAK2 (Janus Kinase 2) qui phosphoryle STAT5 (Signal Transducer and Activator of Transcription 5). Les protéines STAT5 phosphorylées se dimérisent, générant ainsi l'entité fonctionnelle de la voie PRL qui pénètre dans le noyau pour réguler la transcription de gènes cibles. Nos travaux présentent un nouveau mécanisme de régulation de la voie PRL par la voie du TGF β . Il est connu que les protéines Smad activées par le signal TGF β peuvent inhiber le recrutement du co-activateur CBP (CREB-Binding Protein) par le dimère actif de STAT5 et ainsi inhiber la transactivation des gènes cibles de la PRL (Cocolakis *et al*, 2008). Nos résultats montrent que la déplétion de TIF1 γ réduit significativement la phosphorylation de STAT5, induite par la voie PRL, et par conséquent inhibe la transcription de gènes cibles de PRL comme la β -caséine ou l' α -lactalbumine. La protéine TIF1 γ peut donc contrôler la phosphorylation de STAT5 en régulant négativement les fonctions de Smad4 pendant la lactation. En effet, la déplétion de TIF1 γ interfère avec la voie de signalisation de PRL. Ce résultat est en accord avec une étude montrant que la surexpression du TGF β spécifiquement dans la glande mammaire inhibe la formation des structures lobuloalvéolaires et la lactation (Jhappan *et al*, 1993), mimant le phénotype de l'inactivation de TIF1 γ . De plus, nous montrons que l'action négative de la voie

du TGF β , passant par Smad4, sur la voie PRL peut également affecter le niveau d'expression du récepteur à la PRL pour inhiber la transduction du signal PRL et empêcher la lactation.

Toutes ces données montrent que les cellules sont capables d'interpréter des variations subtiles de la signalisation du TGF β . En effet, au cours de la différenciation terminale des cellules épithéliales mammaire, nécessaire à la lactation, le moindre signal TGF β , même très faible, inhiberait la phosphorylation de STAT5 et interférerait ainsi avec la lactation. Au cours de la différenciation terminale des cellules épithéliales mammaires, période pendant laquelle les taux de TGF β sont déjà très bas, la protéine TIF1 γ serait donc cruciale pour abolir complètement le signal TGF β résiduel et ainsi permettre la lactation (Figure 23). Il serait intéressant d'analyser les mécanismes par lesquels Smad4 inhibe la phosphorylation de STAT5 pour comprendre à quel niveau TIF1 γ peut réprimer les fonctions de Smad4. Il est connu que les protéines SOCS (Suppressor Of Cytokine Signaling) inhibent la voie JAK/STAT et ont une expression finement régulée au cours de la lactation et de l'involution (Le Provost *et al*, 2005). Après avoir déterminé si l'expression des SOCS est régulée par la voie du TGF β et de manière antagoniste par TIF1 γ et Smad4, nous pourrions réaliser des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine afin de voir si TIF1 γ régule le temps de résidence de Smad4 au niveau des promoteurs des SOCS, de la même manière que nous l'avons montré au cours de la TEM induite par le TGF β , et ainsi être essentiel pour la lactation. Nos résultats montrent que la régulation du développement mammaire par le TGF β illustre l'importance des niveaux d'expression relatifs des protéines TIF1 γ et Smad4 pour la régulation de la lactation.

Le TGF β est un puissant inducteur de la TEM. Cette transition des cellules épithéliales, jointives et polarisées, en cellules mésenchymateuses de type fibroblastoïde s'accompagne de la dissociation des jonctions intercellulaires, de la réorganisation du cytosquelette d'Actine corticale en larges fibres de stress ou encore de l'acquisition de marqueurs mésenchymateux et de capacités migratoires et invasives. Notre étude montre que l'inactivation de TIF1 γ dans les cellules épithéliales mammaires renforce les caractéristiques mésenchymateuses induite par le TGF β . Au contraire, l'inactivation de Smad4 bloque complètement le déclenchement de la TEM induite par le TGF β . Nos résultats de transcriptomique indiquent que de nombreux gènes impliqués dans la régulation de la TEM sont régulés de manière antagoniste par TIF1 γ et Smad4. Ces gènes représenteraient donc la signature de l'effet répresseur de TIF1 γ sur Smad4 au cours de la TEM induite par le TGF β . L'inactivation de TIF1 γ augmente la

fonction de Smad4 au cours de la TEM induite par le TGF β , démontrant encore une fois l'importance des niveaux relatifs des protéines TIF1 γ et Smad4 pour la régulation de la TEM. Nos résultats de transcriptomique montrent que l'inactivation de TIF1 γ n'affecte pas la fonction antiproliférative du TGF β . Au vu des propriétés de type morphogène du TGF β et du rôle de TIF1 γ pour l'interprétation du signal Nodal par les cellules de l'embryon (Morsut *et al*, 2010), l'effet cyostatique du TGF β nécessiterait une action prolongée des protéines Smad au niveau des promoteurs de gènes cibles. D'autres réponses au signal TGF β , comme la régulation de la TEM ou de la lactation, seraient plus complexes et feraient intervenir l'action de répression de TIF1 γ sur Smad4. Cependant, une réponse au TGF β doit être considérée comme dynamique, ainsi l'induction de la TEM serait couplée à un effet, plus précoce, sur l'inhibition de la prolifération des cellules. Il serait intéressant d'étudier un modèle cellulaire dans lequel on inhiberait l'effet anti-prolifératif du TGF β pour analyser uniquement la contribution de l'action répressive de TIF1 γ sur Smad4, afin de démontrer si un processus aussi complexe que la TEM nécessite aussi bien l'effet suppresseur (inhibition de la prolifération, induction de l'apoptose) que promoteur de tumeur du TGF β (perte des jonctions intercellulaires, réorganisation du cytosquelette,...).

Alors que l'expression de TIF1 γ inhibe la transactivation dépendante du TGF β , la protéine Smad4 est libre d'interagir avec les R-Smads activées dans les cellules déplétées pour TIF1 γ , conduisant à une réponse au TGF β plus importante. Le ratio d'expression des protéines TIF1 γ et Smad4 est donc essentiel pour réguler la réponse transcriptionnelle induite par le signal TGF β . En collaboration avec l'équipe du Dr Nathalie Thérêt de l'Université de Rennes, nous avons généré un modèle mathématique en intégrant les dernières données sur la régulation négative de TIF1 γ sur Smad4 à partir des modèles pré-existants. Notre modèle, basé sur la formation transitoire d'un complexe ternaire composé de Smad2/3, Smad4 et TIF1 γ , réconcilie la fonction d'ubiquitination de Smad4 par TIF1 γ (Dupont *et al*, 2009) avec la vision de Massague quant à la formation d'une branche transcriptionnelle gérée par TIF1 γ associé aux R-Smads activées (He *et al*, 2006). Nous avons validé expérimentalement ce modèle grâce à une stratégie d'ARN interférence visant à faire varier le ratio TIF1 γ /Smad4 dans les cellules pour observer l'effet sur la réponse au TGF β en terme d'activation de l'expression de gènes cibles impliqués dans la TEM. Nos résultats soulignent encore une fois l'importance de TIF1 γ pour orchestrer les effets pléiotropes de la voie de signalisation du TGF β en fonction du contexte cellulaire. TIF1 γ permettrait donc de définir un large éventail

de réponses au TGF β en prenant en compte à la fois le niveau d'expression de Smad4 et la durée de stimulation par le TGF β . Par exemple, dans les progéniteurs érythroïdes, la branche canonique Smad4-Smad2/3 régulerait la prolifération alors que la branche TIF1 γ -Smad2/3 activerait la transcription des gènes de la différenciation (He *et al*, 2006).

TIF1 γ est donc un régulateur essentiel de l'activité transcriptionnelle du TGF β dépendante de Smad4. Ces données montrent également que le ratio d'expression des protéines TIF1 γ et Smad4 détermine la réponse au TGF β . En effet, notre modèle présente une interaction rapide de TIF1 γ avec le complexe Smad2-Smad4 activé par le TGF β pour former le complexe ternaire qui, après l'ubiquitination de Smad4 par TIF1 γ , se dissocie pour libérer Smad4 monoubiquitiné et le complexe TIF1 γ -Smad2. Smad4 peut alors être recyclé dans la voie du TGF β par l'action de la déubiquitinase FAM/USP9x. Pour comprendre la complexité de la voie de signalisation du TGF β et tenter de prédire les réponses cellulaires, de nouveaux modèles devront intégrer à la voie canonique du TGF β les voies indépendantes des Smads, ainsi que les événements épigénétiques. En effet, des études récentes ont montré que les modifications d'Histone servent de plateforme reconnue par le domaine PHD et le Bromodomaine de TIF1 γ , comme le confirme la structure cristallographique de cette liaison à la chromatine (Xi *et al*, 2011; Agricola *et al*, 2011). De plus, des travaux récents mettent en lumière l'importance des modifications épigénétiques dans la régulation de différents gènes cibles du TGF β (Bruna *et al*, 2007; Hannigan *et al*, 2010). Les modifications épigénétiques pourraient donc dessiner une signature permettant une action de TIF1 γ indépendante de Smad4, par la reconnaissance conjointe de motifs spéciaux de la chromatine par TIF1 γ et de SBE par les R-Smads, c'est pourquoi il serait intéressant d'analyser les réponses que pourrait réguler le complexe TIF1 γ -Smad2/3 issu du complexe ternaire. Nous pourrions pour cela réaliser une analyse transcriptomique de cellules éteintes pour l'expression de TIF1 γ et/ou de Smad2/3 et traitées au TGF β . Les premiers travaux de Massague ont permis d'identifier un destin transcriptionnel du complexe TIF1 γ -Smad2/3 régulant la différenciation érythroïde de manière indépendante du complexe de la voie canonique du TGF β (He *et al*, 2006). De plus, nos résultats de transcriptomique montrent que si la majorité des gènes dépendants du TGF β dont l'expression est induite ou réprimée par TIF1 γ l'est aussi par Smad4, il existe cependant une proportion non-négligeable de gènes dont l'expression est régulée par le TGF β exclusivement dépendants de TIF1 γ . On peut donc penser que dans certains contextes (par exemple un contexte tumoral), des événements épigénétiques favoriseraient ou au contraire

inhiberaient l'expression d'un programme orchestré par la protéine TIF1 γ en association avec Smad2/3.

Les modifications post-traductionnelles des récepteurs au TGF β et des protéines Smad jouent un rôle important dans la régulation fine de la transduction du signal (Xu *et al*, 2012). La SUMOylation affecte une pléthore de substrats protéiques et peut réguler la localisation subcellulaire, la fonction, la stabilité ou encore les interactions du substrat. Cette modification peut donc contrôler divers processus cellulaires comme la transcription, la réplication ou encore la réparation de l'ADN (Gareau & Lima, 2010). La SUMOylation affecte les acteurs de la voie du TGF β et, suivant le substrat, régulerait positivement ou négativement la réponse au TGF β . Par exemple, la SUMOylation du récepteur de type I stabilise le recrutement de Smad2/3, se traduisant par une action positive sur la réponse cellulaire au TGF β (Kang *et al*, 2008). De manière intéressante, une mutation inhibant la SUMOylation de T β RI a été associée à un phénotype métastatique de cancer du sein, faisant pour la première fois l'association entre cette modification post-traductionnelle et la progression tumorale (Chen *et al*, 1998a; Kang *et al*, 2008). La SUMOylation de Smad3 stimule son export nucléaire et inhiberait donc la voie du TGF β (Imoto *et al*, 2008). La SUMOylation de Smad4 a beaucoup été étudiée et les conséquences de cette modification sont controversées. Pour certains, la SUMOylation entrerait en compétition avec l'ubiquitination de Smad4, empêcherait la dégradation de Smad4 et augmenterait ainsi l'activité transcriptionnelle de Smad4 (Lin *et al*, 2003b; 2003a; Lee *et al*, 2003; Liang *et al*, 2004). Cependant, d'autres travaux montrent qu'au contraire, la SUMOylation réprime l'activité transcriptionnelle de Smad4 en recrutant le répresseur Daxx (Death domain-associated protein 6) ou en relocalisant Smad4 (Long *et al*, 2004; Chang *et al*, 2005; Miles *et al*, 2008). L'effet global de cette modification sur la voie de signalisation du TGF β est donc complexe.

Nous nous sommes intéressés au rôle éventuel de la SUMOylation de TIF1 γ sur son action répressive de la voie du TGF β . Nous montrons tout d'abord que TIF1 γ est SUMOylé sur quatre résidus Lysine conservés au cours de l'évolution (Lys-776, 793, 796, 839). Nous confirmons que cette modification se déroule dans le noyau grâce à l'action de l'enzyme de conjugaison Ubc9 et de la ligase PIAS1. De manière intéressante, ces sites fonctionnels de SUMOylation sont localisés dans le domaine *middle* de TIF1 γ , qui a été décrit comme étant le domaine d'interaction avec les protéines Smad (He *et al*, 2006). Nos résultats confirment que l'expression de TIF1 γ crée une compétition avec Smad4 pour lier les R-Smads activées par le

TGF β . L'absence de SUMOylation, mimée par la mutation des quatre sites fonctionnels, rend TIF1 γ incapable d'inhiber la formation du complexe Smad4-Smad2/3 et favorise l'interaction de TIF1 γ avec Smad4. De plus, à l'aide de tests transcriptionnels utilisant la luciférase dont l'expression est contrôlée par un promoteur répondant aux Smads, nous montrons que le mutant non SUMOylable de TIF1 γ réduit significativement la capacité de TIF1 γ à réprimer la réponse au TGF β . Nos résultats suggèrent donc que la SUMOylation de TIF1 γ est nécessaire à son action répressive sur Smad4 (Figure 24). Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine afin d'observer le recrutement de TIF1 γ et Smad4 sur le promoteur du gène cible du TGF β PAI-1 (Plasminogen-Activator Inhibitor 1) confirment que TIF1 γ agit en limitant le temps de résidence de Smad4 au niveau de l'ADN. De manière intéressante, le mutant de SUMOylation de TIF1 γ n'est pas capable d'interférer avec la durée de recrutement de Smad4 sur le promoteur de PAI-1. Ces travaux mettent donc en lumière que la SUMOylation de TIF1 γ renforcerait l'activité répressive de TIF1 γ sur Smad4 dans la voie du TGF β . Une étude très récente, qui décrit une technique de souris « knock-in » exprimant His₆-HA-SUMO1 visant à identifier à l'échelle globale les substrats modifiés par SUMOylation (Tirard *et al*, 2012), est venue confirmer que TIF1 γ fait partie de la longue liste des protéines SUMOylées. Il serait intéressant de croiser ces souris avec un modèle prédisposant aux tumeurs mammaires afin d'observer si TIF1 γ est plus ou moins SUMOylé dans un contexte tumoral. Il est très difficile d'observer les niveaux de SUMOylation de TIF1 γ , que ce soit sur des lysats protéiques de tumeurs, ou en immunohistochimie. Nous sommes donc en train de rechercher des mutations des sites fonctionnels de SUMOylation dans la séquence de TIF1 γ dans un panel de 80 tumeurs, ce qui pourrait nous informer sur des dérégulations de la SUMOylation de TIF1 γ dans le contexte tumoral. Nous sommes également en train de caractériser des lignées tumorales mammaires dans lesquelles nous avons surexprimé les formes sauvages ou mutées de TIF1 γ afin d'analyser l'effet de la SUMOylation de TIF1 γ sur la migration, l'invasion et la croissance tumorale.

Récemment, l'équipe de Caroline Hill a proposé un modèle dans lequel l'activité de TIF1 γ sert à dicter le temps de résidence du complexe Smad activé au niveau des promoteurs de gènes cibles du TGF β (Agricola *et al*, 2011). Dans ce modèle, l'activité ubiquitine ligase de TIF1 γ nécessite la reconnaissance entre les domaines PHD et Bromodomaine avec l'Histone H3 modifié. La protéine TIF1 γ ainsi activée dissocie le complexe transcriptionnel du promoteur en ubiquitinant Smad4. Nous pouvons penser que la SUMOylation de TIF1 γ

renforce la liaison à la chromatine en réponse au TGF β et donc favorise l'effet répresseur de TIF1 γ sur la réponse au TGF β dépendante de Smad4. Il serait donc intéressant de tester les affinités des différents mutants de SUMOylation de TIF1 γ , grâce à des expériences de pull-down avec des peptides d'Histone H3 modifiés, afin de compléter le modèle proposé par l'équipe de Caroline Hill (Agricola *et al*, 2011).

La protéine TIF1 γ peut également interagir avec les R-Smads phosphorylées en compétition avec Smad4 (He *et al*, 2006). L'équipe de Massagué a récemment montré que le complexe ainsi formé reconnaît des modifications spécifiques de la chromatine (H3K9me3-K18ac) avec une plus grande affinité que le répresseur HP1 γ (Heterochromatin Protein 1 γ). Cette substitution de régulateurs entraîne l'ouverture de la chromatine, permettant ainsi l'accès du complexe transcriptionnel Smad4-Smad2/3 au niveau des promoteurs de gènes cibles de l'Activine régulant la différenciation des cellules souches (Xi *et al*, 2011). Dans ce contexte, la protéine TIF1 γ semble donc coopérer avec Smad4 pour lui faciliter l'accès au promoteur des gènes de la différenciation *Gsc* et *Mixl1*. L'équipe de Massagué a clairement identifié un groupe de gènes dont l'expression, induite par Nodal, nécessite la protéine TIF1 γ . En revanche, toutes les autres études, dont nos travaux, montrent que l'inhibition de l'expression de TIF1 γ favorise la réponse au TGF β passant par Smad4, que ce soit au niveau transcriptionnel ou phénotypique (se traduisant pas l'induction de la TEM, l'inhibition de la lactation ou la différenciation du mésoderme chez le Xénope et la Souris) (Dupont *et al*, 2005; 2009; Agricola *et al*, 2011; Morsut *et al*, 2010; He *et al*, 2006). De plus, il a été montré que TIF1 γ est un régulateur de l'élongation de la transcription des gènes de la différenciation érythroïde dans les progéniteurs hématopoïétiques (Bai *et al*, 2010; 2013). Cette fonction de TIF1 γ , faisant intervenir le complexe transcriptionnel spécifique SCL et les facteurs d'élongation pTEFb et FACT et régule la phosphorylation de l'ARN polymérase II, est conservée du Zebrafish à la Souris. Il serait important d'analyser si ces deux mécanismes de régulation de la transcription par TIF1 γ pourraient être deux fonctions différentes d'un même complexe, régulées par des modifications telles que la SUMOylation. Pour cela, il sera intéressant de réaliser des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine avec la forme sauvage ou mutée de TIF1 γ et les protéines des complexes d'élongation de la transcription pour analyser le recrutement sur les promoteurs de gènes de la différenciation érythroïde comme *gata1* ainsi que sur ceux des gènes cibles du TGF β . En effet, les auteurs n'excluent pas que le TGF β puisse réguler ce rôle de TIF1 γ dans l'élongation de la transcription.

Nos résultats suggèrent que l'activité de répresseur transcriptionnel de TIF1 γ nécessite sa SUMOylation, la même observation a été décrite pour TIF1 β (Masclé *et al*, 2007). La SUMOylation de TIF1 β est requise pour recruter et stimuler l'activité de l'Histone méthyl-transférase SETDB1 et du facteur de remodelage de la chromatine CHD3 responsable de la répression transcriptionnelle (Ivanov *et al*, 2007). De la même manière que la SUMOylation de TIF1 β régule la répression de la transcription médiée par le domaine KRAB (Krueppel Associated Box), la SUMOylation de TIF1 γ régulerait la répression transcriptionnelle de la voie de signalisation du TGF β en inhibant la formation du complexe transcriptionnel Smad et en limitant temporellement son recrutement au niveau du promoteurs des gènes cibles. TIF1 γ pourrait également recruter d'autres facteurs régulant l'état de la chromatine comme montré lors de l'élongation de la transcription (Bai *et al*, 2010; 2013). Une réponse transcriptionnelle optimale à un signal donné nécessite des interconnexions très dynamiques entre les facteurs de transcription et leurs co-régulateurs. D'autres études devront analyser en détail le rôle de la SUMOylation sur la voie du TGF β , mais la dynamique de SUMOylation/désSUMOylation serait un moyen de réguler l'effet de TIF1 γ sur les fonctions de Smad4.

Le système de la SUMOylation peut être régulé par des modulations de l'expression ou de l'activité des différentes enzymes. Par exemple, la transcription de plusieurs gènes de la machinerie SUMO est activée au cours de la différenciation des kératinocytes (Deyrieux *et al*, 2007). Une augmentation de l'activité de SUMOylation a également été observée en réponse à différents stimuli comme le stress oxydatif (Zhou *et al*, 2004). La stabilité des enzymes de la SUMOylation représente un autre niveau de régulation. Il a également été montré que la SUMOylation de la conjugase Ubc9 altérerait sa spécificité à cibler des substrats particulier (Knipscheer *et al*, 2008). De plus, des déséquilibres de la balance entre SUMOylation et désSUMOylation pourraient contribuer à l'initiation et à la progression tumorale. De nombreux travaux abordent cette relation entre SUMOylation et cancer. Par exemple, une augmentation de l'expression des désSUMOylases SENP1 et SENP3 est observée dans le cancer de la prostate, favorisant plutôt la désSUMOylation des substrats. Dans le cancer du sein, une augmentation de l'expression de PIAS3 et Ubc9 ainsi qu'une baisse d'expression de SENP6 sont retrouvées (Bawa-Khalife & Yeh, 2010), et la surexpression d'Ubc9 favorise la croissance tumorale (Mo *et al*, 2005). Il est aujourd'hui évident que la SUMOylation est un régulateur important de l'homéostasie cellulaire et l'étude des mécanismes régulant cette modification est essentielle pour comprendre de nombreux processus cellulaires.

Par exemple, la protéine Smad4 est nécessaire à la TEM induite par le TGF β dans les cellules épithéliales mammaires. Nos travaux concernant l'expression de TIF1 γ sous sa forme sauvage ou mutée pour les sites de SUMOylation démontre que la SUMOylation de TIF1 γ est requise pour inhiber les fonctions de Smad4 et donc la TEM induite par le TGF β . Comme nous venons de le voir, la balance de SUMOylation/désSUMOylation peut être plus ou moins déséquilibrée et ainsi conduire au développement de pathologies. D'autant plus que l'implication de TIF1 γ dans la tumorigenèse a été décrite dans plusieurs travaux. En effet, la perte de l'expression de TIF1 γ favorise l'apparition de tumeurs du pancréas, du foie ou encore de leucémie myélomonocytaire chronique et une étude montre que, au contraire, la surexpression de TIF1 γ est corrélée à un mauvais pronostic dans le cancer colorectal (Vincent *et al*, 2009; Herquel *et al*, 2011b; Aucagne *et al*, 2011; Jain *et al*, 2011). Dans le but d'analyser le rôle de TIF1 γ dans la tumorigenèse mammaire, nous sommes actuellement en train d'analyser l'expression protéique de TIF1 γ , du TGF β et de Smad4 par immunohistochimie sur une cohorte d'environ 240 tumeurs mammaires dont nous disposons des données clinico-biologiques pour les études statistiques de corrélation. Nous analyserons également l'expression de ces protéines dans le front invasif des tumeurs, où la régulation de la TEM est très importante. Nous n'avons pas observé d'apparition de tumeurs mammaires chez nos souris inactivées pour l'expression de TIF1 γ dans la glande mammaire. Ce constat n'est pas surprenant au vu du puissant effet anti-prolifératif connu du TGF β , passant par Smad4, au niveau de l'épithélium mammaire. Il serait intéressant de croiser ces souris avec un modèle prédisposant aux tumeurs mammaires comme le modèle murin exprimant l'oncogène Her2/Neu spécifiquement dans la glande mammaire (modèle MMTV-Neu), afin d'observer un effet de TIF1 γ sur le développement tumoral mammaire, dépendant ou indépendant de la voie du TGF β .

Dans notre cas, la régulation de la SUMOylation de TIF1 γ pourrait donc être un moyen de réverser le processus de TEM au cours de la progression tumorale. Dans la même idée que le travail présentant le modèle d'activation d'une TEM réversible ou irréversible par l'induction de l'expression de Twist1 (Tsai *et al*, 2012), il serait intéressant de réaliser des expériences de xéno greffe sous-cutanée chez la souris immunodéprimée de cellules épithéliales mammaires exprimant un shARN dirigé contre TIF1 γ de manière inductible par la doxycycline. Le TGF β autocrine serait suffisant pour déclencher la TEM des cellules éteintes pour TIF1 γ . Une administration orale ou localisée de doxycycline permettrait de mimer respectivement une TEM irréversible ou réversible par la réexpression de TIF1 γ après que la

cellule tumorale ait quittée la tumeur primaire. L'étude de la réversion de la TEM, corrélée à la compréhension de la régulation de la dormance des cellules tumorales, devrait permettre de mettre en lumière des mécanismes pouvant servir de nouvelles cibles thérapeutiques.

En outre, il ne fait nul doute que la protéine TIF1 γ puisse agir indépendamment de la voie du TGF β , comme le montrent de nombreux résultats sur l'hématopoïèse par exemple (Kusy *et al*, 2011; Bai *et al*, 2013; Monteiro *et al*, 2011), ainsi que nos résultats de transcriptomique dans lesquels un nombre important de gènes régulés par TIF1 γ sont indépendants de la stimulation au TGF β . Il serait intéressant d'analyser l'effet de la SUMOylation de TIF1 γ par exemple sur la régulation des activités transcriptionnelles des chefs d'orchestre de l'hématopoïèse que sont les protéines TAL1 et PU.1 (Kusy *et al*, 2011). De plus, les travaux impliquant TIF1 γ dans la tumorigenèse hépatique, colorectale ou dans la LMMC n'ont pas étudié de liens avec la voie du TGF β dans ces contextes tumoraux (Herquel *et al*, 2011b; Jain *et al*, 2011; Aucagne *et al*, 2011). La protéine TIF1 γ étant une ubiquitine ligase, il serait également intéressant de rechercher ses autres substrats, en ne se restreignant pas à la voie du TGF β , par exemple en comparant les interactomes de la protéine TIF1 γ sauvage et d'un mutant du domaine RING, afin d'identifier d'autres voies de signalisation dans lesquelles TIF1 γ pourrait être impliqué par son rôle dans l'ubiquitination.

En conclusion, l'étude de la SUMOylation de TIF1 γ a mis en évidence un nouveau niveau de régulation des fonctions de la protéine TIF1 γ sur Smad4. Cependant, le premier niveau de régulation des réponses cellulaires au signal TGF β reste l'expression relative des protéines TIF1 γ et Smad4, comme le montre la plupart des travaux et en particulier notre étude de modélisation de la voie de signalisation du TGF β qui est la seule à étudier les variations des ratios d'expression TIF1 γ /Smad4. Peu de choses sont connues à ce jour sur la régulation de l'expression de TIF1 γ ou de Smad4. La méthylation du promoteur de TIF1 γ serait un des mécanismes régulant l'expression de TIF1 γ , comme le montre une étude sur la LMMC où ce processus serait à l'origine de la perte d'expression de TIF1 γ chez 35% des patients (Aucagne *et al*, 2011). Il sera primordial de connaître quels signaux et dans quels contextes les expressions des protéines TIF1 γ et Smad4 sont modulées afin de mieux comprendre les différentes réponses de la cellule au TGF β , pour par la suite intégrer ces données sur la SUMOylation de TIF1 γ .

BIBLIOGRAPHIE

- Agricola E, Randall RA, Gaarenstroom T, Dupont S & Hill CS (2011) Recruitment of TIF1 γ to Chromatin via Its PHD Finger-Bromodomain Activates Its Ubiquitin Ligase and Transcriptional Repressor Activities. *Molecular Cell* **43**: 85–96
- Al-Salihi MA, Herhaus L, Macartney T & Sapkota GP (2012) USP11 augments TGF signalling by deubiquitylating ALK5. *Open Biology* **2**: 120063–120063
- Albers M, Kranz H, Kober I, Kaiser C, Klink M, Suckow J, Kern R & Koegl M (2005) Automated yeast two-hybrid screening for nuclear receptor-interacting proteins. *Mol. Cell Proteomics* **4**: 205–213
- Alhopuro P, Alazzouzi H, Sammalkorpi H, Dávalos V, Salovaara R, Hemminki A, Järvinen H, Mecklin J-P, Schwartz S, Aaltonen LA & Arango D (2005) SMAD4 levels and response to 5-fluorouracil in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* **11**: 6311–6316
- Alliston T, Choy L, Ducy P, Karsenty G & Derynck R (2001) TGF-beta-induced repression of CBFA1 by Smad3 decreases cbfa1 and osteocalcin expression and inhibits osteoblast differentiation. *EMBO J.* **20**: 2254–2272
- Allton K, Jain AK, Herz H-M, Tsai W-W, Jung SY, Qin J, Bergmann A, Johnson RL & Barton MC (2009) Trim24 targets endogenous p53 for degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 11612–11616
- Andarawewa KL, Erickson AC, Chou WS, Costes SV, Gascard P, Mott JD, Bissell MJ & Barcellos-Hoff MH (2007) Ionizing radiation predisposes nonmalignant human mammary epithelial cells to undergo transforming growth factor beta induced epithelial to mesenchymal transition. *Cancer Research* **67**: 8662–8670
- Anders RA, Doré JJ, Arline SL, Garamszegi N & Leof EB (1998) Differential requirement for type I and type II transforming growth factor beta receptor kinase activity in ligand-mediated receptor endocytosis. *J. Biol. Chem.* **273**: 23118–23125
- Andrieux G, FATTET L, Le Borgne M, Rimokh R & Théret N (2012) Dynamic regulation of tgf-B signaling by tif1 γ : a computational approach. *PLoS ONE* **7**: e33761
- Annes JP, Munger JS & Rifkin DB (2003) Making sense of latent TGFbeta activation. *J. Cell. Sci.* **116**: 217–224
- Anzano MA, Roberts AB, Meyers CA, Komoriya A, Lamb LC, Smith JM & Sporn MB (1982) Synergistic interaction of two classes of transforming growth factors from murine sarcoma cells. *Cancer Research* **42**: 4776–4778
- Atfi A, Dumont E, Colland F, Bonnier D, L'helgoualc'h A, Prunier C, Ferrand N, Clément B, Wewer UM & Théret N (2007) The disintegrin and metalloproteinase ADAM12 contributes to TGF-beta signaling through interaction with the type II receptor. *J. Cell Biol.* **178**: 201–208

- Attisano L & Wrana JL (1998) Mads and Smads in TGF beta signalling. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**: 188–194
- Aucagne R, Droin N, Paggetti J, Lagrange B, Largeot A, Hammann A, Bataille A, Martin L, Yan K-P, Fenaux P, Losson R, Solary E, Bastie J-N & Delva L (2011) Transcription intermediary factor 1 γ is a tumor suppressor in mouse and human chronic myelomonocytic leukemia. *J. Clin. Invest.* **121**: 2361–2370
- Bai R-Y, Koester C, Ouyang T, Hahn SA, Hammerschmidt M, Peschel C & Duyster J (2002) SMIF, a Smad4-interacting protein that functions as a co-activator in TGFbeta signalling. *Nat. Cell Biol.* **4**: 181–190
- Bai X, Kim J, Yang Z, Jurynek MJ, Akie TE, Lee J, LeBlanc J, Sessa A, Jiang H, DiBiase A, Zhou Y, Grunwald DJ, Lin S, Cantor AB, Orkin SH & Zon LI (2010) TIF1gamma controls erythroid cell fate by regulating transcription elongation. *Cell* **142**: 133–143
- Bai X, Trowbridge JJ, Riley E, Lee JA, DiBiase A, Kaartinen VM, Orkin SH & Zon LI (2013) TIF1-gamma plays an essential role in murine hematopoiesis and regulates transcriptional elongation of erythroid genes. *Dev. Biol.* **373**: 422–430
- Bandyopadhyay A, López-Casillas F, Malik SN, Montiel JL, Mendoza V, Yang J & Sun L-Z (2002) Antitumor activity of a recombinant soluble betaglycan in human breast cancer xenograft. *Cancer Research* **62**: 4690–4695
- Bandyopadhyay B, Han A, Dai J, Fan J, Li Y, Chen M, Woodley DT & Li W (2011) TbetaRI/Alk5-independent TbetaRII signaling to ERK1/2 in human skin cells according to distinct levels of TbetaRII expression. *J. Cell. Sci.* **124**: 19–24
- Barnes J, Warejcka D, Simpliciano J, Twining S & Steet R (2012) Latency-associated peptide of transforming growth factor- β 1 is not subject to physiological mannose phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* **287**: 7526–7534
- Barton DE, Foellmer BE, Du J, Tamm J, Derynck R & Francke U (1988) Chromosomal mapping of genes for transforming growth factors beta 2 and beta 3 in man and mouse: dispersion of TGF-beta gene family. *Oncogene Res.* **3**: 323–331
- Batut J, Schmierer B, Cao J, Raftery LA, Hill CS & Howell M (2008) Two highly related regulatory subunits of PP2A exert opposite effects on TGF-beta/Activin/Nodal signalling. *Development* **135**: 2927–2937
- Bawa-Khalfe T & Yeh ETH (2010) SUMO Losing Balance: SUMO Proteases Disrupt SUMO Homeostasis to Facilitate Cancer Development and Progression. *Genes & Cancer* **1**: 748–752
- Belloni E, Trubia M, Gasparini P, Micucci C, Tapinassi C, Confalonieri S, Nuciforo P, Martino B, Lo-Coco F, Pelicci PG & Di Fiore PP (2005) 8p11 myeloproliferative syndrome with a novel t(7;8) translocation leading to fusion of the FGFR1 and TIF1 genes. *Genes Chromosomes Cancer* **42**: 320–325
- Bhowmick NA, Chytil A, Plieth D, Gorska AE, Dumont N, Shappell S, Washington MK, Neilson EG & Moses HL (2004a) TGF-beta signaling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent epithelia. *Science* **303**: 848–851

- Bhowmick NA, Neilson EG & Moses HL (2004b) Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* **432**: 332–337
- Bierie B, Gorska AE, Stover DG & Moses HL (2009) TGF-beta promotes cell death and suppresses lactation during the second stage of mammary involution. *J. Cell. Physiol.* **219**: 57–68
- Boettiger AN & Levine M (2009) Synchronous and stochastic patterns of gene activation in the Drosophila embryo. *Science* **325**: 471–473
- Border WA, Noble NA, Yamamoto T, Harper JR, Yamaguchi YU, Pierschbacher MD & Ruoslahti E (1992) Natural inhibitor of transforming growth factor-beta protects against scarring in experimental kidney disease. *Nature* **360**: 361–364
- Böttlinger EP, Factor VM, Tsang ML, Weatherbee JA, Kopp JB, Qian SW, Wakefield LM, Roberts AB, Thorgeirsson SS & Sporn MB (1996) The recombinant proregion of transforming growth factor beta1 (latency-associated peptide) inhibits active transforming growth factor beta1 in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**: 5877–5882
- Brabletz T, Jung A, Spaderna S, Hlubek F & Kirchner T (2005) Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat Rev Cancer* **5**: 744–749
- Brahimi-Horn C, Berra E & Pouyssegur J (2001) Hypoxia: the tumor's gateway to progression along the angiogenic pathway. *Trends in Cell Biology* **11**: S32–6
- Browne G, Sayan AE & Tulchinsky E (2010) ZEB proteins link cell motility with cell cycle control and cell survival in cancer. *Cell Cycle* **9**: 886–891
- Bruna A, Darken RS, Rojo F, Ocaña A, Peñuelas S, Arias A, Paris R, Tortosa A, Mora J, Baselga J & Seoane J (2007) High TGFbeta-Smad activity confers poor prognosis in glioma patients and promotes cell proliferation depending on the methylation of the PDGF-B gene. *Cancer Cell* **11**: 147–160
- Bu S, Kapanadze B, Hsu T & Trojanowska M (2008) Opposite effects of dihydrosphingosine 1-phosphate and sphingosine 1-phosphate on transforming growth factor-beta/Smad signaling are mediated through the PTEN/PPM1A-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* **283**: 19593–19602
- Burt DW & Law AS (1994) Evolution of the transforming growth factor-beta superfamily. *Prog. Growth Factor Res.* **5**: 99–118
- Buscemi L, Ramonet D, Klingberg F, Formey A, Smith-Clerc J, Meister J-J & Hinz B (2011) The single-molecule mechanics of the latent TGF-β1 complex. *Curr. Biol.* **21**: 2046–2054
- Candelaria M, Herrera A, Labardini J, González-Fierro A, Trejo-Becerril C, Taja-Chayeb L, Pérez-Cárdenas E, la Cruz-Hernández de E, Arias-Bofill D, Vidal S, Cervera E & Dueñas-Gonzalez A (2011) Hydralazine and magnesium valproate as epigenetic treatment for myelodysplastic syndrome. Preliminary results of a phase-II trial. *Ann. Hematol.* **90**: 379–387

- Ceteci F, Ceteci S, Karreman C, Kramer BW, Asan E, Götz R & Rapp UR (2007) Disruption of tumor cell adhesion promotes angiogenic switch and progression to micrometastasis in RAF-driven murine lung cancer. *Cancer Cell* **12**: 145–159
- Chacko BM, Qin BY, Tiwari A, Shi G, Lam S, Hayward LJ, De Caestecker M & Lin K (2004) Structural basis of heteromeric smad protein assembly in TGF-beta signaling. *Molecular Cell* **15**: 813–823
- Chang C-C, Lin D-Y, Fang H-I, Chen R-H & Shih H-M (2005) Daxx mediates the small ubiquitin-like modifier-dependent transcriptional repression of Smad4. *J. Biol. Chem.* **280**: 10164–10173
- Charng MJ, Zhang D, Kinnunen P & Schneider MD (1998) A novel protein distinguishes between quiescent and activated forms of the type I transforming growth factor beta receptor. *J. Biol. Chem.* **273**: 9365–9368
- Chen C-L, Huang SS & Huang JS (2006a) Cellular heparan sulfate negatively modulates transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) responsiveness in epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **281**: 11506–11514
- Chen C-R, Kang Y, Siegel PM & Massagué J (2002) E2F4/5 and p107 as Smad cofactors linking the TGFbeta receptor to c-myc repression. *Cell* **110**: 19–32
- Chen T, Carter D, Garrigue-Antar L & Reiss M (1998a) Transforming growth factor beta type I receptor kinase mutant associated with metastatic breast cancer. *Cancer Research* **58**: 4805–4810
- Chen Y-G, Wang Q, Lin S-L, Chang CD, Chuang J, Chung J & Ying S-Y (2006b) Activin signaling and its role in regulation of cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* **231**: 534–544
- Chen YG, Hata A, Lo RS, Wotton D, Shi Y, Pavletich N & Massague J (1998b) Determinants of specificity in TGF-beta signal transduction. *Genes & Development* **12**: 2144–2152
- Chen YG, Liu F & Massague J (1997) Mechanism of TGFbeta receptor inhibition by FKBP12. *EMBO J.* **16**: 3866–3876
- Cheng N, Bhowmick NA, Chytil A, Gorksa AE, Brown KA, Muraoka R, Arteaga CL, Neilson EG, Hayward SW & Moses HL (2005) Loss of TGF-beta type II receptor in fibroblasts promotes mammary carcinoma growth and invasion through upregulation of TGF-alpha-, MSP- and HGF-mediated signaling networks. *Oncogene* **24**: 5053–5068
- Choy L & Derynck R (1998) The type II transforming growth factor (TGF)-beta receptor-interacting protein TRIP-1 acts as a modulator of the TGF-beta response. *J. Biol. Chem.* **273**: 31455–31462
- Cocolakis E, Dai M, Drevet L, Ho J, Haines E, Ali S & Lebrun J-J (2008) Smad signaling antagonizes STAT5-mediated gene transcription and mammary epithelial cell differentiation. *J. Biol. Chem.* **283**: 1293–1307

- Connolly EC, Saunier EF, Quigley D, Luu MT, De Sapio A, Hann B, Yingling JM & Akhurst RJ (2011) Outgrowth of drug-resistant carcinomas expressing markers of tumor aggression after long-term T β RI/II kinase inhibition with LY2109761. *Cancer Research* **71**: 2339–2349
- Crawford SE, Stellmach V, Murphy-Ullrich JE, Ribeiro SM, Lawler J, Hynes RO, Boivin GP & Bouck N (1998) Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo. *Cell* **93**: 1159–1170
- Crowley MR, Bowtell D & Serra R (2005) TGF-beta, c-Cbl, and PDGFR-alpha the in mammary stroma. *Dev. Biol.* **279**: 58–72
- Cui W, Fowles DJ, Bryson S, Duffie E, Ireland H, Balmain A & Akhurst RJ (1996) TGFbeta1 inhibits the formation of benign skin tumors, but enhances progression to invasive spindle carcinomas in transgenic mice. *Cell* **86**: 531–542
- Daniel CW, Silberstein GB, Van Horn K, Strickland P & Robinson S (1989) TGF-beta 1-induced inhibition of mouse mammary ductal growth: developmental specificity and characterization. *Dev. Biol.* **135**: 20–30
- Datta PK & Moses HL (2000) STRAP and Smad7 synergize in the inhibition of transforming growth factor beta signaling. *Molecular and Cellular Biology* **20**: 3157–3167
- David L, Mallet C, Mazerbourg S, Feige J-J & Bailly S (2007) Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells. *Blood* **109**: 1953–1961
- De Bosscher K, Hill CS & Nicolás FJ (2004) Molecular and functional consequences of Smad4 C-terminal missense mutations in colorectal tumour cells. *Biochem. J.* **379**: 209–216
- de Thé H, Lavau C, Marchio A, Chomienne C, Degos L & Dejean A (1991) The PML-RAR alpha fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. *Cell* **66**: 675–684
- De Wever O, Westbroek W, Verloes A, Bloemen N, Bracke M, Gespach C, Bruyneel E & Mareel M (2004) Critical role of N-cadherin in myofibroblast invasion and migration in vitro stimulated by colon-cancer-cell-derived TGF-beta or wounding. *J. Cell. Sci.* **117**: 4691–4703
- Dean M, Fojo T & Bates S (2005) Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer* **5**: 275–284
- Deckers M, van Dinther M, Buijs J, Que I, Löwik C, van der Pluijm G & Dijke ten P (2006) The tumor suppressor Smad4 is required for transforming growth factor beta-induced epithelial to mesenchymal transition and bone metastasis of breast cancer cells. *Cancer Research* **66**: 2202–2209
- Deheuninck J & Luo K (2009) Ski and SnoN, potent negative regulators of TGF- β signaling. *Cell Res* **19**: 47–57

- Denissova NG, Pouponnot C, Long J, He D & Liu F (2000) Transforming growth factor beta-inducible independent binding of SMAD to the Smad7 promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**: 6397–6402
- Dennler S, Huet S & Gauthier JM (1999) A short amino-acid sequence in MH1 domain is responsible for functional differences between Smad2 and Smad3. *Oncogene* **18**: 1643–1648
- Dennler S, Itoh S, Vivien D, Dijke ten P, Huet S & Gauthier JM (1998) Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *EMBO J.* **17**: 3091–3100
- Derksen PWB, Liu X, Saridin F, van der Gulden H, Zevenhoven J, Evers B, van Beijnum JR, Griffioen AW, Vink J, Krimpenfort P, Peterse JL, Cardiff RD, Berns A & Jonkers J (2006) Somatic inactivation of E-cadherin and p53 in mice leads to metastatic lobular mammary carcinoma through induction of anoikis resistance and angiogenesis. *Cancer Cell* **10**: 437–449
- Derynck R, Jarrett JA, Chen EY, Eaton DH, Bell JR, Assoian RK, Roberts AB, Sporn MB & Goeddel DV (1985) Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature* **316**: 701–705
- Derynck R, Rhee L, Chen EY & Van Tilburg A (1987) Intron-exon structure of the human transforming growth factor-beta precursor gene. *Nucleic Acids Research* **15**: 3188–3189
- Deyrieux AF, Rosas-Acosta G, Ozburn MA & Wilson VG (2007) Sumoylation dynamics during keratinocyte differentiation. *J. Cell. Sci.* **120**: 125–136
- Di Guglielmo GM, Le Roy C, Goodfellow AF & Wrana JL (2003) Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. *Nat. Cell Biol.* **5**: 410–421
- Dickson MC, Martin JS, Cousins FM, Kulkarni AB, Karlsson S & Akhurst RJ (1995) Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice. *Development* **121**: 1845–1854
- Dijke ten P, Geurts van Kessel AH, Foulkes JG & Le Beau MM (1988) Transforming growth factor type beta 3 maps to human chromosome 14, region q23-q24. *Oncogene* **3**: 721–724
- Doisne J-M, Bartholin L, Yan K-P, Garcia CN, Duarte N, Le Leduc J-B, Vincent D, Cyprian F, Horvat B, Martel S, Rimokh R, Losson R, Benlagha K & Marie JC (2009) iNKT cell development is orchestrated by different branches of TGF-beta signaling. *J. Exp. Med.* **206**: 1365–1378
- Doré JJ, Yao D, Edens M, Garamszegi N, Sholl EL & Leof EB (2001) Mechanisms of transforming growth factor-beta receptor endocytosis and intracellular sorting differ between fibroblasts and epithelial cells. *Mol. Biol. Cell* **12**: 675–684
- Dubois CM, Laprise MH, Blanchette F, Gentry LE & Leduc R (1995) Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase. *J. Biol. Chem.* **270**: 10618–10624

- Dupont S, Mamidi A, Cordenonsi M, Montagner M, Zacchigna L, Adorno M, Martello G, Stinchfield MJ, Soligo S, Morsut L, Inui M, Moro S, Modena N, Argenton F, Newfeld SJ & Piccolo S (2009) FAM/USP9x, a Deubiquitinating Enzyme Essential for TGF β Signaling, Controls Smad4 Monoubiquitination. *Cell* **136**: 123–135
- Dupont S, Zacchigna L, Cordenonsi M, Soligo S, Adorno M, Rugge M & Piccolo S (2005) Germ-Layer Specification and Control of Cell Growth by Ectodermin, a Smad4 Ubiquitin Ligase. *Cell* **121**: 87–99
- Ebisawa T, Fukuchi M, Murakami G, Chiba T, Tanaka K, Imamura T & Miyazono K (2001) Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. *J. Biol. Chem.* **276**: 12477–12480
- Edlund S, Lee SY, Grimsby S, Zhang S, Aspenström P, Heldin C-H & Landström M (2005) Interaction between Smad7 and beta-catenin: importance for transforming growth factor beta-induced apoptosis. *Molecular and Cellular Biology* **25**: 1475–1488
- Elenbaas B, Spirio L, Koerner F, Fleming MD, Zimonjic DB, Donaher JL, Popescu NC, Hahn WC & Weinberg RA (2001) Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. *Genes & Development* **15**: 50–65
- Ewan KB, Shyamala G, Ravani SA, Tang Y, Akhurst R, Wakefield L & Barcellos-Hoff MH (2002) Latent transforming growth factor-beta activation in mammary gland: regulation by ovarian hormones affects ductal and alveolar proliferation. *Am. J. Pathol.* **160**: 2081–2093
- Feige J-J, Negoescu A, Keramidas M, Souchelnitskiy S & Chambaz EM (1996) Alpha 2-macroglobulin: a binding protein for transforming growth factor-beta and various cytokines. *Horm. Res.* **45**: 227–232
- Felici A, Wurthner JU, Parks WT, Giam LR-Y, Reiss M, Karpova TS, McNally JG & Roberts AB (2003) TLP, a novel modulator of TGF-beta signaling, has opposite effects on Smad2- and Smad3-dependent signaling. *EMBO J.* **22**: 4465–4477
- Feng X-H, Liang Y-Y, Liang M, Zhai W & Lin X (2002) Direct interaction of c-Myc with Smad2 and Smad3 to inhibit TGF-beta-mediated induction of the CDK inhibitor p15(Ink4B). *Molecular Cell* **9**: 133–143
- Feng XH, Zhang Y, Wu RY & Derynck R (1998) The tumor suppressor Smad4/DPC4 and transcriptional adaptor CBP/p300 are coactivators for smad3 in TGF-beta-induced transcriptional activation. *Genes & Development* **12**: 2153–2163
- Ferrigno O, Lallemand F, Verrecchia F, L'Hoste S, Camonis J, Atfi A & Mauviel A (2002) Yes-associated protein (YAP65) interacts with Smad7 and potentiates its inhibitory activity against TGF-beta/Smad signaling. *Oncogene* **21**: 4879–4884
- Fiorentino D & Casciola-Rosen L (2012) Autoantibodies to transcription intermediary factor 1 in dermatomyositis shed insight into the cancer-myositis connection. *Arthritis Rheum.* **64**: 346–349

- Forrester NA, Patel RN, Speiseder T, Groitl P, Sedgwick GG, Shimwell NJ, Seed RI, Catnaigh PÓ, McCabe CJ, Stewart GS, Dobner T, Grand RJA, Martin A & Turnell AS (2011) Adenovirus E4orf3 targets Transcriptional Intermediary Factor 1 γ for proteasome-dependent degradation during infection. *J Virol*
- Friedman JR, Fredericks WJ, Jensen DE, Speicher DW, Huang XP, Neilson EG & Rauscher FJ (1996) KAP-1, a novel corepressor for the highly conserved KRAB repression domain. *Genes & Development* **10**: 2067–2078
- Fujii D, Brissenden JE, Derynck R & Francke U (1986) Transforming growth factor beta gene maps to human chromosome 19 long arm and to mouse chromosome 7. *Somat. Cell Mol. Genet.* **12**: 281–288
- Fujimoto M, Hamaguchi Y, Kaji K, Matsushita T, Ichimura Y, Kodera M, Ishiguro N, Ueda-Hayakawa I, Asano Y, Ogawa F, Fujikawa K, Miyagi T, Mabuchi E, Hirose K, Akimoto N, Hatta N, Tsutsui K, Higashi A, Igarashi A, Seishima M, et al (2012) Myositis-specific anti-155/140 autoantibodies target transcription intermediary factor 1 family proteins. *Arthritis Rheum.* **64**: 513–522
- Funkenstein B, Olekh E & Jakowlew SB (2010) Identification of a novel transforming growth factor-beta (TGF-beta6) gene in fish: regulation in skeletal muscle by nutritional state. *BMC Mol. Biol.* **11**: 37
- Gallier AJ & Schiemann WP (2007) Src phosphorylates Tyr284 in TGF-beta type II receptor and regulates TGF-beta stimulation of p38 MAPK during breast cancer cell proliferation and invasion. *Cancer Research* **67**: 3752–3758
- Ganapathy V, Ge R, Grazioli A, Xie W, Banach-Petrosky W, Kang Y, Lonning S, McPherson J, Yingling JM, Biswas S, Mundy GR & Reiss M (2010) Targeting the Transforming Growth Factor-beta pathway inhibits human basal-like breast cancer metastasis. *Mol. Cancer* **9**: 122
- Gao S, Alarcón C, Sapkota G, Rahman S, Chen P-Y, Goerner N, Macias MJ, Erdjument-Bromage H, Tempst P & Massagué J (2009) Ubiquitin ligase Nedd4L targets activated Smad2/3 to limit TGF-beta signaling. *Molecular Cell* **36**: 457–468
- Gareau JR & Lima CD (2010) The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**: 861–871
- Germain S, Howell M, Esslemont GM & Hill CS (2000) Homeodomain and winged-helix transcription factors recruit activated Smads to distinct promoter elements via a common Smad interaction motif. *Genes & Development* **14**: 435–451
- Ghahary A, Tredget EE & Shen Q (1999) Insulin-like growth factor-II/mannose 6 phosphate receptors facilitate the matrix effects of latent transforming growth factor-beta1 released from genetically modified keratinocytes in a fibroblast/keratinocyte co-culture system. *J. Cell. Physiol.* **180**: 61–70
- Gomis RR, Alarcón C, He W, Wang Q, Seoane J, Lash A & Massagué J (2006) A FoxO-Smad synexpression group in human keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**: 12747–12752

- González-Ramos M, Mora I, de Frutos S, Garesse R, Rodríguez-Puyol M, Olmos G & Rodríguez-Puyol D (2012) Intracellular redox equilibrium is essential for the constitutive expression of AP-1 dependent genes in resting cells: studies on TGF- β 1 regulation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **44**: 963–971
- Gorelik L & Flavell RA (2001) Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells. *Nat. Med.* **7**: 1118–1122
- Gorska AE, Joseph H, Derynck R, Moses HL & Serra R (1998) Dominant-negative interference of the transforming growth factor beta type II receptor in mammary gland epithelium results in alveolar hyperplasia and differentiation in virgin mice. *Cell Growth Differ.* **9**: 229–238
- Goumans M-J, Valdimarsdottir G, Itoh S, Rosendahl A, Sideras P & Dijke ten P (2002) Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *EMBO J.* **21**: 1743–1753
- Graf T & Enver T (2009) Forcing cells to change lineages. *Nature* **462**: 587–594
- Greenburg G & Hay ED (1982) Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J. Cell Biol.* **95**: 333–339
- Halper J, Burt DW & Romanov MN (2004) On reassessment of the chicken TGFB4 gene as TGFB1. *Growth Factors* **22**: 121–122
- Hanai J, Chen LF, Kanno T, Ohtani-Fujita N, Kim WY, Guo WH, Imamura T, Ishidou Y, Fukuchi M, Shi MJ, Stavnezer J, Kawabata M, Miyazono K & Ito Y (1999) Interaction and functional cooperation of PEBP2/CBF with Smads. Synergistic induction of the immunoglobulin germline Calpha promoter. *J. Biol. Chem.* **274**: 31577–31582
- Hannigan A, Smith P, Kalna G, Nigro Lo C, Orange C, O'Brien DI, Shah R, Syed N, Spender LC, Herrera B, Thurlow JK, Lattanzio L, Monteverde M, Maurer ME, Buffa FM, Mann J, Chu DCK, West CML, Patridge M, Oien KA, et al (2010) Epigenetic downregulation of human disabled homolog 2 switches TGF-beta from a tumor suppressor to a tumor promoter. *J. Clin. Invest.* **120**: 2842–2857
- Hata A, Lo RS, Wotton D, Lagna G & Massague J (1997) Mutations increasing autoinhibition inactivate tumour suppressors Smad2 and Smad4. *Nature* **388**: 82–87
- Hayashi H, Abdollah S, Qiu Y, Cai J, Xu YY, Grinnell BW, Richardson MA, Topper JN, Gimbrone MA, Wrana JL & Falb D (1997) The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling. *Cell* **89**: 1165–1173
- He W, Dorn DC, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Moore MAS & Massagué J (2006) Hematopoiesis Controlled by Distinct TIF1 γ and Smad4 Branches of the TGF β Pathway. *Cell* **125**: 929–941
- Heldin C-H, Landström M & Moustakas A (2009) Mechanism of TGF-beta signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**: 166–176

- Herquel B, Ouararhni K & Davidson I (2011a) The TIF1 α -related TRIM cofactors couple chromatin modifications to transcriptional regulation, signaling and tumor suppression. *Transcription* **2**: 231–236
- Herquel B, Ouararhni K, Khetchoumian K, Ignat M, Teletin M, Mark M, Béchade G, Van Dorsselaer A, Sanglier-Cianférani S, Hamiche A, Cammas F, Davidson I & Losson R (2011b) Transcription cofactors TRIM24, TRIM28, and TRIM33 associate to form regulatory complexes that suppress murine hepatocellular carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*
- Hesling C, FATTET L, Teyre G, Jury D, Gonzalo P, Lopez J, Vanbelle C, Morel A-P, Gillet G, Mikaelian I & Rimokh R (2011) Antagonistic regulation of EMT by TIF1 γ and Smad4 in mammary epithelial cells. *EMBO Rep*
- Hesling C, Lopez J, FATTET L, Gonzalo P, Treilleux I, Blanchard D, Losson R, Goffin V, Pigat N, Puisieux A, Mikaelian I, Gillet G & Rimokh R (2012) Tif1 γ is essential for the terminal differentiation of mammary alveolar epithelial cells and for lactation through SMAD4 inhibition. *Development*
- Hogan BL (1996) Bone morphogenetic proteins in development. *Current Opinion in Genetics & Development* **6**: 432–438
- Horiguchi K, Sakamoto K, Koinuma D, Semba K, Inoue A, Inoue S, Fujii H, Yamaguchi A, Miyazawa K, Miyazono K & Saitoh M (2012) TGF- β drives epithelial-mesenchymal transition through δ EF1-mediated downregulation of ESRP. *Oncogene* **31**: 3190–3201
- Huang T, David L, Mendoza V, Yang Y, Villarreal M, De K, Sun L, Fang X, López-Casillas F, Wrana JL & Hinck AP (2011) TGF- β signalling is mediated by two autonomously functioning T β RI:T β RII pairs. *EMBO J.* **30**: 1263–1276
- Igarashi A, Okochi H, Bradham DM & Grotendorst GR (1993) Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair. *Mol. Biol. Cell* **4**: 637–645
- Ijichi H, Chytil A, Gorska AE, Aakre ME, Fujitani Y, Fujitani S, Wright CVE & Moses HL (2006) Aggressive pancreatic ductal adenocarcinoma in mice caused by pancreas-specific blockade of transforming growth factor-beta signaling in cooperation with active Kras expression. *Genes & Development* **20**: 3147–3160
- Imamura T, Takase M, Nishihara A, Oeda E, Hanai J, Kawabata M & Miyazono K (1997) Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily. *Nature* **389**: 622–626
- Imoto S, Ohbayashi N, Ikeda O, Kamitani S, Muromoto R, Sekine Y & Matsuda T (2008) Sumoylation of Smad3 stimulates its nuclear export during PIASy-mediated suppression of TGF-beta signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **370**: 359–365
- Isogai Z, Ono RN, Ushiro S, Keene DR, Chen Y, Mazziere R, Charbonneau NL, Reinhardt DP, Rifkin DB & Sakai LY (2003) Latent transforming growth factor beta-binding protein 1 interacts with fibrillin and is a microfibril-associated protein. *J. Biol. Chem.* **278**: 2750–2757

- Ito T, Williams JD, Fraser DJ & Phillips AO (2004) Hyaluronan regulates transforming growth factor-beta1 receptor compartmentalization. *J. Biol. Chem.* **279**: 25326–25332
- Itoh F, Divecha N, Brocks L, Oomen L, Janssen H, Calafat J, Itoh S & Dijke Pt PT (2002) The FYVE domain in Smad anchor for receptor activation (SARA) is sufficient for localization of SARA in early endosomes and regulates TGF-beta/Smad signalling. *Genes Cells* **7**: 321–331
- Itoh S, Ericsson J, Nishikawa J, Heldin CH & Dijke ten P (2000) The transcriptional co-activator P/CAF potentiates TGF-beta/Smad signaling. *Nucleic Acids Research* **28**: 4291–4298
- Ivanov AV, Peng H, Yurchenko V, Yap KL, Negorev DG, Schultz DC, Psulkowski E, Fredericks WJ, White DE, Maul GG, Sadofsky MJ, Zhou M-M & Rauscher FJ (2007) PHD domain-mediated E3 ligase activity directs intramolecular sumoylation of an adjacent bromodomain required for gene silencing. *Molecular Cell* **28**: 823–837
- Izutsu K, Kurokawa M, Imai Y, Maki K, Mitani K & Hirai H (2001) The corepressor CtBP interacts with Evi-1 to repress transforming growth factor beta signaling. *Blood* **97**: 2815–2822
- Jain S, Singhal S, Francis F, Hajdu C, Wang J-H, Suriawinata A, Wang Y-Q, Zhang M, Weinshel EH, Francois F, Pei Z-H, Lee P & Xu R-L (2011) Association of overexpression of TIF1 γ with colorectal carcinogenesis and advanced colorectal adenocarcinoma. *World J. Gastroenterol.* **17**: 3994–4000
- Jakobs A, Koehnke J, Himstedt F, Funk M, Korn B, Gaestel M & Niedenthal R (2007) Ubc9 fusion-directed SUMOylation (UFDS): a method to analyze function of protein SUMOylation. *Nat Meth* **4**: 245–250
- Janknecht R, Wells NJ & Hunter T (1998) TGF-beta-stimulated cooperation of smad proteins with the coactivators CBP/p300. *Genes & Development* **12**: 2114–2119
- Jhappan C, Geiser AG, Kordon EC, Bagheri D, Hennighausen L, Roberts AB, Smith GH & Merlino G (1993) Targeting expression of a transforming growth factor beta 1 transgene to the pregnant mammary gland inhibits alveolar development and lactation. *EMBO J.* **12**: 1835–1845
- Jin W, Kim B-C, Tognon C, Lee H-J, Patel S, Lannon CL, Maris JM, Triche TJ, Sorensen PHB & Kim S-J (2005) The ETV6-NTRK3 chimeric tyrosine kinase suppresses TGF-beta signaling by inactivating the TGF-beta type II receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**: 16239–16244
- Jones S, Zhang X, Parsons DW, Lin JC-H, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Kamiyama H, Jimeno A, Hong S-M, Fu B, Lin M-T, Calhoun ES, Kamiyama M, Walter K, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Hartigan J, Smith DR, et al (2008) Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science* **321**: 1801–1806
- Kaartinen V, Voncken JW, Shuler C, Warburton D, Bu D, Heisterkamp N & Groffen J (1995) Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF-beta 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction. *Nat. Genet.* **11**: 415–421

- Kamaraju AK & Roberts AB (2005) Role of Rho/ROCK and p38 MAP kinase pathways in transforming growth factor-beta-mediated Smad-dependent growth inhibition of human breast carcinoma cells in vivo. *J. Biol. Chem.* **280**: 1024–1036
- Kang JS, Saunier EF, Akhurst RJ & Derynck R (2008) The type I TGF- β receptor is covalently modified and regulated by sumoylation. *Nat. Cell Biol.* **10**: 654–664
- Kato Y, Habas R, Katsuyama Y, Näär AM & He X (2002) A component of the ARC/Mediator complex required for TGF beta/Nodal signalling. *Nature* **418**: 641–646
- Kavsak P, Rasmussen RK, Causing CG, Bonni S, Zhu H, Thomsen GH & Wrana JL (2000) Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Molecular Cell* **6**: 1365–1375
- Khetchoumian K, Teletin M, Mark M, Lerouge T, Cerviño M, Oulad-Abdelghani M, Chambon P & Losson R (2004) TIF1delta, a novel HP1-interacting member of the transcriptional intermediary factor 1 (TIF1) family expressed by elongating spermatids. *J. Biol. Chem.* **279**: 48329–48341
- Khetchoumian K, Teletin M, Tisserand J, Mark M, Herquel B, Ignat M, Zucman-Rossi J, Cammas F, Lerouge T, Thibault C, Metzger D, Chambon P & Losson R (2007) Loss of Trim24 (Tif1alpha) gene function confers oncogenic activity to retinoic acid receptor alpha. *Nat. Genet.* **39**: 1500–1506
- Kim J & Kaartinen V (2008) Generation of mice with a conditional allele for Trim33. *Genesis* **46**: 329–333
- Kim KK, Kugler MC, Wolters PJ, Robillard L, Galvez MG, Brumwell AN, Sheppard D & Chapman HA (2006) Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**: 13180–13185
- Kim SJ, Angel P, Lafyatis R, Hattori K, Kim KY, Sporn MB, Karin M & Roberts AB (1990) Autoinduction of transforming growth factor beta 1 is mediated by the AP-1 complex. *Molecular and Cellular Biology* **10**: 1492–1497
- Kingsley DM (1994) The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes & Development* **8**: 133–146
- Klugbauer S & Rabes HM (1999) The transcription coactivator HTIF1 and a related protein are fused to the RET receptor tyrosine kinase in childhood papillary thyroid carcinomas. *Oncogene* **18**: 4388–4393
- Knipscheer P, Flotho A, Klug H, Olsen JV, van Dijk WJ, Fish A, Johnson ES, Mann M, Sixma TK & Pichler A (2008) Ubc9 sumoylation regulates SUMO target discrimination. *Molecular Cell* **31**: 371–382
- Koinuma D, Shinozaki M, Komuro A, Goto K, Saitoh M, Hanyu A, Ebina M, Nukiwa T, Miyazawa K, Imamura T & Miyazono K (2003) Arkadia amplifies TGF-beta superfamily signalling through degradation of Smad7. *EMBO J.* **22**: 6458–6470

- Kolonin MG, Evans KW, Mani SA & Gomer RH (2012) Alternative origins of stroma in normal organs and disease. *Stem Cell Research* **8**: 312–323
- Komuro A, Imamura T, Saitoh M, Yoshida Y, Yamori T, Miyazono K & Miyazawa K (2004) Negative regulation of transforming growth factor-beta (TGF-beta) signaling by WW domain-containing protein 1 (WWP1). *Oncogene* **23**: 6914–6923
- Kondaiah P, Sands MJ, Smith JM, Fields A, Roberts AB, Sporn MB & Melton DA (1990) Identification of a novel transforming growth factor-beta (TGF-beta 5) mRNA in *Xenopus laevis*. *J. Biol. Chem.* **265**: 1089–1093
- Kong W, Yang H, He L, Zhao J-J, Coppola D, Dalton WS & Cheng JQ (2008) MicroRNA-155 is regulated by the transforming growth factor beta/Smad pathway and contributes to epithelial cell plasticity by targeting RhoA. *Molecular and Cellular Biology* **28**: 6773–6784
- Kowanetz M, Lönn P, Vanlandewijck M, Kowanetz K, Heldin C-H & Moustakas A (2008) TGFbeta induces SIK to negatively regulate type I receptor kinase signaling. *J. Cell Biol.* **182**: 655–662
- Kretschmar M, Doody J, Timokhina I & Massague J (1999) A mechanism of repression of TGFbeta/ Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes & Development* **13**: 804–816
- Kuang C, Xiao Y, Liu X, Stringfield TM, Zhang S, Wang Z & Chen Y (2006) In vivo disruption of TGF-beta signaling by Smad7 leads to premalignant ductal lesions in the pancreas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**: 1858–1863
- Kulesa H, Frampton J & Graf T (1995) GATA-1 reprograms avian myelomonocytic cell lines into eosinophils, thromboblats, and erythroblats. *Genes & Development* **9**: 1250–1262
- Kuratomi G, Komuro A, Goto K, Shinozaki M, Miyazawa K, Miyazono K & Imamura T (2005) NEDD4-2 (neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-2) negatively regulates TGF-beta (transforming growth factor-beta) signalling by inducing ubiquitin-mediated degradation of Smad2 and TGF-beta type I receptor. *Biochem. J.* **386**: 461–470
- Kurokawa M, Mitani K, Irie K, Matsuyama T, Takahashi T, Chiba S, Yazaki Y, Matsumoto K & Hirai H (1998) The oncoprotein Evi-1 represses TGF-beta signalling by inhibiting Smad3. *Nature* **394**: 92–96
- Kurose K, Gilley K, Matsumoto S, Watson PH, Zhou X-P & Eng C (2002) Frequent somatic mutations in PTEN and TP53 are mutually exclusive in the stroma of breast carcinomas. *Nat. Genet.* **32**: 355–357
- Kusy S, Gault N, Ferri F, Lewandowski D, Barroca V, Jaracz-Ros A, Losson R & Romeo P-H (2011) Adult hematopoiesis is regulated by TIF1 γ , a repressor of TAL1 and PU.1 transcriptional activity. *Cell Stem Cell* **8**: 412–425
- Labrador-Horrillo M, Martínez MA, Selva-O'Callaghan A, Trallero-Araguás E, Balada E, Vilardell-Tarrés M & Juárez C (2012) Anti-TIF1 γ antibodies (anti-p155) in adult patients with dermatomyositis: comparison of different diagnostic assays. *Ann. Rheum. Dis.* **71**

- Lack J, O'Leary JM, Knott V, Yuan X, Rifkin DB, Handford PA & Downing AK (2003) Solution structure of the third TB domain from LTBP1 provides insight into assembly of the large latent complex that sequesters latent TGF-beta. *Journal of Molecular Biology* **334**: 281–291
- Lagna G, Hata A, Hemmati-Brivanlou A & Massague J (1996) Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF-beta signalling pathways. *Nature* **383**: 832–836
- Lallemant F, Seo SR, Ferrand N, Pessah M, L'Hoste S, Rawadi G, Roman-Roman S, Camonis J & Atfi A (2005) AIP4 restricts transforming growth factor-beta signaling through a ubiquitination-independent mechanism. *J. Biol. Chem.* **280**: 27645–27653
- Lamouille S & Derynck R (2011) Emergence of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin axis in transforming growth factor- β -induced epithelial-mesenchymal transition. *Cells Tissues Organs* **193**: 8–22
- Landström M (2010) The TAK1-TRAF6 signalling pathway. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **42**: 585–589
- Lawler S, Feng XH, Chen RH, Maruoka EM, Turck CW, Griswold-Prenner I & Derynck R (1997) The type II transforming growth factor-beta receptor autophosphorylates not only on serine and threonine but also on tyrosine residues. *J. Biol. Chem.* **272**: 14850–14859
- Le Douarin B, Nielsen AL, You J, Chambon P & Losson R (1997) TIF1 alpha: a chromatin-specific mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors? *Biochem. Soc. Trans.* **25**: 605–612
- Le Provost F, Miyoshi K, Vilotte J-L, Bieri B, Robinson GW & Hennighausen L (2005) SOCS3 promotes apoptosis of mammary differentiated cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**: 1696–1701
- Le Roy C & Wrana JL (2005) Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 112–126
- Lee MK, Pardoux C, Hall MC, Lee PS, Warburton D, Qing J, Smith SM & Derynck R (2007) TGF-beta activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA. *EMBO J.* **26**: 3957–3967
- Lee PSW, Chang C, Liu D & Derynck R (2003) Sumoylation of Smad4, the common Smad mediator of transforming growth factor-beta family signaling. *J. Biol. Chem.* **278**: 27853–27863
- Levy L & Hill CS (2006) Alterations in components of the TGF-beta superfamily signaling pathways in human cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* **17**: 41–58
- Levy L, Howell M, Das D, Harkin S, Episkopou V & Hill CS (2007) Arkadia Activates Smad3/Smad4-Dependent Transcription by Triggering Signal-Induced SnoN Degradation. *Molecular and Cellular Biology* **27**: 6068–6083
- Liang M, Melchior F, Feng X-H & Lin X (2004) Regulation of Smad4 sumoylation and transforming growth factor-beta signaling by protein inhibitor of activated STAT1. *J. Biol. Chem.* **279**: 22857–22865

- Lidral AC, Romitti PA, Basart AM, Doetschman T, Leysens NJ, Daack-Hirsch S, Semina EV, Johnson LR, Machida J, Burds A, Parnell TJ, Rubenstein JL & Murray JC (1998) Association of MSX1 and TGFB3 with nonsyndromic clefting in humans. *Am. J. Hum. Genet.* **63**: 557–568
- Lin H-K, Bergmann S & Pandolfi PP (2004) Cytoplasmic PML function in TGF-beta signalling. *Nature* **431**: 205–211
- Lin SY & Elledge SJ (2003) Multiple tumor suppressor pathways negatively regulate telomerase. *Cell* **113**: 881–889
- Lin X, Duan X, Liang Y-Y, Su Y, Wrighton KH, Long J, Hu M, Davis CM, Wang J, Brunicardi FC, Shi Y, Chen Y-G, Meng A & Feng X-H (2006) PPM1A functions as a Smad phosphatase to terminate TGFbeta signaling. *Cell* **125**: 915–928
- Lin X, Liang M, Liang Y-Y, Brunicardi FC & Feng X-H (2003a) SUMO-1/Ubc9 promotes nuclear accumulation and metabolic stability of tumor suppressor Smad4. *J. Biol. Chem.* **278**: 31043–31048
- Lin X, Liang M, Liang Y-Y, Brunicardi FC, Melchior F & Feng X-H (2003b) Activation of transforming growth factor-beta signaling by SUMO-1 modification of tumor suppressor Smad4/DPC4. *J. Biol. Chem.* **278**: 18714–18719
- Liu F, Hata A, Baker JC, Doody J, Cárcamo J, Harland RM & Massague J (1996) A human Mad protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator. *Nature* **381**: 620–623
- Liu F, Pouponnot C & Massague J (1997) Dual role of the Smad4/DPC4 tumor suppressor in TGFbeta-inducible transcriptional complexes. *Genes & Development* **11**: 3157–3167
- Liu X, Sun Y, Weinberg RA & Lodish HF (2001) Ski/Sno and TGF-beta signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* **12**: 1–8
- Liu Z, Kobayashi K, van Dinther M, van Heiningen SH, Valdimarsdottir G, van Laar T, Scharpfenecker M, Löwik CWGM, Goumans M-J, Dijke ten P & Pardali E (2009) VEGF and inhibitors of TGFbeta type-I receptor kinase synergistically promote blood-vessel formation by inducing alpha5-integrin expression. *J. Cell. Sci.* **122**: 3294–3302
- Long J, Wang G, He D & Liu F (2004) Repression of Smad4 transcriptional activity by SUMO modification. *Biochem. J.* **379**: 23–29
- Lopez AR, Cook J, Deininger PL & Derynck R (1992) Dominant negative mutants of transforming growth factor-beta 1 inhibit the secretion of different transforming growth factor-beta isoforms. *Molecular and Cellular Biology* **12**: 1674–1679
- López-Casillas F, Wrana JL & Massague J (1993) Betaglycan presents ligand to the TGF beta signaling receptor. *Cell* **73**: 1435–1444
- Lönn P, Morén A, Raja E, Dahl M & Moustakas A (2009) Regulating the stability of TGFbeta receptors and Smads. *Cell Res* **19**: 21–35
- Luo K (2004) Ski and SnoN: negative regulators of TGF-beta signaling. *Current Opinion in Genetics & Development* **14**: 65–70

- Luo K & Lodish HF (1997) Positive and negative regulation of type II TGF-beta receptor signal transduction by autophosphorylation on multiple serine residues. *EMBO J.* **16**: 1970–1981
- Lyons RM, Gentry LE, Purchio AF & Moses HL (1990) Mechanism of activation of latent recombinant transforming growth factor beta 1 by plasmin. *J. Cell Biol.* **110**: 1361–1367
- Mani SA, Guo W, Liao M-J, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Brisken C, Yang J & Weinberg RA (2008) The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* **133**: 704–715
- Martin J, Jenkins RH, Bennagi R, Krupa A, Phillips AO, Bowen T & Fraser DJ (2011) Post-transcriptional regulation of Transforming Growth Factor Beta-1 by microRNA-744. *PLoS ONE* **6**: e25044
- Masclé XH, Germain-Desprez D, Huynh P, Estéphan P & Aubry M (2007) Sumoylation of the transcriptional intermediary factor 1beta (TIF1beta), the Co-repressor of the KRAB Multifinger proteins, is required for its transcriptional activity and is modulated by the KRAB domain. *J. Biol. Chem.* **282**: 10190–10202
- Massagué J (1998) TGF-beta signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **67**: 753–791
- Massagué J (2005) Smad transcription factors. *Genes & Development* **19**: 2783–2810
- Matsuura E, Ishiguro N, Katsumata Y, Urano W, Yamanaka H, Kondo M, Kuwana M, Kaji K, Hamaguchi Y, Fujimoto M & Kawashima M (2012) Two young-adult female cases of dermatomyositis with antibodies for transcriptional intermediary factor 1- γ . *Eur J Dermatol* **22**: 668–671
- Matsuura I, Denissova NG, Wang G, He D, Long J & Liu F (2004) Cyclin-dependent kinases regulate the antiproliferative function of Smads. *Nature* **430**: 226–231
- Matsuzaki K (2011) Smad phosphoisoform signaling specificity: the right place at the right time. *Carcinogenesis* **32**: 1578–1588
- Mäkelä TP, Alitalo R, Paulsson Y, Westermark B, Heldin CH & Alitalo K (1987) Regulation of platelet-derived growth factor gene expression by transforming growth factor beta and phorbol ester in human leukemia cell lines. *Molecular and Cellular Biology* **7**: 3656–3662
- McDonald OG, Wu H, Timp W, Doi A & Feinberg AP (2011) Genome-scale epigenetic reprogramming during epithelial-to-mesenchymal transition. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**: 867–874
- Melisi D, Ishiyama S, Sclabas GM, Fleming JB, Xia Q, Tortora G, Abbruzzese JL & Chiao PJ (2008) LY2109761, a novel transforming growth factor beta receptor type I and type II dual inhibitor, as a therapeutic approach to suppressing pancreatic cancer metastasis. *Mol. Cancer Ther.* **7**: 829–840

- Miles WO, Jaffray E, Campbell SG, Takeda S, Bayston LJ, Basu SP, Li M, Raftery LA, Ashe MP, Hay RT & Ashe HL (2008) Medea SUMOylation restricts the signaling range of the Dpp morphogen in the *Drosophila* embryo. *Genes & Development* **22**: 2578–2590
- Miyaki M, Iijima T, Konishi M, Sakai K, Ishii A, Yasuno M, Hishima T, Koike M, Shitara N, Iwama T, Utsunomiya J, Kuroki T & Mori T (1999) Higher frequency of Smad4 gene mutation in human colorectal cancer with distant metastasis. *Oncogene* **18**: 3098–3103
- Miyazono K, Olofsson A, Colosetti P & Heldin CH (1991) A role of the latent TGF-beta 1-binding protein in the assembly and secretion of TGF-beta 1. *EMBO J.* **10**: 1091–1101
- Mo Y-Y, Yu Y, Theodosiou E, Rachel Ee PL & Beck WT (2005) A role for Ubc9 in tumorigenesis. *Oncogene* **24**: 2677–2683
- Monteiro R, Pouget C & Patient R (2011) The gata1/pu.1 lineage fate paradigm varies between blood populations and is modulated by *tifl* γ . *EMBO J.* **30**: 1093–1103
- Morel A-P, Hinkal GW, Thomas C, Fauvet F, Courtois-Cox S, Wierinckx A, Devouassoux-Shisheboran M, Treilleux I, Tissier A, Gras B, Pourchet J, Puisieux I, Browne GJ, Spicer DB, Lachuer J, Ansieau S & Puisieux A (2012) EMT Inducers Catalyze Malignant Transformation of Mammary Epithelial Cells and Drive Tumorigenesis towards Claudin-Low Tumors in Transgenic Mice. *PLoS Genet.* **8**: e1002723
- Morel A-P, Lièvre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau S & Puisieux A (2008) Generation of Breast Cancer Stem Cells through Epithelial-Mesenchymal Transition. *PLoS ONE* **3**: e2888
- Moren A, Olofsson A, Stenman G, Sahlin P, Kanzaki T, Claesson-Welsh L, Dijke ten P, Miyazono K & Heldin CH (1994) Identification and characterization of LTBP-2, a novel latent transforming growth factor-beta-binding protein. *J. Biol. Chem.* **269**: 32469–32478
- Moren A, Raja E, Heldin CH & Moustakas A (2010) Negative Regulation of TGF β Signaling by the Kinase LKB1 and the Scaffolding Protein LIP1. *Journal of Biological Chemistry* **286**: 341–353
- Morén A, Imamura T, Miyazono K, Heldin C-H & Moustakas A (2005) Degradation of the tumor suppressor Smad4 by WW and HECT domain ubiquitin ligases. *J. Biol. Chem.* **280**: 22115–22123
- Mori S, Matsuzaki K, Yoshida K, Furukawa F, Tahashi Y, Yamagata H, Sekimoto G, Seki T, Matsui H, Nishizawa M, Fujisawa J-I & Okazaki K (2004) TGF-beta and HGF transmit the signals through JNK-dependent Smad2/3 phosphorylation at the linker regions. *Oncogene* **23**: 7416–7429
- Morsut L, Yan K-P, Enzo E, Aragona M, Soligo SM, Wendling O, Mark M, Khetchoumian K, Bressan G, Chambon P, Dupont S, Losson R & Piccolo S (2010) Negative control of Smad activity by ectoderm/Tif1 γ patterns the mammalian embryo. *Development* **137**: 2571–2578
- Moustakas A & Heldin CH (2009) The regulation of TGF β signal transduction. *Development* **136**: 3699–3714

- Mu Y, Sundar R, Thakur N, Ekman M, Gudey SK, Yakymovych M, Hermansson A, Dimitriou H, Bengoechea-Alonso MT, Ericsson J, Heldin C-H & Landström M (2011) TRAF6 ubiquitinates TGF β type I receptor to promote its cleavage and nuclear translocation in cancer. *Nat Commun* **2**: 330
- Muro Y, Ishikawa A, Sugiura K & Akiyama M (2012) Clinical features of anti-TIF1- α antibody-positive dermatomyositis patients are closely associated with coexistent dermatomyositis-specific autoantibodies and anti-TIF1- γ or anti-Mi-2 autoantibodies. *Rheumatology (Oxford)* **51**: 1508–1513
- Nakano A, Koinuma D, Miyazawa K, Uchida T, Saitoh M, Kawabata M, Hanai J-I, Akiyama H, Abe M, Miyazono K, Matsumoto T & Imamura T (2009) Pin1 down-regulates transforming growth factor-beta (TGF-beta) signaling by inducing degradation of Smad proteins. *J. Biol. Chem.* **284**: 6109–6115
- Nakao A, Afrakhte M, Moren A, Nakayama T, Christian JL, Heuchel R, Itoh S, Kawabata M, Heldin NE, Heldin CH & Dijke ten P (1997a) Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature* **389**: 631–635
- Nakao A, Imamura T, Souchelnytskyi S, Kawabata M, Ishisaki A, Oeda E, Tamaki K, Hanai J, Heldin CH, Miyazono K & Dijke ten P (1997b) TGF-beta receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4. *EMBO J.* **16**: 5353–5362
- Nerlov C & Graf T (1998) PU.1 induces myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *Genes & Development* **12**: 2403–2412
- Nielsen AL, Ortiz JA, You J, Oulad-Abdelghani M, Khechumian R, Gansmuller A, Chambon P & Losson R (1999) Interaction with members of the heterochromatin protein 1 (HP1) family and histone deacetylation are differentially involved in transcriptional silencing by members of the TIF1 family. *EMBO J.* **18**: 6385–6395
- Nishihara A, Hanai JI, Okamoto N, Yanagisawa J, Kato S, Miyazono K & Kawabata M (1998) Role of p300, a transcriptional coactivator, in signalling of TGF-beta. *Genes Cells* **3**: 613–623
- O'Connor-McCourt MD & Wakefield LM (1987) Latent transforming growth factor-beta in serum. A specific complex with alpha 2-macroglobulin. *J. Biol. Chem.* **262**: 14090–14099
- Ocaña OH, Córcoles R, Fabra Á, Moreno-Bueno G, Acloque H, Vega S, Barrallo-Gimeno A, Cano A & Nieto MA (2012) Metastatic Colonization Requires the Repression of the Epithelial-Mesenchymal Transition Inducer Prrx1. *Cancer Cell* **22**: 709–724
- Ohgushi M, Kuroki S, Fukamachi H, O'Reilly LA, Kuida K, Strasser A & Yonehara S (2005) Transforming growth factor beta-dependent sequential activation of Smad, Bim, and caspase-9 mediates physiological apoptosis in gastric epithelial cells. *Molecular and Cellular Biology* **25**: 10017–10028
- Ohshima T & Shimotohno K (2003) Transforming growth factor-beta-mediated signaling via the p38 MAP kinase pathway activates Smad-dependent transcription through SUMO-1 modification of Smad4. *J. Biol. Chem.* **278**: 50833–50842

- Olivares J, Kumar P, Yu Y, Maples PB, Senzer N, Bedell C, Barve M, Tong A, Pappen BO, Kuhn J, Magee M, Wallraven G & Nemunaitis J (2011) Phase I trial of TGF-beta 2 antisense GM-CSF gene-modified autologous tumor cell (TAG) vaccine. *Clin Cancer Res* **17**: 183–192
- Olofsson A, Ichijo H, Moren A, Dijke ten P, Miyazono K & Heldin CH (1995) Efficient association of an amino-terminally extended form of human latent transforming growth factor-beta binding protein with the extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* **270**: 31294–31297
- Onichtchouk D, Chen YG, Dosch R, Gawantka V, Delius H, Massague J & Niehrs C (1999) Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature* **401**: 480–485
- Ota T, Fujii M, Sugizaki T, Ishii M, Miyazawa K, Aburatani H & Miyazono K (2002) Targets of transcriptional regulation by two distinct type I receptors for transforming growth factor-beta in human umbilical vein endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* **193**: 299–318
- Ozdamar B (2005) Regulation of the Polarity Protein Par6 by TGF Receptors Controls Epithelial Cell Plasticity. *Science* **307**: 1603–1609
- Padua D, Zhang XHF, Wang Q, Nadal C, Gerald WL, Gomis RR & Massagué J (2008) TGFβ Primes Breast Tumors for Lung Metastasis Seeding through Angiopoietin-like 4. *Cell* **133**: 66–77
- Papageorgis P, Lambert AW, Ozturk S, Gao F, Pan H, Manne U, Alekseyev YO, Thiagalingam A, Abdolmaleky HM, Lenburg M & Thiagalingam S (2010) Smad Signaling Is Required to Maintain Epigenetic Silencing during Breast Cancer Progression. *Cancer Research* **70**: 968–978
- Pardali K, Kurisaki A, Moren A, Dijke ten P, Kardassis D & Moustakas A (2000) Role of Smad proteins and transcription factor Sp1 in p21(Waf1/Cip1) regulation by transforming growth factor-beta. *J. Biol. Chem.* **275**: 29244–29256
- Peng H, Feldman I & Rauscher FJ III (2002) Hetero-oligomerization Among the TIF Family of RBCC/TRIM Domain-containing Nuclear Cofactors: A Potential Mechanism for Regulating the Switch Between Coactivation and Corepression. *Journal of Molecular Biology* **320**: 629–644
- Petersen OW, Nielsen HL, Gudjonsson T, Villadsen R, Rank F, Niebuhr E, Bissell MJ & Rønnov-Jessen L (2003) Epithelial to mesenchymal transition in human breast cancer can provide a nonmalignant stroma. *Am. J. Pathol.* **162**: 391–402
- Pierce DF, Gorska AE, Chytil A, Meise KS, Page DL, Coffey RJ & Moses HL (1995) Mammary tumor suppression by transforming growth factor beta 1 transgene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**: 4254–4258
- Pietenpol JA, Holt JT, Stein RW & Moses HL (1990) Transforming growth factor beta 1 suppression of c-myc gene transcription: role in inhibition of keratinocyte proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**: 3758–3762
- Pouponnot C, Jayaraman L & Massague J (1998) Physical and functional interaction of SMADs and p300/CBP. *J. Biol. Chem.* **273**: 22865–22868

- Price DH (2008) Poised polymerases: on your mark...get set...go! *Molecular Cell* **30**: 7–10
- Prunier C, Ferrand N, Frottier B, Pessah M & Atfi A (2001) Mechanism for mutational inactivation of the tumor suppressor Smad2. *Molecular and Cellular Biology* **21**: 3302–3313
- Ransom DG, Bahary N, Niss K, Traver D, Burns C, Trede NS, Paffett-Lugassy N, Saganic WJ, Lim CA, Hersey C, Zhou Y, Barut BA, Lin S, Kingsley PD, Palis J, Orkin SH & Zon LI (2004) The zebrafish moonshine gene encodes transcriptional intermediary factor 1gamma, an essential regulator of hematopoiesis. *PLoS Biol.* **2**: E237
- Ransom DG, Haffter P, Odenthal J, Brownlie A, Vogelsang E, Kelsh RN, Brand M, van Eeden FJ, Furutani-Seiki M, Granato M, Hammerschmidt M, Heisenberg CP, Jiang YJ, Kane DA, Mullins MC & Nüsslein-Volhard C (1996) Characterization of zebrafish mutants with defects in embryonic hematopoiesis. *Development* **123**: 311–319
- Reguly T & Wrana JL (2003) In or out? The dynamics of Smad nucleocytoplasmic shuttling. *Trends in Cell Biology* **13**: 216–220
- Reynisdóttir I, Polyak K, Iavarone A & Massague J (1995) Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta. *Genes & Development* **9**: 1831–1845
- Roberts AB & Wakefield LM (2003) The two faces of transforming growth factor beta in carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**: 8621–8623
- Robinson SD, Silberstein GB, Roberts AB, Flanders KC & Daniel CW (1991) Regulated expression and growth inhibitory effects of transforming growth factor-beta isoforms in mouse mammary gland development. *Development* **113**: 867–878
- Roelen BAJ, Cohen OS, Raychowdhury MK, Chadee DN, Zhang Y, Kyriakis JM, Alessandrini AA & Lin HY (2003) Phosphorylation of threonine 276 in Smad4 is involved in transforming growth factor-beta-induced nuclear accumulation. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **285**: C823–30
- Ross S, Cheung E, Petrakis TG, Howell M, Kraus WL & Hill CS (2006) Smads orchestrate specific histone modifications and chromatin remodeling to activate transcription. *EMBO J.* **25**: 4490–4502
- Saharinen J, Taipale J & Keski-Oja J (1996) Association of the small latent transforming growth factor-beta with an eight cysteine repeat of its binding protein LTBP-1. *EMBO J.* **15**: 245–253
- Sanford LP, Ormsby I, Gittenberger-de Groot AC, Sariola H, Friedman R, Boivin GP, Cardell EL & Doetschman T (1997) TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Development* **124**: 2659–2670
- Savage C, Das P, Finelli AL, Townsend SR, Sun CY, Baird SE & Padgett RW (1996) Caenorhabditis elegans genes sma-2, sma-3, and sma-4 define a conserved family of transforming growth factor beta pathway components. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**: 790–794

- Sánchez-Tilló E, Liu Y, de Barrios O, Siles L, Fanlo L, Cuatrecasas M, Darling DS, Dean DC, Castells A & Postigo A (2012) EMT-activating transcription factors in cancer: beyond EMT and tumor invasiveness. *Cell. Mol. Life Sci.*
- Scandura JM, Boccuni P, Massagué J & Nimer SD (2004) Transforming growth factor beta-induced cell cycle arrest of human hematopoietic cells requires p57KIP2 up-regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**: 15231–15236
- Schultz DC, Friedman JR & Rauscher FJ (2001) Targeting histone deacetylase complexes via KRAB-zinc finger proteins: the PHD and bromodomains of KAP-1 form a cooperative unit that recruits a novel isoform of the Mi-2alpha subunit of NuRD. *Genes & Development* **15**: 428–443
- Schultz-Cherry S & Murphy-Ullrich JE (1993) Thrombospondin causes activation of latent transforming growth factor-beta secreted by endothelial cells by a novel mechanism. *J. Cell Biol.* **122**: 923–932
- Seeler JS, Marchio A, Losson R, Desterro JM, Hay RT, Chambon P & Dejean A (2001) Common properties of nuclear body protein SP100 and TIF1alpha chromatin factor: role of SUMO modification. *Molecular and Cellular Biology* **21**: 3314–3324
- Sekelsky JJ, Newfeld SJ, Raftery LA, Chartoff EH & Gelbart WM (1995) Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **139**: 1347–1358
- Seo SR, Ferrand N, Faresse N, Prunier C, Abécassis L, Pessah M, Bourgeade M-F & Atfi A (2006) Nuclear retention of the tumor suppressor cPML by the homeodomain protein TGIF restricts TGF-beta signaling. *Molecular Cell* **23**: 547–559
- Seo SR, Lallemand F, Ferrand N, Pessah M, L'Hoste S, Camonis J & Atfi A (2004) The novel E3 ubiquitin ligase Tiul1 associates with TGIF to target Smad2 for degradation. *EMBO J.* **23**: 3780–3792
- Seoane J (2004) p21(WAF1/CIP1) at the switch between the anti-oncogenic and oncogenic faces of TGFbeta. *Cancer Biol. Ther.* **3**: 226–227
- Seoane J (2006) Escaping from the TGFbeta anti-proliferative control. *Carcinogenesis* **27**: 2148–2156
- Seoane J, Le H-V, Shen L, Anderson SA & Massagué J (2004) Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. *Cell* **117**: 211–223
- Sha X, Yang L & Gentry LE (1991) Identification and analysis of discrete functional domains in the pro region of pre-pro-transforming growth factor beta 1. *J. Cell Biol.* **114**: 827–839
- Shi W, Sun C, He B, Xiong W, Shi X, Yao D & Cao X (2004) GADD34-PP1c recruited by Smad7 dephosphorylates TGFbeta type I receptor. *J. Cell Biol.* **164**: 291–300
- Shi Y, Wang YF, Jayaraman L, Yang H, Massague J & Pavletich NP (1998) Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-beta signaling. *Cell* **94**: 585–594

- Shimo T, Kubota S, Yoshioka N, Ibaragi S, Isowa S, Eguchi T, Sasaki A & Takigawa M (2006) Pathogenic role of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in osteolytic metastasis of breast cancer. *J. Bone Miner. Res.* **21**: 1045–1059
- Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, Allen R, Sidman C, Proetzel G & Calvin D (1992) Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* **359**: 693–699
- Siegel PM, Shu W, Cardiff RD, Muller WJ & Massagué J (2003) Transforming growth factor beta signaling impairs Neu-induced mammary tumorigenesis while promoting pulmonary metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**: 8430–8435
- Silberstein GB & Daniel CW (1987) Investigation of mouse mammary ductal growth regulation using slow-release plastic implants. *J. Dairy Sci.* **70**: 1981–1990
- Simonsson M, Kanduri M, Grönroos E, Heldin C-H & Ericsson J (2006) The DNA binding activities of Smad2 and Smad3 are regulated by coactivator-mediated acetylation. *J. Biol. Chem.* **281**: 39870–39880
- Soo C, Hu FY, Zhang X, Wang Y, Beanes SR, Lorenz HP, Hedrick MH, Mackool RJ, Plaas A, Kim SJ, Longaker MT, Freymiller E & Ting K (2000) Differential expression of fibromodulin, a transforming growth factor-beta modulator, in fetal skin development and scarless repair. *Am. J. Pathol.* **157**: 423–433
- Sorrentino A, Thakur N, Grimsby S, Marcusson A, Bulow von V, Schuster N, Zhang S, Heldin C-H & Landström M (2008) The type I TGF-beta receptor engages TRAF6 to activate TAK1 in a receptor kinase-independent manner. *Nat. Cell Biol.* **10**: 1199–1207
- Souchelnytskyi S, Dijke ten P, Miyazono K & Heldin CH (1996) Phosphorylation of Ser165 in TGF-beta type I receptor modulates TGF-beta1-induced cellular responses. *EMBO J.* **15**: 6231–6240
- Sripathy SP, Stevens J & Schultz DC (2006) The KAP1 corepressor functions to coordinate the assembly of de novo HP1-demarcated microenvironments of heterochromatin required for KRAB zinc finger protein-mediated transcriptional repression. *Molecular and Cellular Biology* **26**: 8623–8638
- Strutz F, Zeisberg M, Renziehausen A, Raschke B, Becker V, van Kooten C & Müller G (2001) TGF-beta 1 induces proliferation in human renal fibroblasts via induction of basic fibroblast growth factor (FGF-2). *Kidney Int.* **59**: 579–592
- Su Y, Zhang L, Gao X, Meng F, Wen J, Zhou H, Meng A & Chen Y-G (2007) The evolutionally conserved activity of Dapper2 in antagonizing TGF-beta signaling. *FASEB J.* **21**: 682–690
- SUMO-Specific Protease 1 Is Essential for Stabilization of HIF1 α during Hypoxia (2007) SUMO-Specific Protease 1 Is Essential for Stabilization of HIF1 α during Hypoxia. **131**: 584–595 Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867407011439>
- Tachibana I, Imoto M, Adjei PN, Gores GJ, Subramaniam M, Spelsberg TC & Urrutia R (1997) Overexpression of the TGFbeta-regulated zinc finger encoding gene, TIEG, induces apoptosis in pancreatic epithelial cells. *J. Clin. Invest.* **99**: 2365–2374

- Taipale J, Saharinen J & Keski-Oja J (1998) Extracellular matrix-associated transforming growth factor-beta: role in cancer cell growth and invasion. *Adv. Cancer Res.* **75**: 87–134
- Teicher BA (2001) Malignant cells, directors of the malignant process: role of transforming growth factor-beta. *Cancer Metastasis Rev* **20**: 133–143
- Teicher BA, Ikebe M, Ara G, Keyes SR & Herbst RS (1997) Transforming growth factor-beta 1 overexpression produces drug resistance in vivo: reversal by decorin. *In Vivo* **11**: 463–472
- Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ & Nieto MA (2009) Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* **139**: 871–890
- Thomas DA & Massagué J (2005) TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell* **8**: 369–380
- Tirard M, Hsiao H-H, Nikolov M, Urlaub H, Melchior F & Brose N (2012) In vivo localization and identification of SUMOylated proteins in the brain of His6-HA-SUMO1 knock-in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**: 21122–21127
- Tiwari N, Gheldof A, Tatari M & Christofori G (2012) EMT as the ultimate survival mechanism of cancer cells. *Semin. Cancer Biol.* **22**: 194–207
- Topper JN, DiChiara MR, Brown JD, Williams AJ, Falb D, Collins T & Gimbrone MA (1998) CREB binding protein is a required coactivator for Smad-dependent, transforming growth factor beta transcriptional responses in endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 9506–9511
- Torre-Amione G, Beauchamp RD, Koeppen H, Park BH, Schreiber H, Moses HL & Rowley DA (1990) A highly immunogenic tumor transfected with a murine transforming growth factor type beta 1 cDNA escapes immune surveillance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**: 1486–1490
- Tram E, Ibrahim-Zada I, Briollais L, Knight JA, Andrulis IL & Ozcelik H (2011) Identification of germline alterations of the mad homology 2 domain of SMAD3 and SMAD4 from the Ontario site of the breast cancer family registry (CFR). *Breast Cancer Res.* **13**: R77
- Tsai JH, Donaher JL, Murphy DA, Chau S & Yang J (2012) Spatiotemporal Regulation of Epithelial-Mesenchymal Transition Is Essential for Squamous Cell Carcinoma Metastasis. *Cancer Cell* **22**: 725–736
- Tsai W-W, Wang Z, Yiu TT, Akdemir KC, Xia W, Winter S, Tsai C-Y, Shi X, Schwarzer D, Plunkett W, Aronow B, Gozani O, Fischle W, Hung M-C, Patel DJ & Barton MC (2010) TRIM24 links a non-canonical histone signature to breast cancer. *Nature* **468**: 927–932
- Tsukazaki T, Chiang TA, Davison AF, Attisano L & Wrana JL (1998) SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor. *Cell* **95**: 779–791
- Tu AW & Luo K (2007) Acetylation of Smad2 by the co-activator p300 regulates activin and transforming growth factor beta response. *J. Biol. Chem.* **282**: 21187–21196

- Umans L, Serneels L, Overbergh L, Lorent K, Van Leuven F & Van den Berghe H (1995) Targeted inactivation of the mouse alpha 2-macroglobulin gene. *J. Biol. Chem.* **270**: 19778–19785
- Unsöld C, Hyytiäinen M, Bruckner-Tuderman L & Keski-Oja J (2001) Latent TGF-beta binding protein LTBP-1 contains three potential extracellular matrix interacting domains. *J. Cell. Sci.* **114**: 187–197
- Valderrama-Carvajal H, Cocolakis E, Lacerte A, Lee E-H, Krystal G, Ali S & Lebrun J-J (2002) Activin/TGF-beta induce apoptosis through Smad-dependent expression of the lipid phosphatase SHIP. *Nat. Cell Biol.* **4**: 963–969
- Valdés F, Alvarez AM, Locascio A, Vega S, Herrera B, Fernández M, Benito M, Nieto MA & Fabregat I (2002) The epithelial mesenchymal transition confers resistance to the apoptotic effects of transforming growth factor Beta in fetal rat hepatocytes. *Mol. Cancer Res.* **1**: 68–78
- Venturini L, You J, Stadler M, Galien R, Lallemand V, Koken MH, Mattei MG, Ganser A, Chambon P, Losson R & de Thé H (1999) TIF1gamma, a novel member of the transcriptional intermediary factor 1 family. *Oncogene* **18**: 1209–1217
- Vincent DF, Gout J, Chuvin N, Arfi V, Pommier RM, Bertolino P, Jonckheere N, Ripoche D, Kaniewski B, Martel S, Langlois J-B, Goddard-Leon S, Colombe A, Janier M, Van Seuning I, Losson R, Valcourt U, Treilleux I, Dubus P, Bardeesy N, et al (2012) Tify Suppresses Murine Pancreatic Tumoral Transformation by an Smad4-Independent Pathway. *Am. J. Pathol.*
- Vincent DF, Yan K-P, Treilleux I, Gay F, Arfi V, Kaniewski B, Kaniewsky B, Marie JC, Lepinasse F, Martel S, Goddard-Leon S, Iovanna JL, Dubus P, Garcia S, Puisieux A, Rimokh R, Bardeesy N, Scoazec J-Y, Losson R & Bartholin L (2009) Inactivation of TIF1gamma cooperates with Kras to induce cystic tumors of the pancreas. *PLoS Genet.* **5**: e1000575
- Vink EI, Yondola MA, Wu K & Hearing P (2011) Adenovirus E4-ORF3-dependent relocalization of TIF1 α and TIF1 γ relies on access to the Coiled-Coil motif. *Virology*
- Wan M, Cao X, Wu Y, Bai S, Wu L, Shi X, Wang N & Cao X (2002) Jab1 antagonizes TGF-beta signaling by inducing Smad4 degradation. *EMBO Rep* **3**: 171–176
- Wang B, Suzuki H & Kato M (2008) Roles of mono-ubiquitinated Smad4 in the formation of Smad transcriptional complexes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **376**: 288–292
- Wang C, Ivanov A, Chen L, Fredericks WJ, Seto E, Rauscher FJ & Chen J (2005) MDM2 interaction with nuclear corepressor KAP1 contributes to p53 inactivation. *EMBO J.* **24**: 3279–3290
- Webb DJ, Wen J, Lysiak JJ, Umans L, Van Leuven F & Gonias SL (1996) Murine alpha-macroglobulins demonstrate divergent activities as neutralizers of transforming growth factor-beta and as inducers of nitric oxide synthesis. A possible mechanism for the endotoxin insensitivity of the alpha2-macroglobulin gene knock-out mouse. *J. Biol. Chem.* **271**: 24982–24988

- Wieser R, Wrana JL & Massague J (1995) GS domain mutations that constitutively activate T beta R-I, the downstream signaling component in the TGF-beta receptor complex. *EMBO J.* **14**: 2199–2208
- Wolfrain LA, Walz TM, James Z, Fernandez T & Letterio JJ (2004) p21Cip1 and p27Kip1 act in synergy to alter the sensitivity of naive T cells to TGF-beta-mediated G1 arrest through modulation of IL-2 responsiveness. *J. Immunol.* **173**: 3093–3102
- Wong C, Rougier-Chapman EM, Frederick JP, Datto MB, Liberati NT, Li JM & Wang XF (1999) Smad3-Smad4 and AP-1 complexes synergize in transcriptional activation of the c-Jun promoter by transforming growth factor beta. *Molecular and Cellular Biology* **19**: 1821–1830
- Wotton D, Lo RS, Lee S & Massague J (1999) A Smad transcriptional corepressor. *Cell* **97**: 29–39
- Wrighton KH, Lin X & Feng X-H (2008) Critical regulation of TGFbeta signaling by Hsp90. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 9244–9249
- Wrighton KH, Lin X & Feng X-H (2009) Phospho-control of TGF- β superfamily signaling. *Cell Res* **19**: 8–20
- Wrighton KH, Willis D, Long J, Liu F, Lin X & Feng X-H (2006) Small C-terminal domain phosphatases dephosphorylate the regulatory linker regions of Smad2 and Smad3 to enhance transforming growth factor-beta signaling. *J. Biol. Chem.* **281**: 38365–38375
- Wu JW, Krawitz AR, Chai J, Li W, Zhang F, Luo K & Shi Y (2002) Structural mechanism of Smad4 recognition by the nuclear oncoprotein Ski: insights on Ski-mediated repression of TGF-beta signaling. *Cell* **111**: 357–367
- Wu X, Ma J, Han J-D, Wang N & Chen Y-G (2006) Distinct regulation of gene expression in human endothelial cells by TGF-beta and its receptors. *Microvasc. Res.* **71**: 12–19
- Xi Q, Wang Z, Zaromytidou A-I, Zhang XHF, Chow-Tsang L-F, Liu JX, Kim H, Barlas A, Manova-Todorova K, Kaartinen V, Studer L, Mark W, Patel DJ & Massagué J (2011) A Poised Chromatin Platform for TGF- β Access to Master Regulators. *Cell* **147**: 1511–1524
- Xu J & Attisano L (2000) Mutations in the tumor suppressors Smad2 and Smad4 inactivate transforming growth factor beta signaling by targeting Smads to the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**: 4820–4825
- Xu L, Kang Y, Cöl S & Massagué J (2002) Smad2 nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins CAN/Nup214 and Nup153 feeds TGFbeta signaling complexes in the cytoplasm and nucleus. *Molecular Cell* **10**: 271–282
- Xu P, Liu J & Derynck R (2012) Post-translational regulation of TGF- β receptor and Smad signaling. *FEBS Letters* **586**: 1871–1884
- Yahata T, de Caestecker MP, Lechleider RJ, Andriole S, Roberts AB, Isselbacher KJ & Shioda T (2000) The MSG1 non-DNA-binding transactivator binds to the p300/CBP coactivators, enhancing their functional link to the Smad transcription factors. *J. Biol. Chem.* **275**: 8825–8834

- Yan K-P, Dollé P, Mark M, Lerouge T, Wendling O, Chambon P & Losson R (2004) Molecular cloning, genomic structure, and expression analysis of the mouse transcriptional intermediary factor 1 gamma gene. *Gene* **334**: 3–13
- Yan X, Liu Z & Chen Y (2009) Regulation of TGF-beta signaling by Smad7. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* **41**: 263–272
- Yao D, Ehrlich M, Henis YI & Leof EB (2002) Transforming growth factor-beta receptors interact with AP2 by direct binding to beta2 subunit. *Mol. Biol. Cell* **13**: 4001–4012
- Yeh ETH (2008) SUMOylation and De-SUMOylation: Wrestling with Life's Processes. *Journal of Biological Chemistry* **284**: 8223–8227
- Yi JY, Shin I & Arteaga CL (2005) Type I transforming growth factor beta receptor binds to and activates phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.* **280**: 10870–10876
- Yin JJ, Selander K, Chirgwin JM, Dallas M, Grubbs BG, Wieser R, Massague J, Mundy GR & Guise TA (1999) TGF-beta signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development. *J. Clin. Invest.* **103**: 197–206
- Yoo J, Ghiassi M, Jirmanova L, Balliet AG, Hoffman B, Fornace AJ, Liebermann DA, Böttinger EP & Roberts AB (2003) Transforming growth factor-beta-induced apoptosis is mediated by Smad-dependent expression of GADD45b through p38 activation. *J. Biol. Chem.* **278**: 43001–43007
- Yu J, Pan L, Qin X, Chen H, Xu Y, Chen Y & Tang H (2010) MTMR4 attenuates transforming growth factor beta (TGFbeta) signaling by dephosphorylating R-Smads in endosomes. *Journal of Biological Chemistry* **285**: 8454–8462
- Yu Q & Stamenkovic I (2000) Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes & Development* **14**: 163–176
- Zhang J, Houston DW, King ML, Payne C, Wylie C & Heasman J (1998) The role of maternal VegT in establishing the primary germ layers in *Xenopus* embryos. *Cell* **94**: 515–524
- Zhang W, Jiang Y, Wang Q, Ma X, Xiao Z, Zuo W, Fang X & Chen Y-G (2009) Single-molecule imaging reveals transforming growth factor-beta-induced type II receptor dimerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 15679–15683
- Zhang XL, Topley N, Ito T & Phillips A (2005) Interleukin-6 regulation of transforming growth factor (TGF)-beta receptor compartmentalization and turnover enhances TGF-beta1 signaling. *J. Biol. Chem.* **280**: 12239–12245
- Zhang Y, Feng X, We R & Derynck R (1996) Receptor-associated Mad homologues synergize as effectors of the TGF-beta response. *Nature* **383**: 168–172
- Zhou S, Zawel L, Lengauer C, Kinzler KW & Vogelstein B (1998) Characterization of human FAST-1, a TGF beta and activin signal transducer. *Molecular Cell* **2**: 121–127

- Zhou W, Ryan JJ & Zhou H (2004) Global analyses of sumoylated proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. Induction of protein sumoylation by cellular stresses. *J. Biol. Chem.* **279**: 32262–32268
- Zhu H, Kavsak P, Abdollah S, Wrana JL & Thomsen GH (1999) A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation. *Nature* **400**: 687–693
- Zhu Q & Luo K (2012) SnoN in regulation of embryonic development and tissue morphogenesis. *FEBS Letters* **586**: 1971–1976
- Zhu Y, Richardson JA, Parada LF & Graff JM (1998) Smad3 mutant mice develop metastatic colorectal cancer. *Cell* **94**: 703–714
- Zilberberg L, Todorovic V, Dabovic B, Horiguchi M, Couroussé T, Sakai LY & Rifkin DB (2012) Specificity of latent TGF- β binding protein (LTBP) incorporation into matrix: role of fibrillins and fibronectin. *J. Cell. Physiol.*

Récepteurs				Molécules régulatrices		
Ligand	Type II	Type I	R-Smads	Co-récepteurs	(interaction directe avec le ligand)	
TGF-β	TGF-β RII	ALK-5 ALK-2 ALK-1	Smad2/3 Smad1/5/8	Betaglycan (TGF-β2) * Endoglin (ALK-1 specific) CD109	α ₂ -Macroglobulin BAMBI/NMA * Biglycan Cripto * Decorin	KCP/Crim 2 LAP Soluble Betaglycan Soluble TGF-β RII
Activin	Act RII/IIB	ALK-4 ALK-2	Smad2/3 Smad1/5/8		Activin AC/BC/AE/CE BAMBI/NMA * Cripto DAN FLRG	Endoglin Follistatin Inhibin: Betaglycan * KCP/Crim 2 Soluble Act RII/IIB
Inhibin	Act RII/IIB BMP RII/IIB	--	--	Betaglycan †		
BMP	BMP RII/IIB Act RII/IIB	ALK-1 ALK-2 ALK-3 ALK-6 ALK-4 ALK-5 ALK-7 ALK-2	Smad1/5/8 Smad2/3 Smad1/5/8	RGM-A/-B/-C	BAMBI/NMA * Chordin: Tsg Endoglin FLRG Follistatin Gremlin Inhibin: Betaglycan * KCP/Crim 2	Nodal: BMP-7 Noggin Noggin: SOST PRDC Soluble ALK-3 SOST USAG-1
GDF	BMP RII Act RIIIB	ALK-5 ALK-6 ALK-4 ALK-5 ALK-6	Smad2/3 Smad1/5/8 Smad2/3 Smad1/5/8	Cripto (GDF-1/3) †	DAN Follistatin Propeptide (GDF-8,11)	
Nodal	Act RII/IIB	ALK-4 ALK-7	Smad2/3	Cripto †	BMP-7: Nodal Cerberus	DAN Lefty
Lefty	Act RII/IIB	--	--	Cripto (+Nodal) †		
MIS	MIS RII	ALK-2 ALK-3 ALK-6	Smad1/5/8		Abbreviations: MIS: Müllerian Inhibiting Substance BAMBI: BMP and Activin Membrane-Bound Inhibitor KCP: Kielin/Chordin-like Protein FLRG: Follistatin-Related Gene	ALK: Activin-Like Kinase Tsg: Twisted Gastrulation PRDC: Protein Related to DAN and Cerberus SOST: Sclerostin USAG-1: Uterine Sensitization-Associated Gene-1

† : Requis ; * : Lié à la membrane plasmique

Tableau 1 : Les différents membres de la superfamille du TGFβ et les protéines impliquées dans leur voie de signalisation respective

Ce tableau récapitule la classification des différents membres de la superfamille du TGFβ (en vert), les complexes de récepteurs associés à chaque membre (récepteur de type II en bleu et récepteur de type I en violet), les protéines Smad associées aux récepteurs (en orange) ainsi que les éventuels co-récepteurs connus. Enfin, ce tableau présente une liste des molécules régulant directement l'activité ou la disponibilité du ligand.

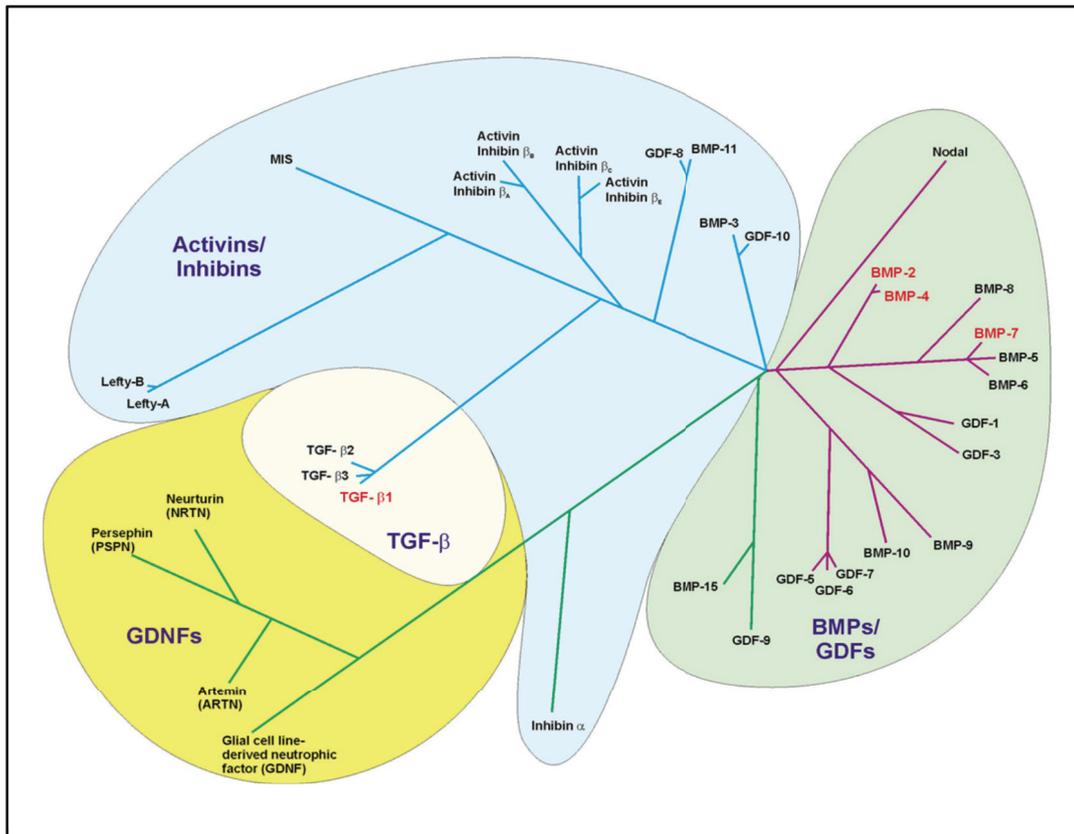


Figure 1 : Représentation phylogénétique de la superfamille du TGFβ
(extrait de Weiskirchen et al, 2009, Frontiers in Bioscience)

Sur la base de leurs caractéristiques structurales, les 40 membres de la famille des TGFβ chez les Mammifères sont subdivisés en (i) TGFβ, (ii) Activines / inhibines, (iii) les Bone Morphogenetic Protein (BMPs) / facteurs de croissance et de différenciation (GDFs), et (iv) le groupe plus distant des ligands GDNF.

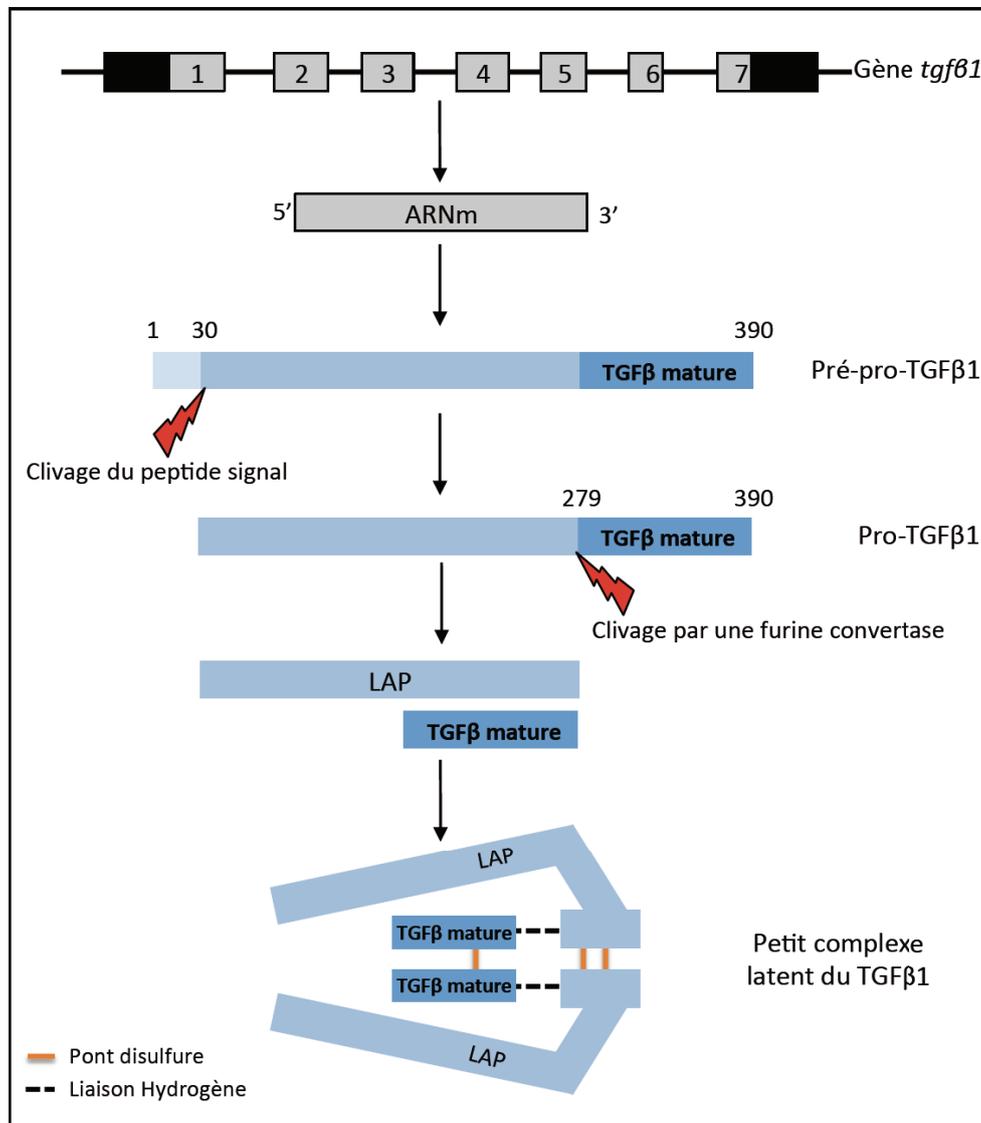


Figure 2 : Représentation schématique de la biosynthèse et de la maturation du TGFβ1

Le gène $tgfb1$ constitué de 7 exons permet la synthèse d'une forme biologiquement inerte : le pré-pro-TGFβ1. Après clivage du peptide signal, le pro-TGFβ1 subit un clivage par une endopeptidase de type furine convertase dans l'appareil de Golgi. Le domaine C-terminal donne naissance au monomère de TGFβ1 et la partie N-terminal correspond au LAP (Latency Associated Protein). Le petit complexe latent du TGFβ est formé de l'association du dimère de TGFβ1 au dimère de LAP grâce à des liaisons Hydrogène.

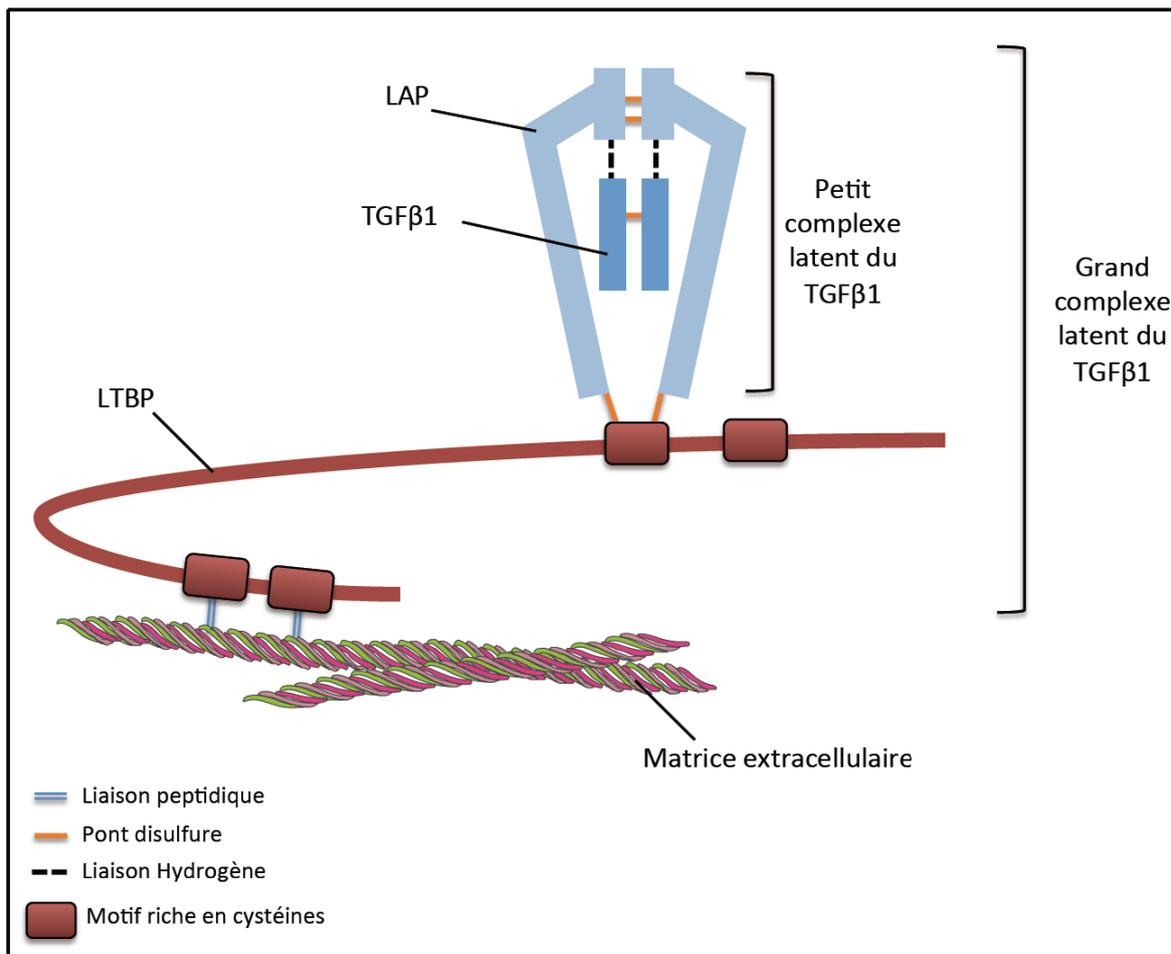


Figure 3 : Représentation schématique du grand complexe latent du TGFβ1
(d'après Annes et al, 2003)

Le petit complexe latent du TGFβ1 s'associe à la glycoprotéine soluble LTBP (Latent TGFβ1-Binding Protein) pour former le grand complexe latent du TGFβ1. Les motifs riches en résidus Cystéine de la protéine LTBP permettent la liaison du grand complexe latent à des protéines de la matrice extra-cellulaire telles que le collagène, la fibronectine, l'élastine ou la fibrilline.

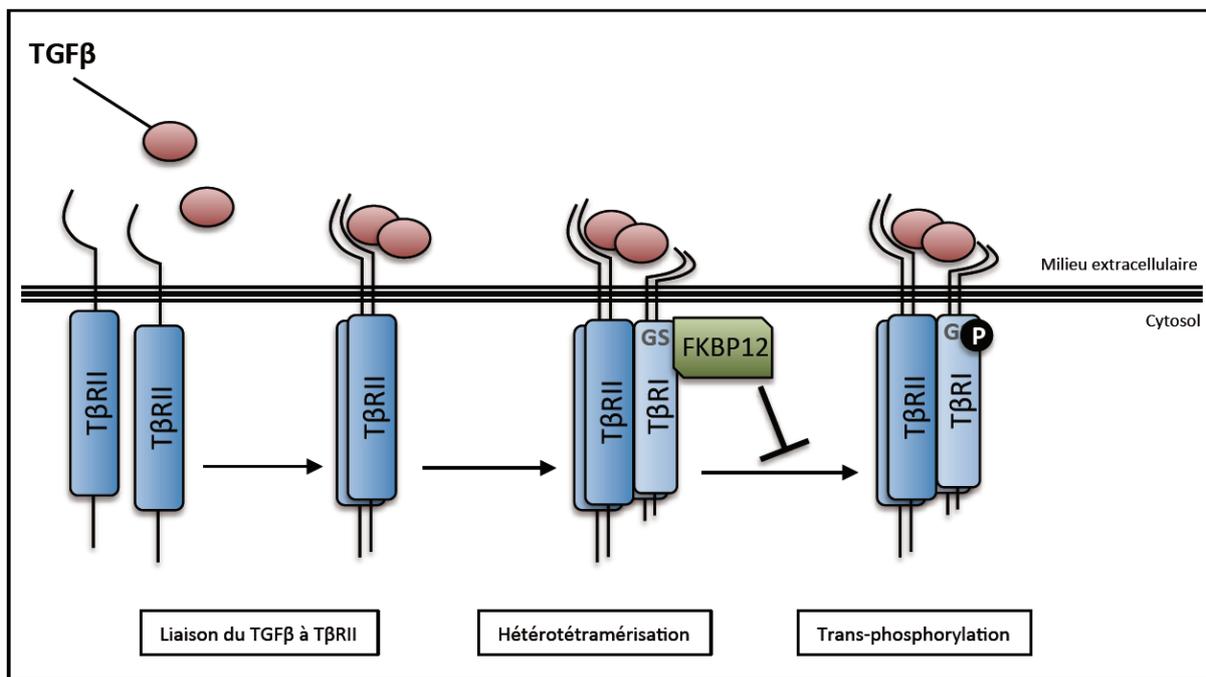


Figure 4 : Représentation schématique des étapes d'activation des récepteurs au TGFβ

Les récepteurs de type I ($T\beta RI$) et de type II ($T\beta RII$) au TGFβ existent sous forme monomérique au niveau de la membrane plasmique. La liaison du dimère actif de TGFβ entraîne l'homodimérisation du $T\beta RII$ et le recrutement d'un homodimère de $T\beta RI$. L'hétérotétramérisation du récepteur au TGFβ permet la transphosphorylation des domaines GS (riches en résidus Glycine et Sérine) de $T\beta RI$ par les domaines kinases de $T\beta RII$, ce qui relève l'inhibition par FKBP12 (FK506-Binding Protein) et rend $T\beta RI$ actif pour recruter des protéines adaptatrices et les Smads.

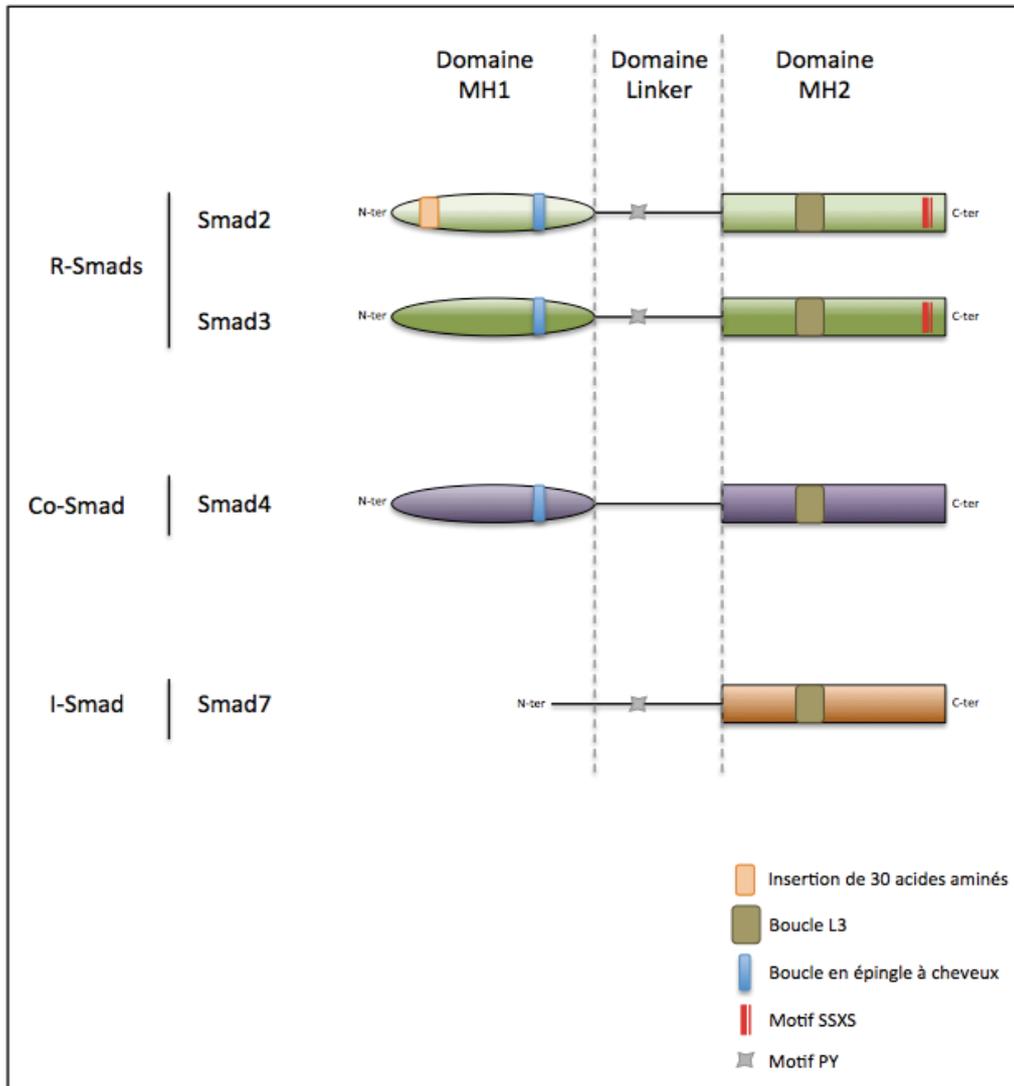


Figure 5 : Représentation schématique de la structure des protéines Smad impliquées dans la voie canonique du TGF β

Dans la voie du TGF β , la famille des protéines Smad comprend les R-Smads (Receptor-activated Smads) que sont Smad2 et Smad3, la Co-Smad Smad4 (Common-Smad) et les I-Smads (Inhibitory Smads) que sont Smad6 et Smad7. Les protéines Smad sont structurées en deux domaines MH1 et MH2 (Mad-Homology) situés respectivement en N-terminal et en C-terminal, reliés par un domaine Linker. Le domaine MH1, absent des protéines I-Smads, permet la liaison à l'ADN et l'interaction avec des co-régulateurs transcriptionnels. Le domaine MH2 des R-Smads contient le site SXSS de phosphorylation par le T β RI qui est le déclencheur de la transduction du signal TGF β .

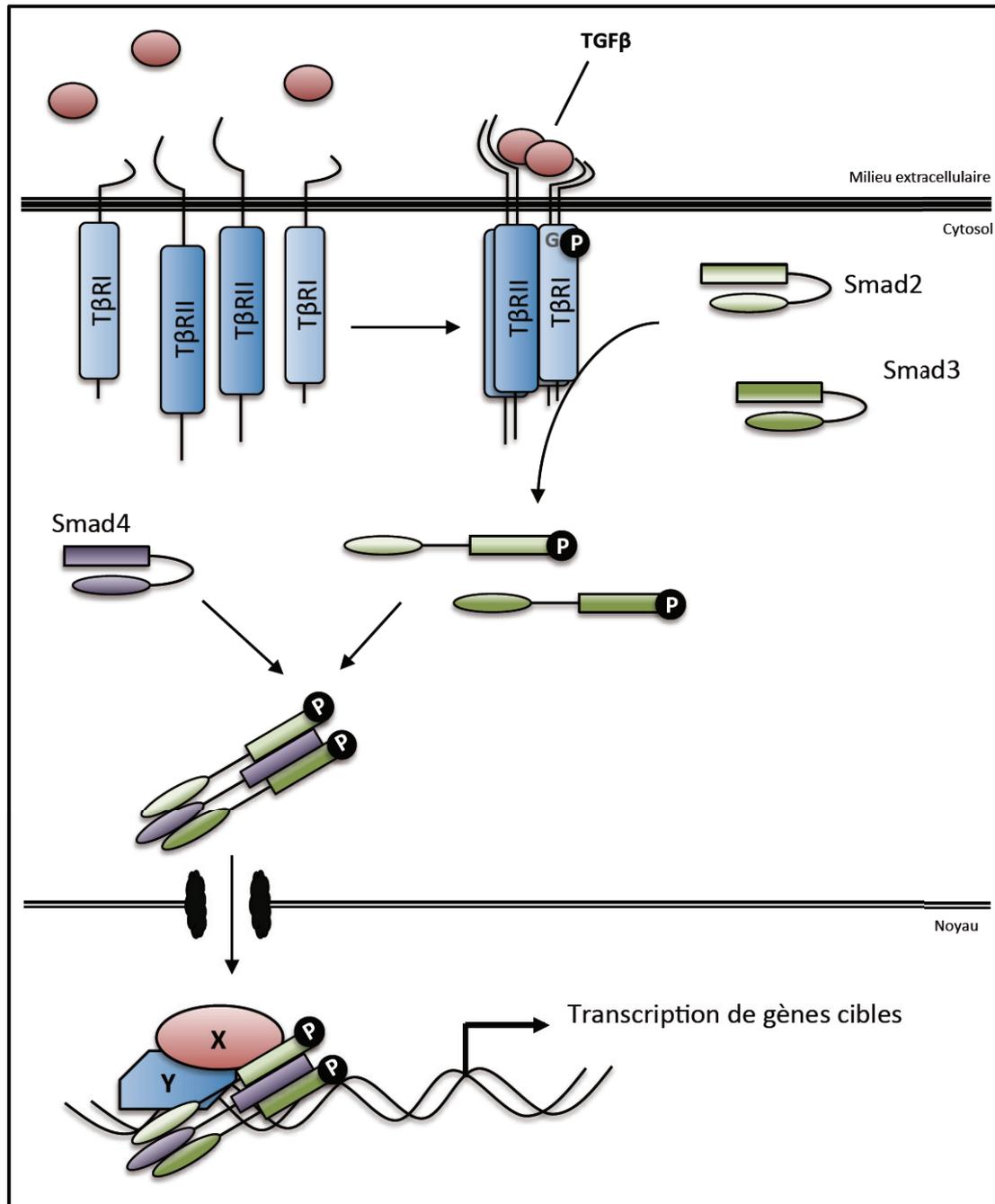


Figure 6 : Représentation schématique de la voie de signalisation canonique du TGFβ

Sous l'action du ligand TGFβ qui active le complexe de récepteurs, les protéines Smad2 et Smad3, sous formes repliées inactives, sont recrutées et phosphorylées par le domaine kinase de TβRI. Les R-Smads ainsi activées se complexent à Smad4 pour former l'entité fonctionnelle de la voie canonique du TGFβ : le complexe transcriptionnel hétéro-trimérique qui se transloque dans le noyau et lie l'ADN au niveau des promoteurs de gènes cibles du TGFβ.

Partenaire	Smad (domaine d'interaction)	Mécanisme d'action
<i>bHLH family</i>		
E2F4/5	Smad3 (MH2)	Recruitment of p107 to Smad3 to repress the c-myc gene
Max	Smad3 (MH1)	Max inhibits transcription activation by Smad3
MyoD	Smad3 (MH1-linker)	Interference of MyoD/E protein/DNA complex formation
TFE3	Smad3/4	Synergistic cooperation on TGF- β target genes such as PAI-1, Smad7
<i>bZIP family</i>		
ATF2	Smad3/4 (MH1)	Stimulation of ATF2 transactivation
ATF3	Smad3 (MH2)	Repression of the Id1 promoter
c-Fos	Smad3 (MH2)	Cooperation on AP-1-dependent TGF- β target genes
c-Jun, JunB, JunD	Smad3 (MH1), Smad4	Positively and negatively regulate Smad activity
CEBP α , β , δ	Smad3 (MH1)	Smad3 inhibits CEBP's transactivation
<i>Forkhead family</i>		
FoxH1/FAST	Smad2/3	Formation of activin-responsive factors on the activin-responsive promoters
FoxO	Smad2/3	Regulation of p21 ^{Cip1}
<i>Homeodomain protein family</i>		
Dlx1	Smad4	Inhibits Smad4 signaling
Hoxc-8	Smad1 (MH1-linker), Smad6 (MH2)	Relief of Hoxc-8-dependent repression Inhibition of Smad1-Hoxc-8 interaction
Milk/Mixer	Smad2 (MH2)	Recruitment of Smad2/Smad4 activators to the activin-responsive complex
<i>Nuclear receptor family</i>		
Androgen receptor (AR)	Smad3 (MH2)	Reciprocal inhibition of Smad3 DNA-binding activity and of AR activity
Estrogen receptor	Smad1/3/4(MH2)	Repression of Smad target genes
Glucocorticoid receptor	Smad3 (MH2)	Inhibition of Smad3 transactivation activity
HNF4	Smad3/4	Cooperative activation
RXR	Smad3 (MH2)	
Vitamin D3 receptor	Smad3 (MH1)	Coactivation of ligand-induced transactivation of vitamin D receptor
<i>Runx family</i>		
CBFA1/Runx2/AML	Smad1/2/3/5 (MH2)	Cooperative activation of BMP responses; regulation of immune responses

Tableau 2 : Liste des facteurs de transcription interagissant avec les protéines Smad (d'après Feng & Derynck, 2009)

Partenaire	Smad (domaine d'interaction)	Mécanisme d'action
<i>Zinc finger protein family</i>		
GATA3	Smad3	Recruits Smad3 to GATA sites to cooperatively activate transcription
GATA4,5,6	Smad1	Cooperate in the regulation of Smad7 and Nkx2.5
Gli Δ C-ter	Smad1/2/3/4	Unknown
OAZ	Smad1/4 (MH2)	Formation of BMP-responsive activator complex
Sp1	Smad2 (MH1) Smad4 (MH2)	Cooperative activation of TGF- β target genes, e.g., p15 ^{Ink4B} , p21 ^{Cip1} , Smad7, PAI-1, and collagen
YY1	Smad1, Smad4 (MH1)	Complex with Smads and GATA
ZNF198	Smad3 (MH2)	Unknown
<i>Others</i>		
β -catenin	Smad1/4	Wnt-dependent activation of LEF1 target genes
HIF-1 α	Smad3 (MH1, MH2)	Cooperation of TGF- β with hypoxia pathway and angiogenesis
IRF-7 (IRFs)	Smad3 (MH2)	Smad3 activation of IRF-7 transactivation function
Lef1/TCF	Smad1/2/3/4 (MH1, MH2)	Smad coactivation of LEF1 signaling
MEF2 (MADS box)	Smad3	Smad3 represses the transcription activity of MEF2
Menin	Smad2/3 (MH2)	Facilitate Smad DNA binding
NF κ B p52	Smad3	Coactivation of κ B site
NICD	Smad1/3 (MH2)	Coactivation of NICD-RBP-Jk complex to regulate the Notch targets
p53	Smad2/4	Synergism and antagonism
Pax8	Smad3	Smad3 reduces Pax8 DNA binding
SRF	Smad3	Mediate TGF- β -induced SM22 α transcription

Tableau 2 (suite) : Liste des facteurs de transcription interagissant avec les protéines Smad (d'après Feng & Derynck, 2009)

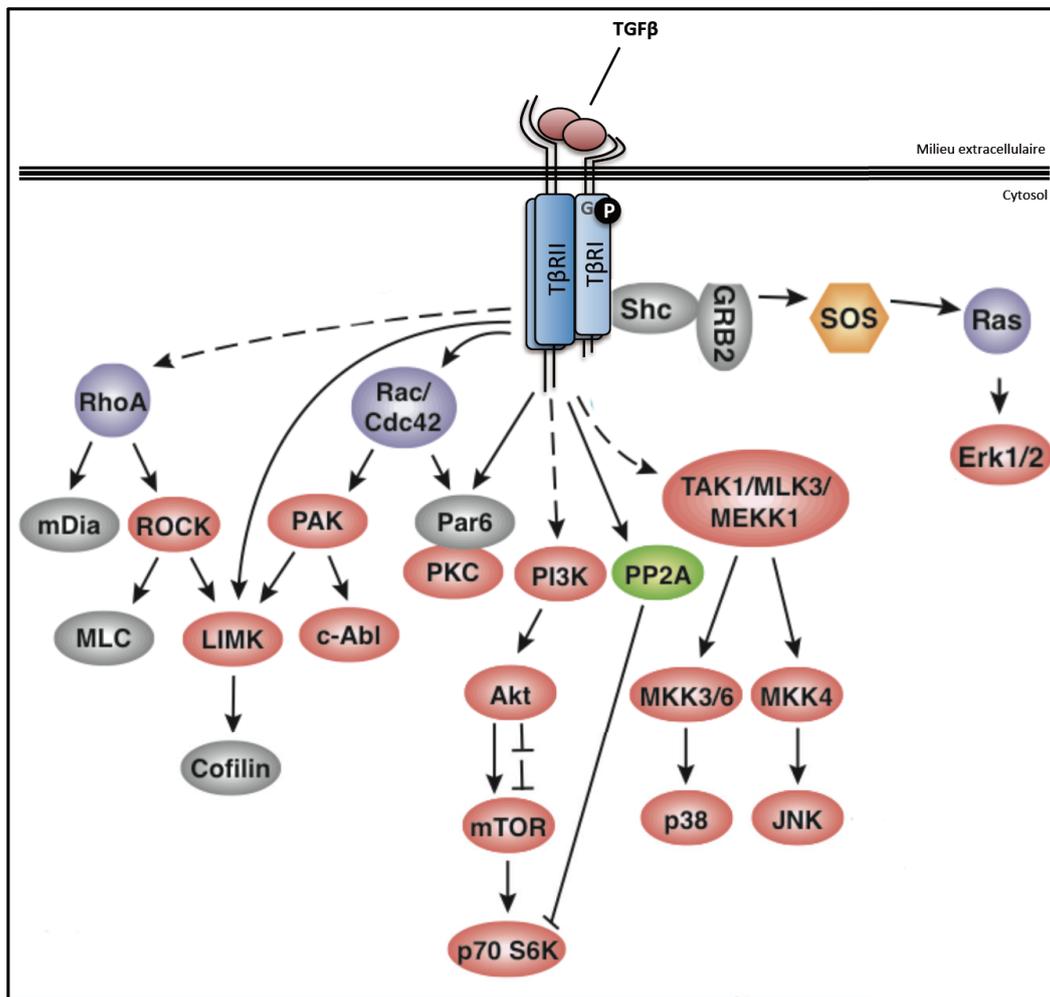


Figure 7 : Représentation schématique de l'activation de voies non canoniques par le TGFβ

Le ligand TGFβ peut, via son récepteur tétramérique, activer de nombreuses voies de signalisation indépendantes des protéines Smad. Par exemple, la phosphorylation de TβRI peut recruter les protéines adaptatrices Shc (Sh2 domain containing protein) et Grb2 (Growth factor receptor binding protein 2) pour activer la voie Erk-MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase). Le récepteur au TGFβ peut aussi activer les voies PI3K-Akt (PhosphoInositide 3 Kinase) et les voies des petites protéines G Rho, Rac/Cdc42 pour jouer sur le cytosquelette et l'adhésion cellulaire.

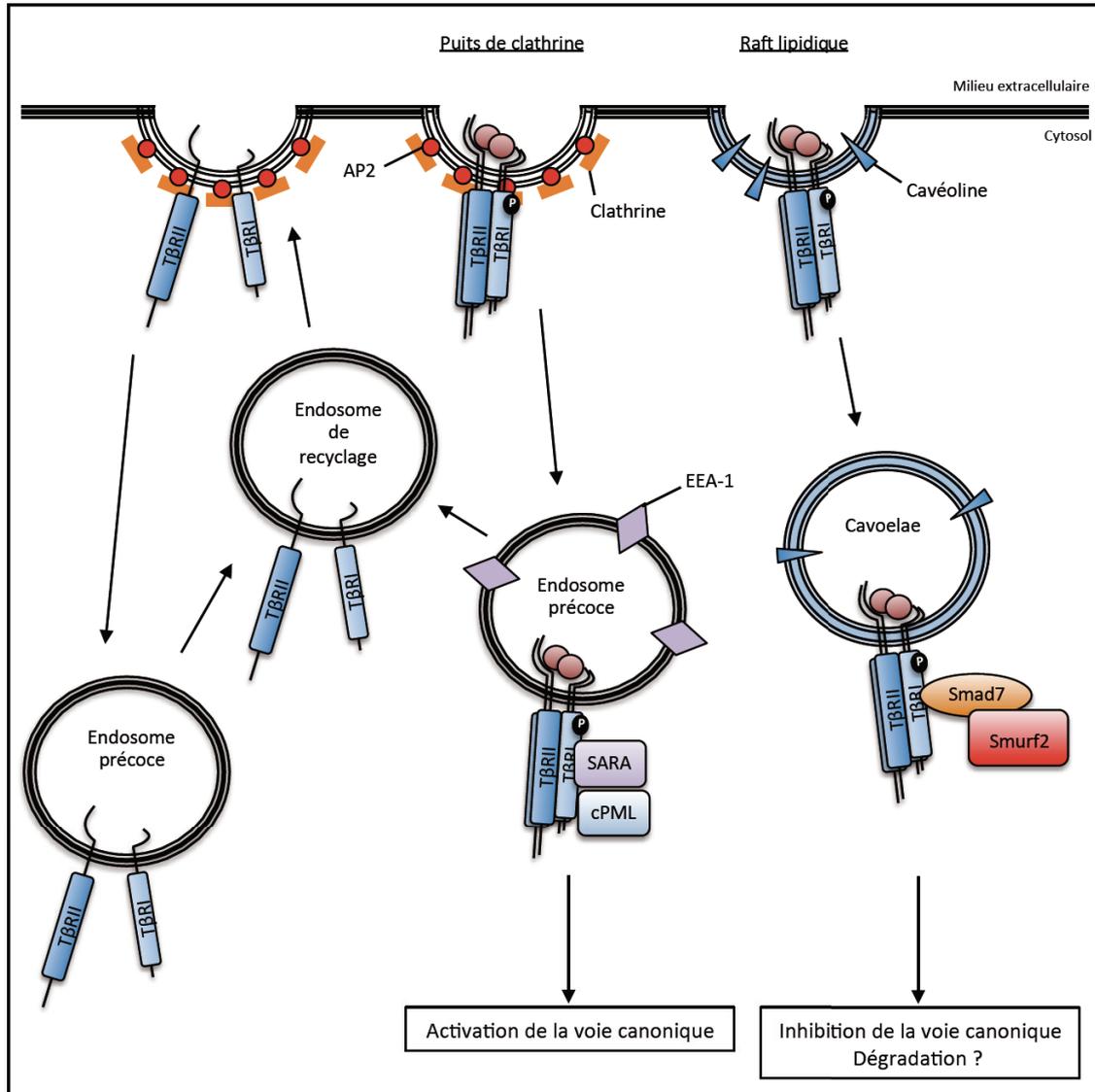


Figure 8 : Représentation schématique des voies d'internalisation des récepteurs au TGF β

En absence de leur ligand, les récepteurs au TGF β de type I (T β RI) et de type II (T β RII) sont internalisés puis recyclés par le système endosomal pour retourner à la membrane plasmique. Les récepteurs activés par le ligand peuvent être localisés au niveau de puits de clathrine associée à la protéine adaptatrice AP2, ce qui leur permettra d'être internalisés dans les endosomes précoces positifs pour EEA-1 (Early Endosome Antigen 1), conduisant à l'activation de la voie du TGF β grâce à la présence de régulateurs positifs comme SARA (Smad Anchor for Receptor Activation) ou cPML (cytoplasmic ProMyelocytic Leukemia). Les récepteurs se trouvant au niveau de rafts lipidiques sont endocytés dans des caveolae, ce qui conduit à leur dégradation par le lysosome ou l'inhibition de la voie du TGF β par le recrutement des inhibiteurs Smad7 ou Smurf2.

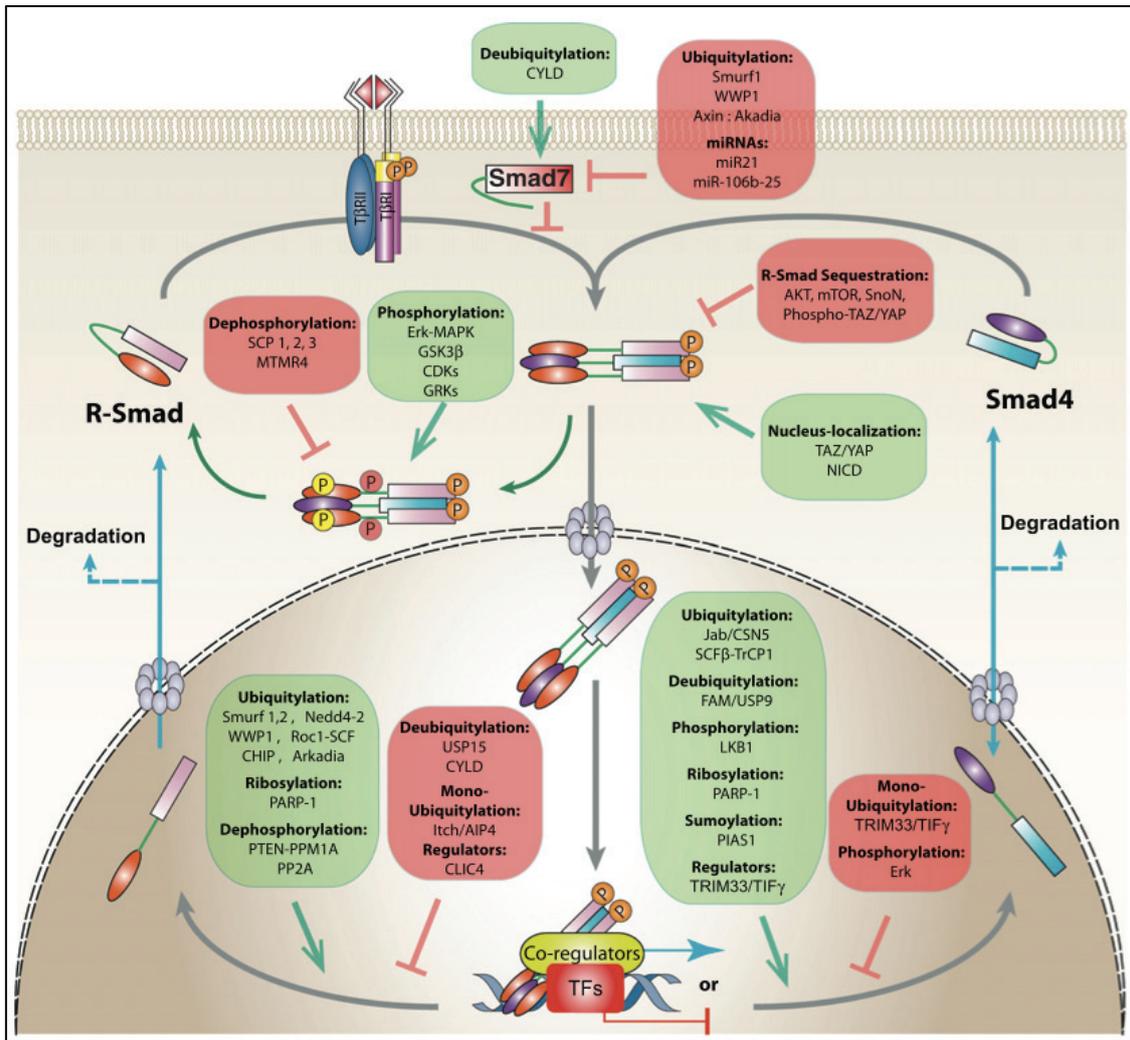


Figure 9 : Représentation schématique de l'activation de la régulation des protéines Smad (extrait de Xu et al, FEBS Letter, 2012)

Les flèches grises illustrent la signalisation des protéines Smad et les flèches bleues indiquent la navette nucléo-cytoplasmique ainsi que leur dégradation. L'activation des R-Smads par le TβRI induit la formation du complexe trimérique R-Smads/Smad4, qui est importé dans le noyau pour réguler la transcription de gènes cibles du TGFβ. La phosphorylation des R-Smads sur d'autres sites que le domaine SXSS en C-terminal inhibe la translocation nucléaire du complexe Smads ou favorise leur dégradation, se traduisant par l'inhibition de la réponse au TGFβ. Diverses modifications post-traductionnelles modulent le devenir du complexe Smads dans le noyau et contrôlent la balance entre formation et dissociation du complexe, déterminant ainsi la réponse au signal TGFβ en fonction du contexte cellulaire.

Partenaire	Smad (domaine d'interaction)	Fonction
------------	------------------------------	----------

Co-activateurs

ARC105	Smad2/3/4 (MH2)	Component of the ARC/Mediator
CBP/p300	Smad1/2/3 (MH2) Smad3 (linker) Smad4 (SAD)	Modulate chromatin structure and bridging TGF- β -independent transactivation function Smads with basic transcription machinery
GCN5	Smad1/2/3/5	Modulation of chromatin structure
MSG1	Smad4 (MH2)	Activation of CBP/p300-dependent transcription
PCAF	Smad2/3 (MH2)	Modulation of chromatin structure and stimulation of CBP/p300-dependent transcription
SKIP	Smad2/3 (Linker-MH2)	Derepression of Ski/SnoN?
SMIF	Smad4	Enhanced Smad4 coactivator function
Swift	Smad2	Enhanced Smad2 transactivation function
ZEB1	Smad1/2/3/5 (MH2)	Promotes the formation of a p300-Smad transcriptional complex

Co-répresseurs

c-Myc	Smad2/3 (MH2)	Inhibition of Smad-Sp1 activator complex
c-Ski, SnoN	Smad2/3/4 (MH2)	Recruits N-CoR, mSin3 and HDAC
Evi-1 (ZF)	Smad1/2/3/4 (MH2)	Evi-1 is a zinc finger protein and recruits CtBP to repression complex
SNIP1 (FHA)	Smad1/2/4	Inhibition of Smad4-p300 complex formation
TGIF (HD)	Smad2 (MH2)	Recruits CtBP and HDAC
Tob	Smad1/5/8/4 Smad2/4	Targeting of BMP R-Smad to nuclear body Enhancement of Smad4 DNA-binding
YB-1	Smad3	Disrupt Smad3-DNA and Smad3-p300 interactions
ZEB2/SIP1	Smad1/2/3/5 (MH2)	Recruitment of CtBP

Tableau 3: Liste des co-activateurs et co-répresseurs transcriptionnels des protéines Smad (d'après Feng & Derynck, 2009)

Classe	TRIM	Arrangement des domaines
C-I	1, 9, 18, 36, 46, 67	
C-II	54, 55, 63	
C-III	42	
C-IV	4, 5, 6, 7, 10, 11, 14, 15, 17, 21, 22, 26, 27, 34, 35, 38, 39, 41, 43, 49, 50, 58, 60, 61, 62, 64, 65, 68, 72, 75	
C-V	8, 19, 29, 31, 40, 44, 48, 52, 56, 73, 74	
C-VI	24, 28, 33, 66	<i>Famille TIF1</i>
C-VII	2, 3, 32, 45, 71	
C-VIII	37	
C-IX	23	
C-TM	13, 59	
C-IV like	16, 25, 47	
UC	20	

RING	FN3	IGFLMN
B-box 1	COS	NHL
B-box 2	B30-like	MATH
Coiled-coil	PHD-BROMO	ARF
		TM
		PAAD

Figure 10 : Structure des protéines de la famille TRIM
(extrait de Meroni, TRIM/RBCC proteins, 2012)

Les 12 sous-familles de la famille TRIM (TRIPartite Motif) sont caractérisés par une structure proche (domaine TRIM/RBCC en N-terminal : domaine RING, boîtes B et domaine Coiled-coil) et possèdent tous une activité ubiquitine ligase grâce à leur domaine RING.

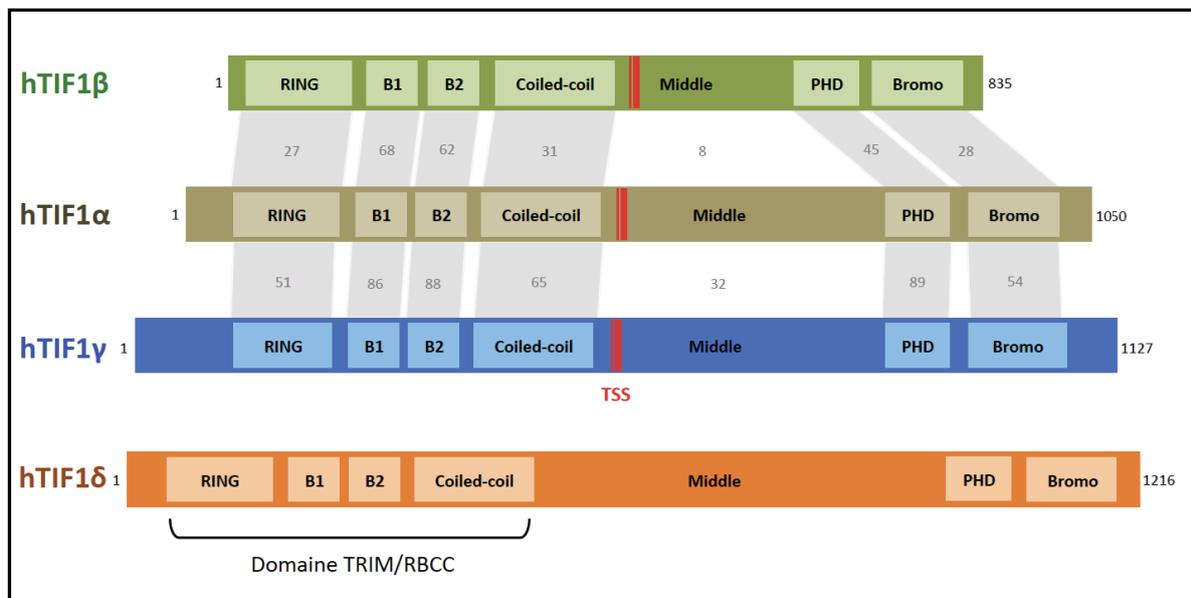


Figure 11 : Structure des protéines de la famille TIF1

Les protéines de la famille TIF1 (Transcriptional Intermediary Factor 1) possèdent une structure caractéristique composée du domaine TRIM/RBCC en N-terminal, d'un domaine Middle et de domaines PHD (Plant Homeobox Domain) et Bromodomaine en C-terminal. Les différents membres possèdent la signature TSS (TIF1 Signature Sequence) et présentent une forte identité au niveau de leurs séquences en acides aminés (indiquée en pourcentage en gris, pas de donnée pour TIF1δ). Le domaine Middle est le moins conservé entre les différents membres de la famille. De manière intéressante, ce domaine est le domaine d'interaction entre TIF1γ et les protéines Smads dans la voie de signalisation du TGFβ.

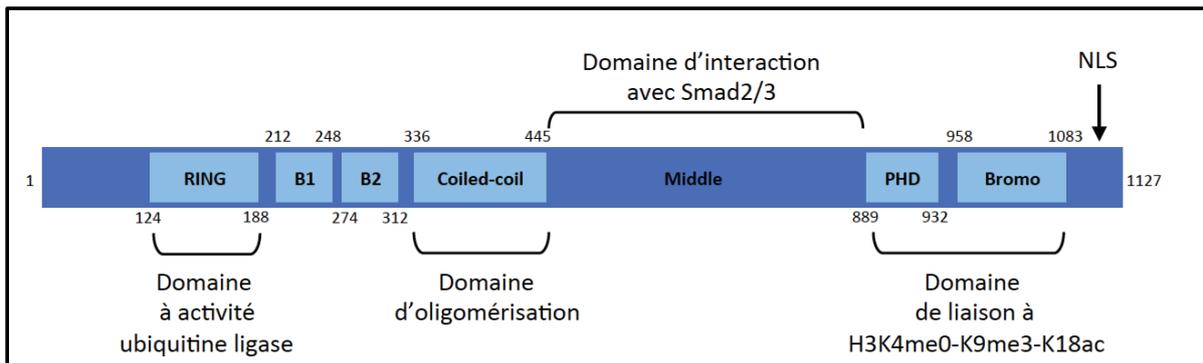


Figure 12 : Structure et fonction des domaines de la protéine TIF1 γ

La protéine TIF1 γ possède, de l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale, un domaine RING responsable de son activité ubiquitine ligase, notamment sur Smad4, de deux domaines appelés boîtes B (B1 et B2), d'un domaine Coiled-coil nécessaire à l'oligomérisation notamment avec TIF1 α , d'un domaine Middle connu pour être le domaine d'interaction avec les protéines Smad2 et Smad3, et de domaines permettant la liaison de TIF1 γ à l'ADN par reconnaissance de modifications de l'Histone H3 (domaines PHD et Bromodomaine). Le site de localisation nucléaire (NLS) de TIF1 γ est localisé en C-terminal (acides aminés 1113 à 1118).

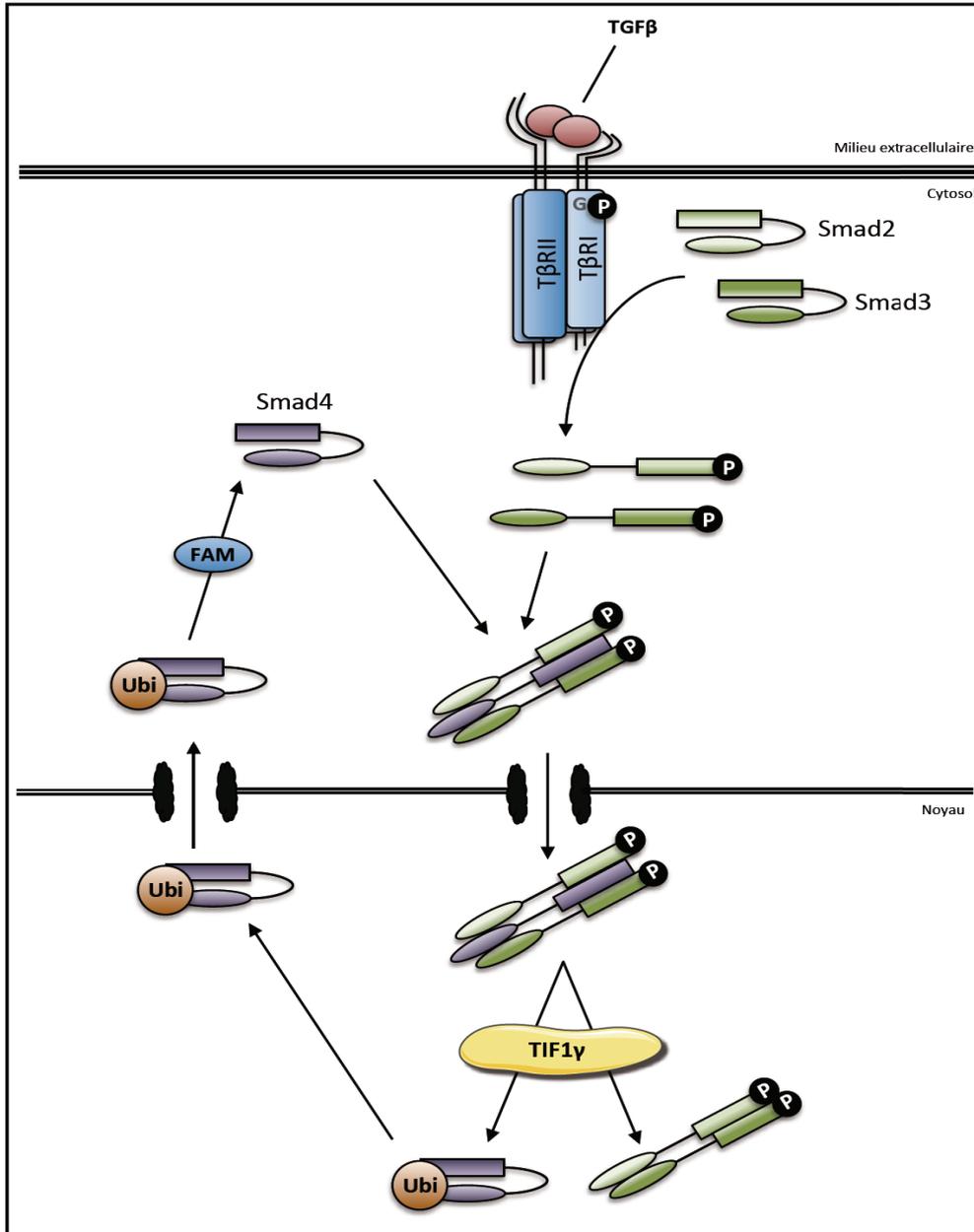


Figure 13 : Représentation schématique du rôle d'ubiquitine ligase de TIF1 γ dans la régulation de la voie du TGF β (Modèle de Dupont et al, 2009)

Les protéines R-Smads activées par le signal TGF β se complexent à Smad4 et forment l'entité fonctionnelle de la voie du TGF β qui pénètre dans le noyau pour réguler la transcription de gènes cibles. L'équipe de Piccolo a montré que par son activité ubiquitine ligase, la protéine TIF1 γ nucléaire est responsable de la monoubiquitination de Smad4, conduisant à la dissociation du complexe R-Smads/Smad4 et à l'export nucléaire de Smad4, mettant ainsi fin à la signalisation canonique. Cette équipe a également identifié la déubiquitinase cytoplasmique FAM/USP9x qui s'oppose à l'action répressive de TIF1 γ en rendant à nouveau Smad4 disponible pour répondre au signal TGF β .

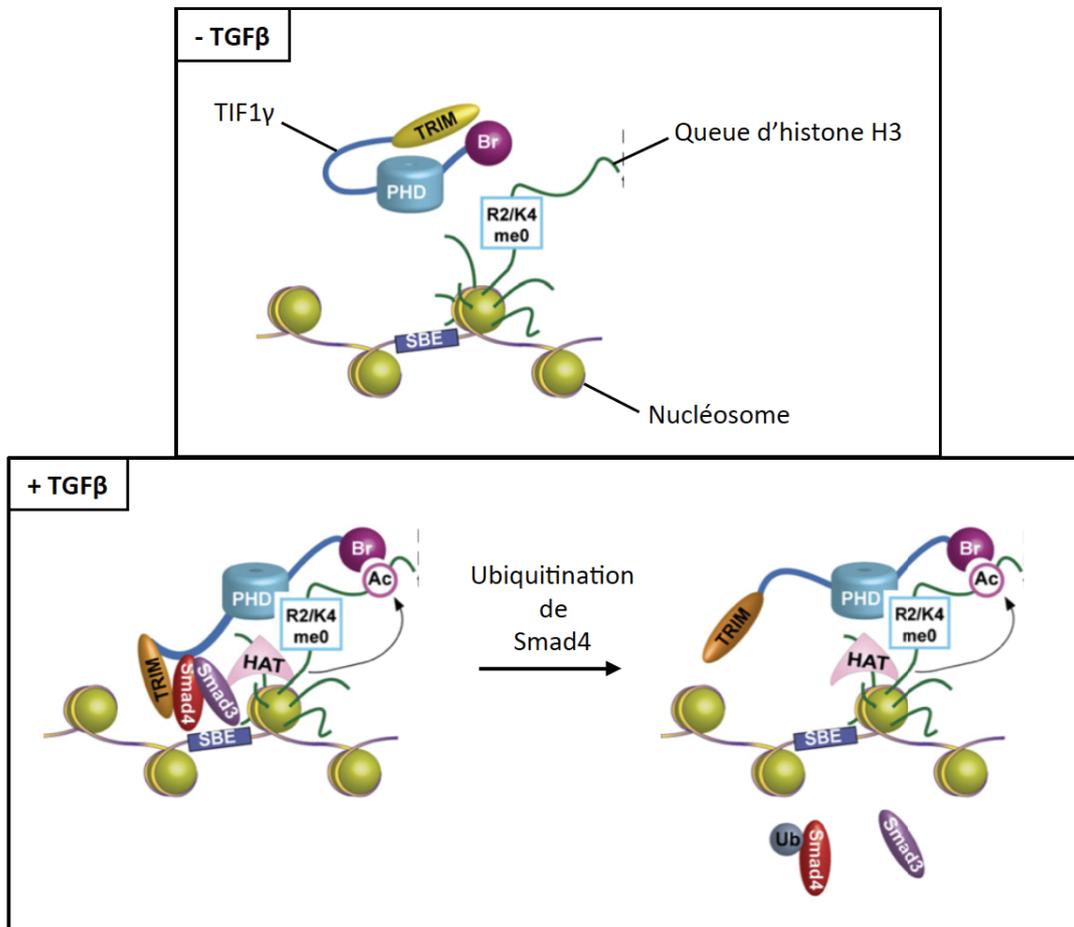


Figure 14 : Représentation schématique du rôle de TIF1 γ dans la régulation de la voie de signalisation du TGF β (Modèle de Agricola et al, 2011)

Ce modèle présente la régulation de l'action ubiquitine ligase de TIF1 γ sur Smad4 par la reconnaissance de modifications de la chromatine. En absence de TGF β , la protéine TIF1 γ se présente sous forme inactive repliée. La transduction du signal TGF β implique l'association du complexe R-Smads/Smad4 au niveau de SBE (Smad-Binding Element) situés dans les promoteurs de gènes cibles, ce qui recruterait des protéines de type HAT (Histone AcetylTransferase) responsable de l'acétylation des résidus K18 et K23 de l'Histone H3. Ces modifications permettent la liaison avec TIF1 γ qui monoubiquitine Smad4 pour mettre fin au signal TGF β . Dans ce modèle, les Smads sont les auteurs d'un « code Histone » lu par TIF1 γ .

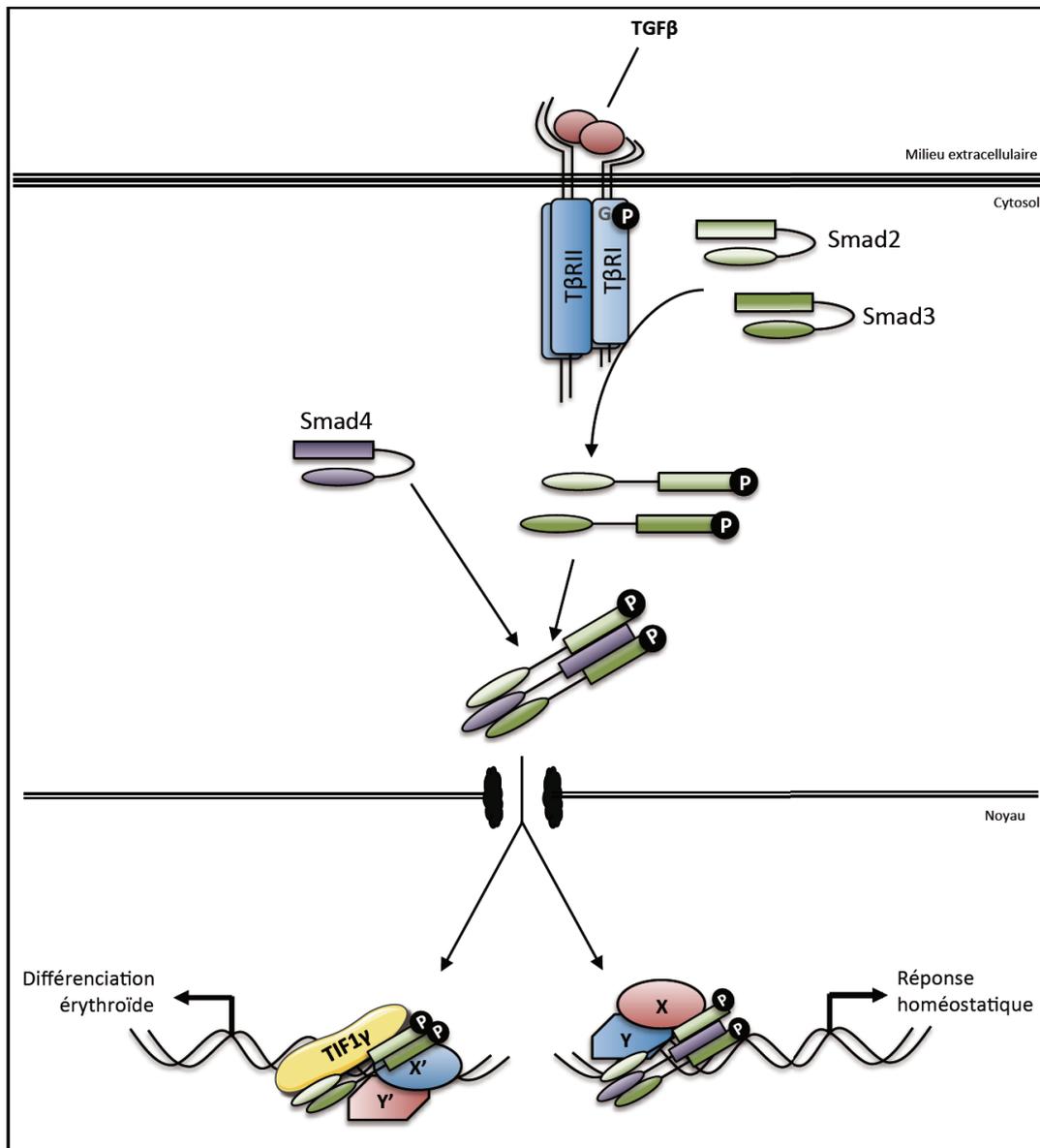


Figure 15 : Représentation schématique de la compétition entre TIF1γ et Smad4 dans la régulation de la voie du TGFβ (Modèle de He et al, 2006)

Dans les cellules souches hématopoïétiques, l'équipe de Massagué a montré que l'activation des R-Smads par le TGFβ pouvait donner naissance à deux types de complexes transcriptionnels : le complexe canonique R-Smads/Smad4 régulerait la prolifération des cellules souches hématopoïétiques, et le complexe R-Smads/TIF1γ permettrait de conduire la différenciation érythroïde.

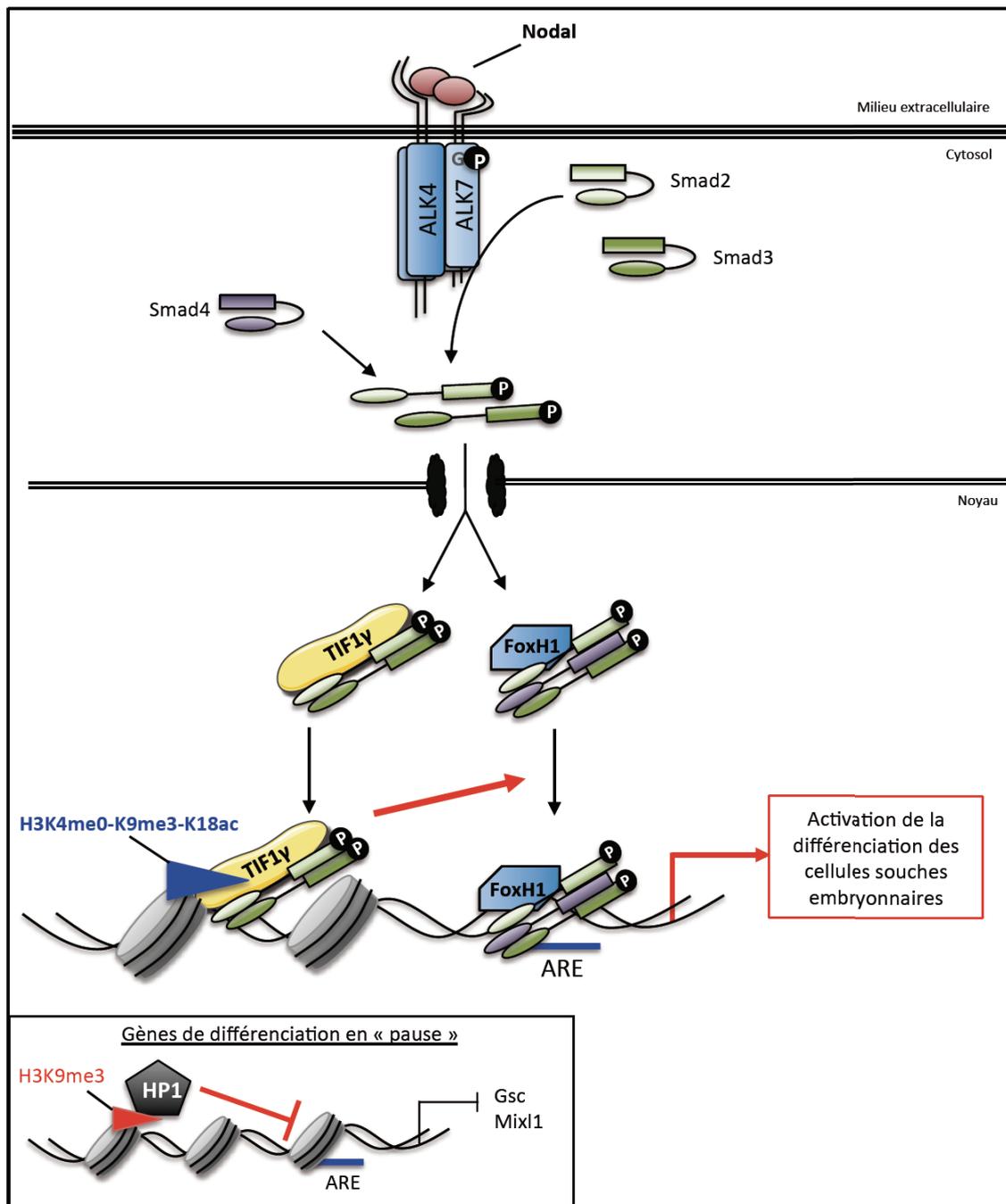


Figure 16 : Représentation schématique du rôle de TIF1 γ dans la régulation de la différenciation des cellules souches embryonnaires (modèle de Xi et al, 2011)

Dans les cellules souches embryonnaires, l'activation des R-Smads par le signal Nodal induit la formation des complexes R-Smads/Smad4 et R-Smads/TIF1 γ qui coopèrent pour activer la transcription des gènes de la différenciation. Les promoteurs de ces gènes, dont la répression est assurée par HP1 (Heterochromatin Protein 1), voient leur chromatine modifiée pour recruter TIF1 γ , qui rend accessible les sites ARE (Activin Response Element) au complexe canonique pour activer la différenciation des cellules.

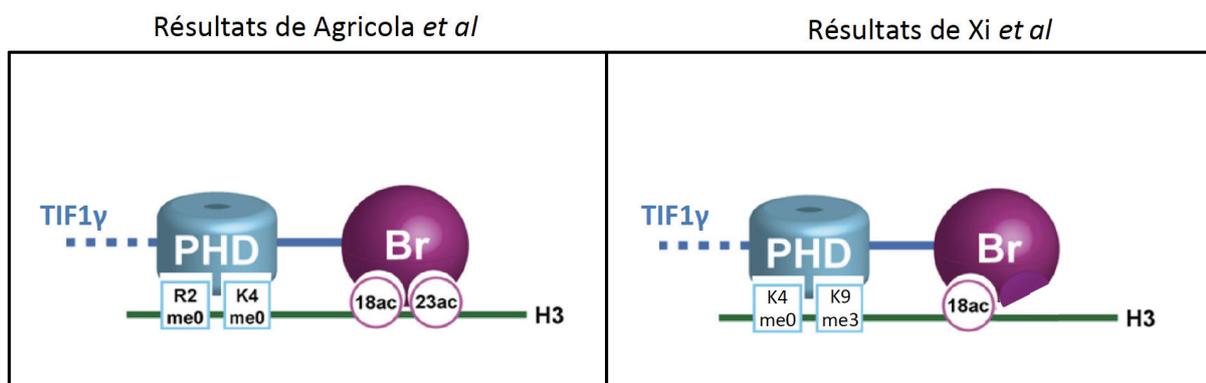


Figure 17 : Comparaison des modèles de reconnaissance des modifications épigénétiques par TIF1 γ (Agricola et al, 2011 et Xi et al, 2011)

La protéine TIF1 γ est capable de reconnaître des modifications de la chromatine grâce à ses domaines PHD (Plat Homeobox Domain) et Bromodomaine (Br). À gauche, Agricola et al proposent que le domaine PHD reconnait les résidus Arginine 2 et Lysine 4 non méthylés et que le Bromodomaine reconnait les résidus Lysine 18 et 23 acétylés (motif H3R2/K4me0-K18/K23ac), au niveau de la queue terminale de l'Histone H3. À droite, Xi et al ont cristalliser cette interaction et ainsi montré que le domaine PHD de TIF1 γ reconnait un motif constitué du résidu Lysine 4 non méthylé et du résidu Lysine 9 triméthylé, et que le Bromodomaine reconnait le résidu Lysine 18 acétylé (motif H3K4me0-K9me3-K18ac).

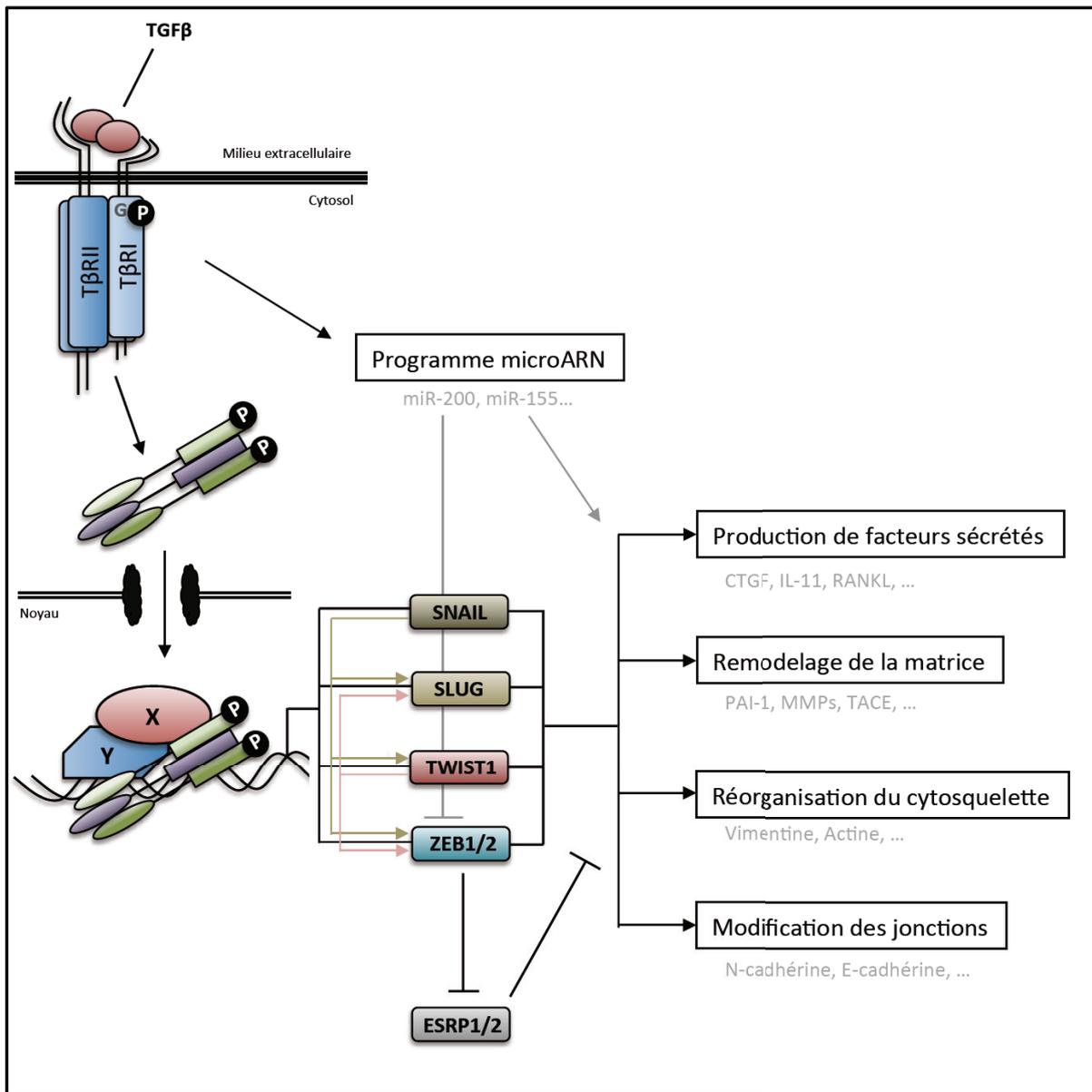


Figure 18 : Représentation schématique de l'induction de la TEM par la voie canonique du TGFβ

La voie de signalisation du TGFβ induit l'expression des régulateurs clés de la TEM (SNAIL, SLUG, TWIST, ZEB) dont les activités transcriptionnelles conduisent à l'élaboration de différents programmes régulant l'inhibition de marqueurs épithéliaux et l'acquisition de marqueurs mésenchymateux nécessaires à l'induction de la TEM par le TGFβ. Outre ce programme transcriptionnel, l'induction de la TEM par le TGFβ fait intervenir un programme d'épissage alternatif orchestré par les facteurs ESRP (Epithelial Splicing Regulatory Protein), ainsi qu'un programme de microARN. Les flèches de couleur montrent les inter-régulations qui existent entre les facteurs de transcription clés de la TEM.

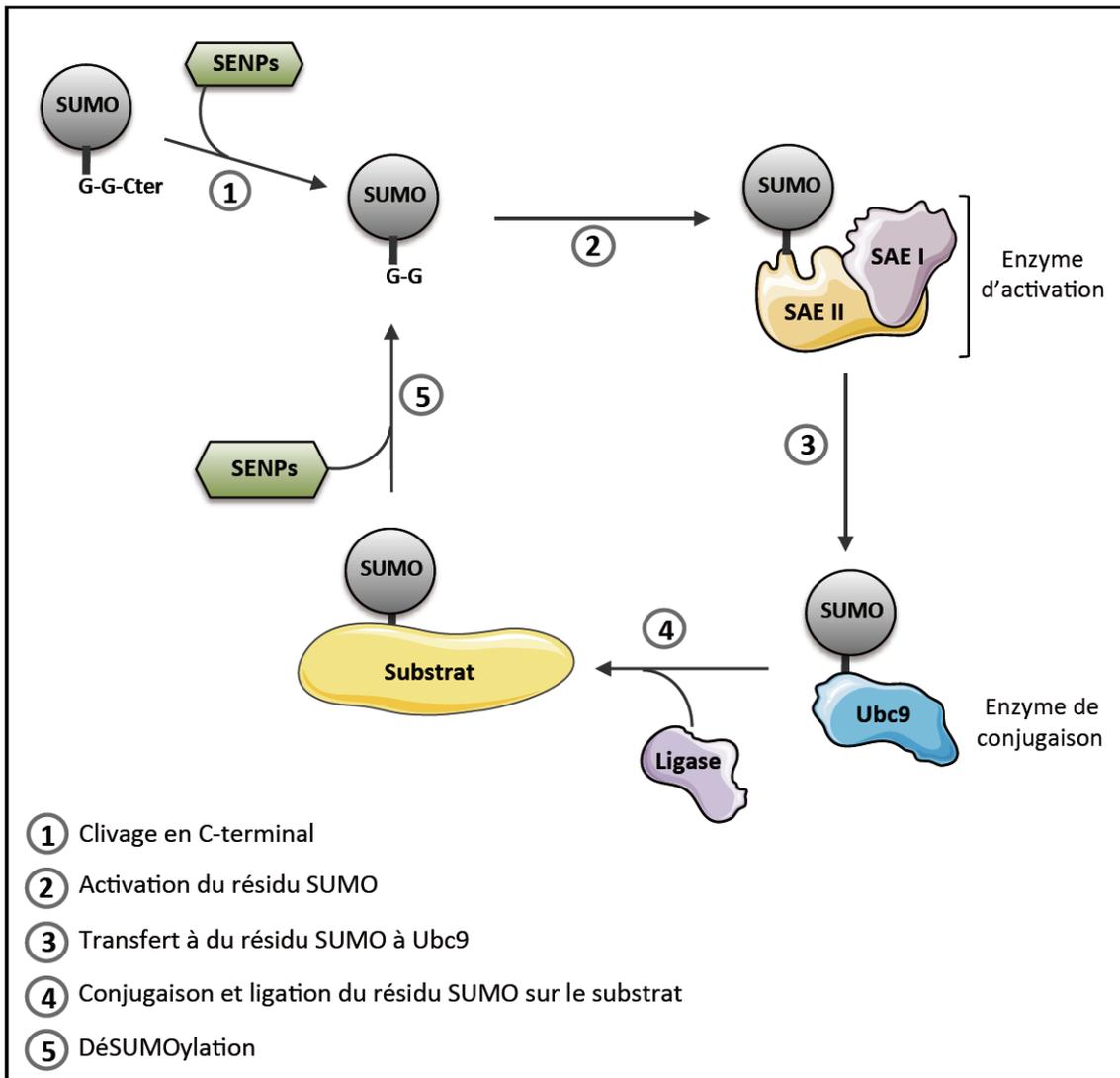


Figure 19 : Étapes de la SUMOylation

La SUMOylation nécessite l'activation du résidu SUMO par des SENPs (SUMO/Sentrin specific Protease) qui clivent le domaine C-terminal (1). Puis, de manière analogue au système d'ubiquitination, la SUMOylation fait intervenir des enzymes E1 d'activation (2) appelées SAE (SUMO-Activating Enzyme) qui transmettent (3) le résidu SUMO à l'enzyme de conjugaison Ubc9 (Ubiquitin Carrier protein 9). Des enzymes E3 SUMO-ligase permettent ensuite l'addition covalente du résidu SUMO sur la Lysine d'un site consensus de SUMOylation du substrat protéique (4). La SUMOylation est un processus très dynamique et réversible par l'action des SENPs (5).

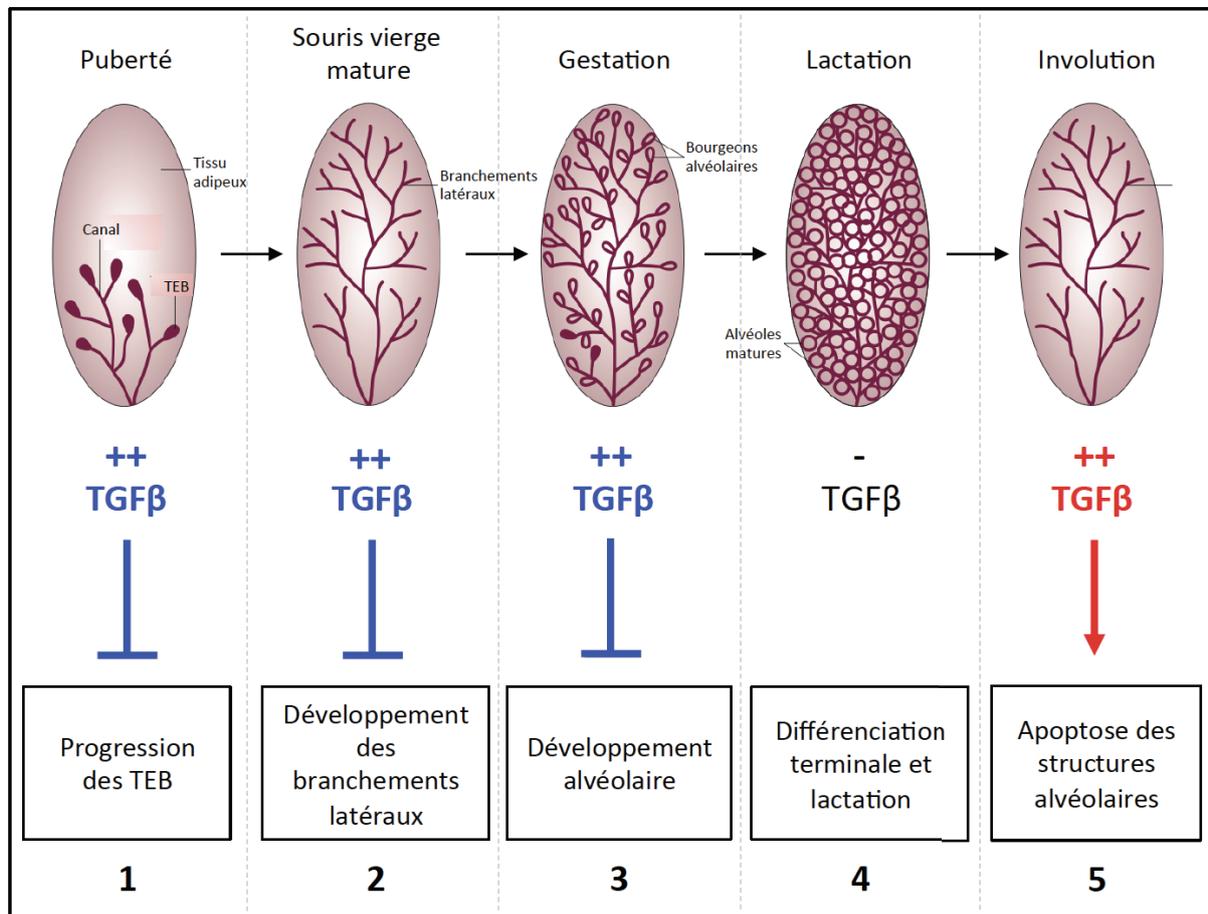


Figure 20 : Rôles physiologiques du TGFβ au cours du développement de la glande mammaire

La physiologie de la glande mammaire est régie de manière très importante par les effets négatifs (en bleu) ou positifs (en rouge) du TGFβ. Le rôle de cette cytokine est d'inhiber le développement des bourgeons terminaux à la puberté (panel 1), de contrôler le développement des branchements latéraux chez la souris mature (panel 2), d'empêcher le développement alvéolaire et la production précoce de lait pendant la gestation (panel 3) et de déclencher l'apoptose massive des structures alvéolaires au moment de l'involution (panel 5). Le TGFβ est exprimé tout au long du développement de la glande mammaire excepté au cours de la lactation (panel 4), processus au cours duquel le signal TGFβ doit être totalement aboli.

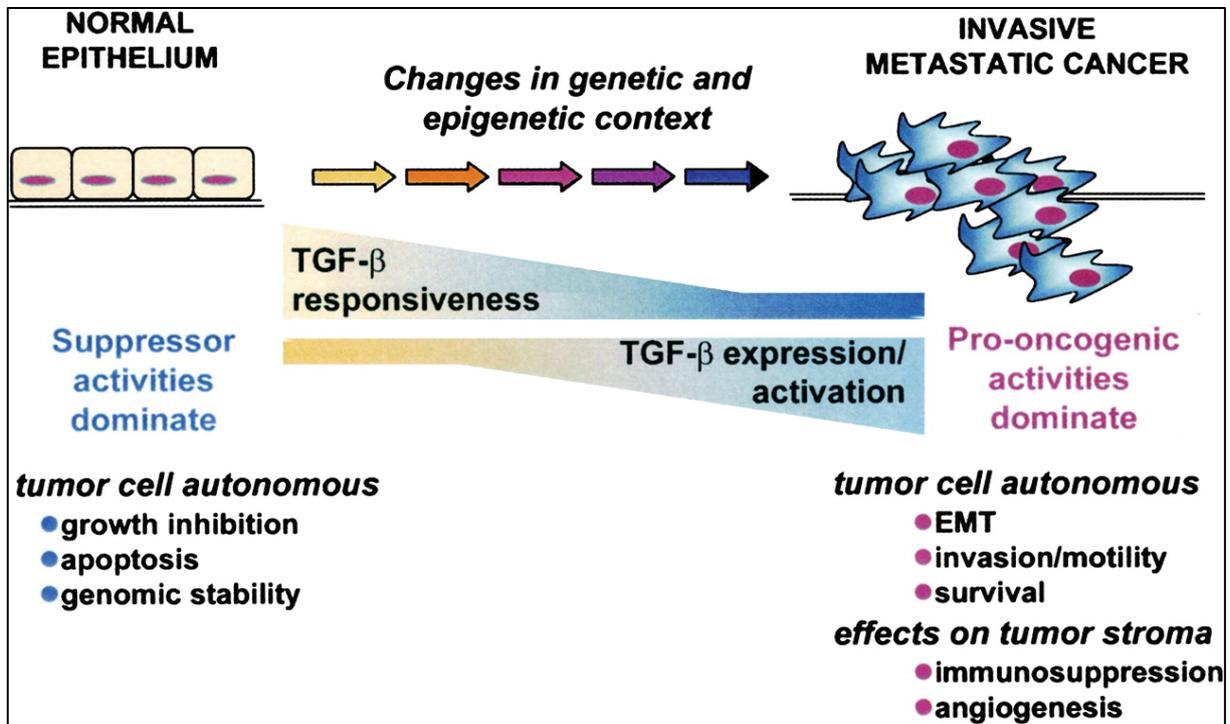


Figure 21 : Dualité fonctionnelle du TGF β au cours de la progression tumorale (extrait de Roberts & Wakefield, PNAS, 2003)

Le TGF β est considéré comme une « épée à double tranchant », arborant des effets suppresseurs de tumeur dans les stades précoces de la tumorigenèse, mais également des effets pro-oncogéniques à des stades avancés de la maladie conduisant à l'apparition de métastases. La progression à une tumeur invasive métastatique est généralement accompagnée par une diminution ou une altération de la réponse au TGF β et une augmentation de l'expression ou de l'activation du ligand TGF β . Ces perturbations, associées à d'autres altérations génétiques et épigénétiques de la cellule tumorale et de son environnement stromal, se combinent pour modifier le spectre des réponses au TGF β .

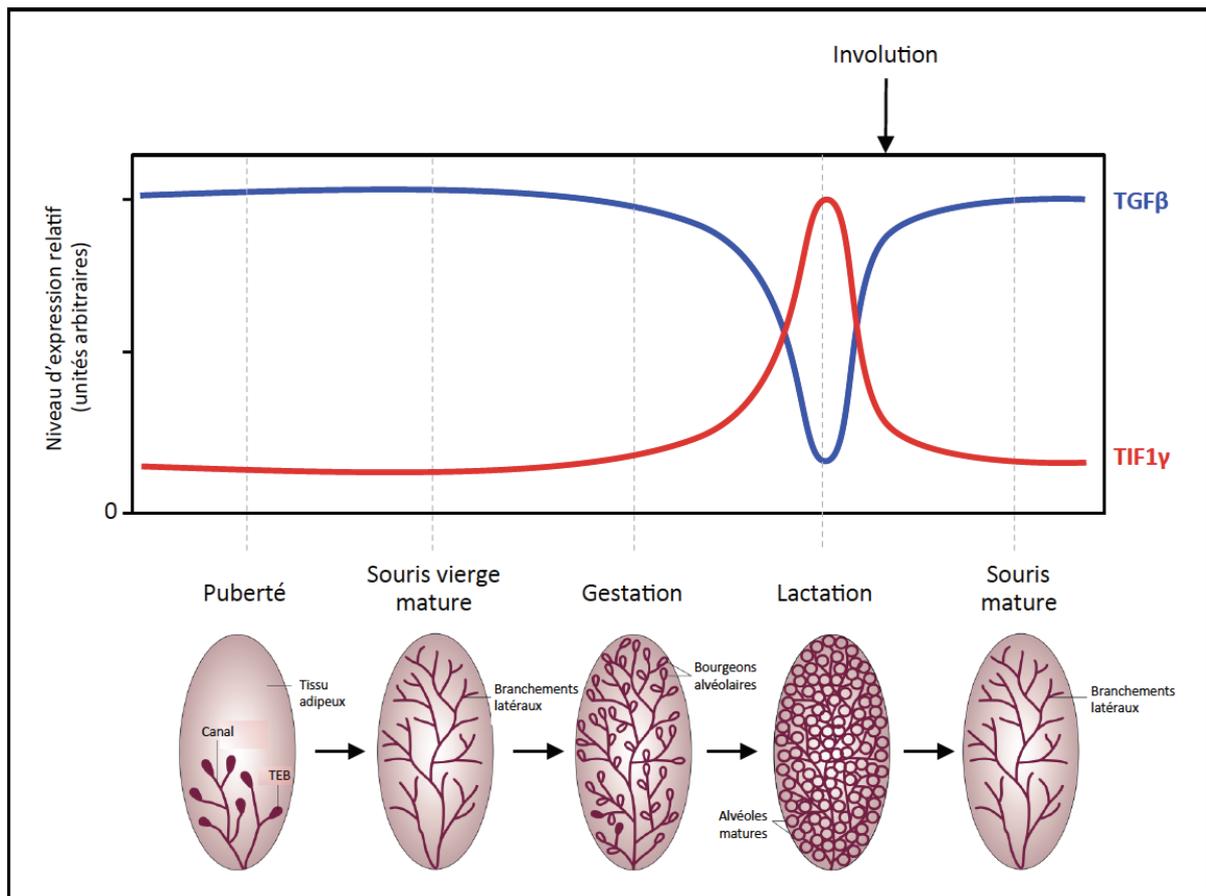


Figure 22 : Représentation schématique des niveaux d'expression de TIF1 γ et du TGF β dans l'épithélium mammaire

Au cours du développement de la glande mammaire, le TGF β est très important pour réguler les étapes de prolifération cellulaires nécessaires de la puberté à la gestation, ainsi que pendant l'involution qui se traduit par une apoptose massive des structures lobuloalvéolaires. Pendant la lactation, le signal TGF β doit être inhibé pour permettre à l'hormone PRL (Prolactin) d'activer la phosphorylation des protéines STAT5 (Signal Transducer and Activator of Transcription 5) nécessaire à l'activation de la transcription des gènes de la lactation. De manière intéressante, nous montrons que la cinétique d'expression de TIF1 γ dans les cellules épithéliales mammaires au cours du développement de la glande mammaire est symétriquement opposée à celle du TGF β . Le pic d'expression de TIF1 γ permettrait une répression maximale de la voie canonique du TGF β pour la lactation.

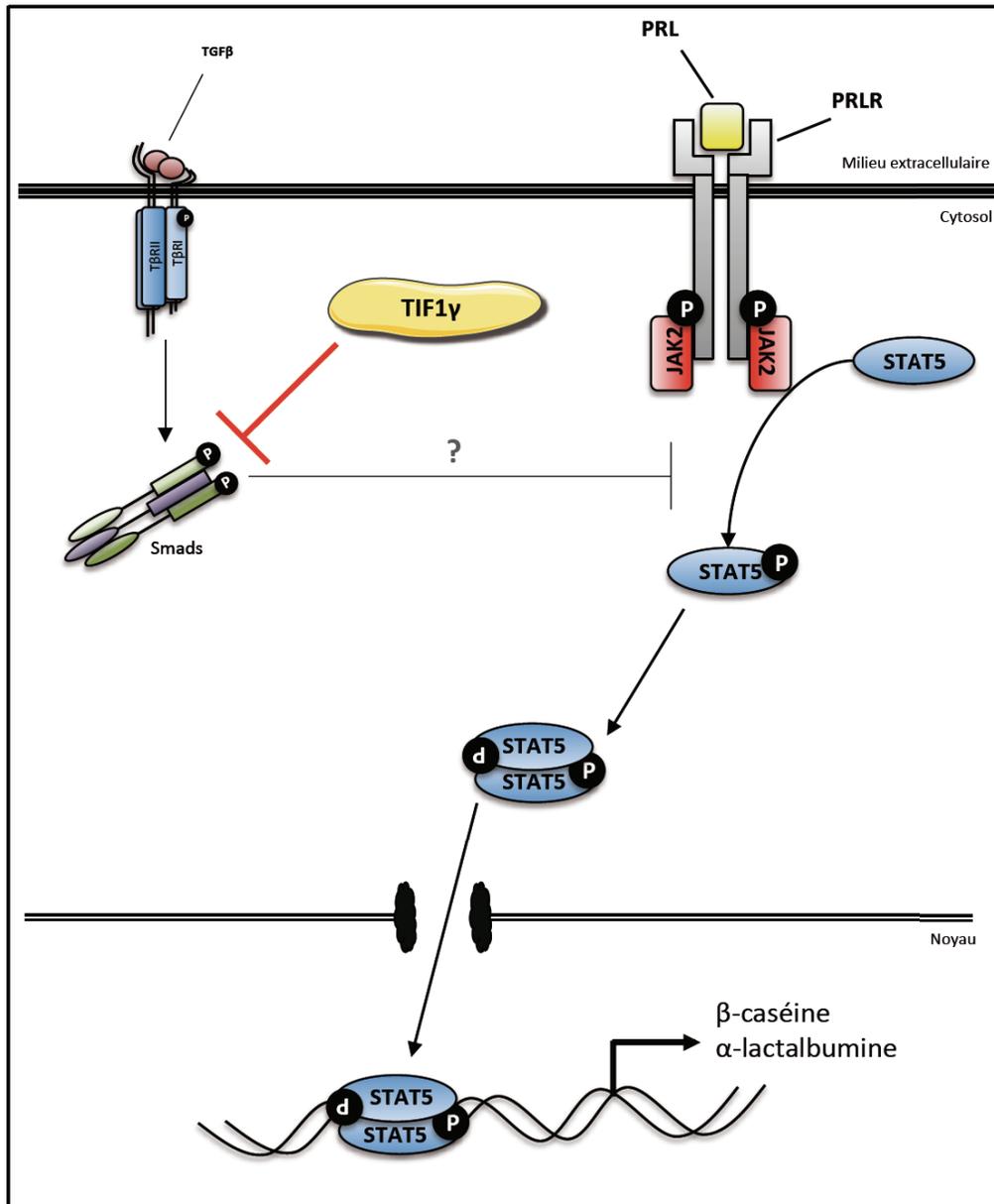


Figure 23 : Représentation schématique du rôle de *TIF1γ* dans la régulation de la voie de la PRL par la voie du TGFβ au cours de la lactation

La lactation est régulée par l'action de la PRL (Prolactin) sur son récepteur PRLR (Prolactin Receptor) pour activer les protéines JAK2 (Janus Kinase 2) et la phosphorylation de STAT5 (Signal Transducer and Activator of Transcription 5). Les protéines STAT5 ainsi activées se dimérisent et entrent dans le noyau pour activer la transcription des gènes de la lactation comme la β -caséine ou l' α -lactalbumine. La voie canonique du TGFβ est connue pour inhiber la transactivation des gènes cibles par STAT5 via Smad4. Nous montrons que la protéine *TIF1γ* est essentielle pour permettre la lactation grâce à son action répressive sur Smad4. Pendant la lactation, gouvernée par la PRL, le signal TGFβ doit être totalement inhibé par l'action répressive de *TIF1γ* sur les fonctions de Smad4.

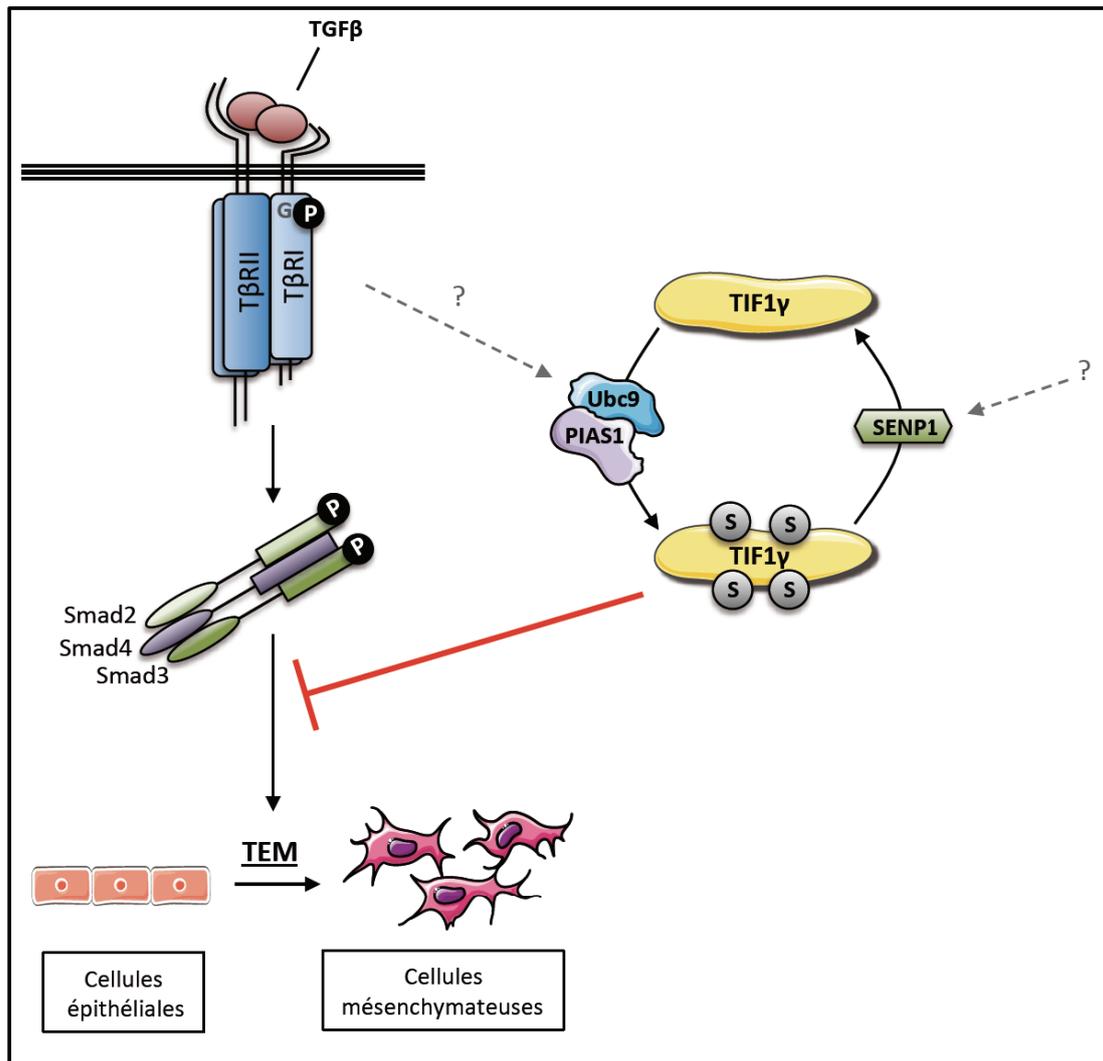


Figure 24 : Représentation schématique du rôle de TIF1 γ dans la régulation de la TEM induite par le TGF β

Le TGF β est un puissant inducteur de la TEM via sa voie canonique et Smad4. Nous montrons que la protéine TIF1 γ est un répresseur des fonctions de Smad4 au cours de la TEM induite par le TGF β dans des cellules épithéliales mammaires. De plus, nos résultats suggèrent que la SUMOylation de TIF1 γ régule cette activité répressive. En effet, la SUMOylation de TIF1 γ serait requise pour son action de répresseur des fonctions de Smad4 au cours de la TEM. La régulation de la dynamique de SUMOylation et déSUMOylation de TIF1 γ reste à déterminer pour comprendre comment la voie du TGF β est finement régulée au cours de l'induction de la TEM.